### Università degli Studi del Molise



Dipartimento di Scienze Animali, Vegetali e dell'Ambiente

# DOTTORATO DI RICERCA IN "DIFESA E QUALITA' DELLE PRODUZIONI AGROALIMENTARI E FORESTALI" (XXIV CICLO)

Settore scientifico disciplinare AGR 11

#### **TESI DI DOTTORATO**

# INDAGINI SUI SEMIOCHIMICI INTERSPECIFICI DI *DRYOCOSMUS KURIPHILUS* (YASUMATSU) ED INTRASPECIFICI DI *GRAPHOLITA MOLESTA* (BUSCK)

Dott.ssa Giada d'Errico

Coordinatore Tutors

Chiar.mo Prof. Chiar.mo Prof. Doctor

P. Trematerra G. Rotundo A. De Cristofaro R.M. Trimble

Anno accademico 2011-2012

## INDICE

1a PREMESSA	Pag.	3
1.1a - Meccanismi di comunicazione negli insetti	"	3
1.1.1a - Semiochimici	"	5
1.1.2a - Semiochimici intraspecifici	"	5 7
1.1.3a - Semiochimici interspecifici	"	7
2.1a - Interazioni pianta-insetto	"	12
2.1.1a - Metaboliti secondari delle piante	"	15
e loro ruolo nella comunicazione		
2.1.2a - Composti volatili emessi dalle piante in seguito ad un danno	"	16
2a - CAPITOLO I	"	19
- RIASSUNTO	66	19
- ABSTRACT	66	19
2.2a - Introduzione		20
2.2.1a - Cinipide del castagno: origine e diffusione	"	
2.2.2a - Tassonomia e morfologia	"	
2.2.3a - Uovo	"	
2.2.4a - Larva	"	
2.2.5a - Pupa	66	
2.2.6a - Adulto	66	
2.2.7a - Biologia e comportamento	"	
2.2.8a - Il castagno: generalità e inquadramento sistematico	"	
3.3a - Materiali e Metodi	"	
3.3.1a - Insetti	66	
3.3.2a - Piante	"	
3.3.3a - Sostanze chimiche	"	
3.3.4a - Biosaggi comportamentali (olfattometro Y)	66	
3.3.5a - Estrazione dei composti volatili	66	
3.3.6a - Gas Cromatografia accoppiata	۲,	37
a Spettrometria di Massa (GC-MS)		
3.3.7a - Elettroantennografia (EAG)		37
3.3.8a - Prove preliminari di attrattività in campo	"	39
3.3.9a - Analisi dei dati	66	41
4.4a - Risultati	66	41
4.4.1a - Risposte comportamentali a materiale vegetale	66	41
4.4.2a - Identificazione composti volatili	66	44
4.4.3a - Risposte EAG	66	46
4.4.4a - Risposte comportamentali a sostanze sintetiche	"	54
4.4.5a - Prove di attrattività delle miscele in campo	"	58
5.5a - Conclusioni	"	60
5 6a - Ribliografia	"	63

2b - CAPITOLO II		
RIASSUNTO	"	73
ABSTRACT	"	73
2.2b - Introduzione	"	74
2.2.1b - <i>Grapholita molesta</i> : origine e diffusione	"	77
2.2.2b - Uovo	"	77
2.2.3b - Larva	"	78
2.2.4b - Pupa	"	78
2.2.5b - Adulto	"	79
2.2.6b - Biologia e comportamento	"	80
3.3b - Materiali e Metodi	"	81
3.3.1b - Insetti	"	81
3.3.2b - Feromone	"	83
3.3.3b - Dose feromone - risposta EAG	"	83
3.3.4b - Adattamento sensoriale verso Z8-12:OAc, E8-12:OAc e	"	84
Z8-12:OH dopo prolungata esposizione ad un componente		
3.3.5b - Adattamento sensoriale verso Z8-12:OAc, E8-12:OAc e	"	85
Z8-12:OH dopo prolungata esposizione a Z8-12:OAc		
ed a due miscele		
3.3.6b - Risposte comportamentali dei maschi di G. molesta	"	86
dopo esposizione a Z8-12:OAc ed a due miscele		
3.3.7b - Analisi statistica dei dati	"	87
4.4b - Risultati	"	89
4.4.1b - Risposte EAG	"	89
4.4.2b - Adattamento sensoriale a Z8-12:OAc, E8-12:OAc e	"	91
Z8-12:OH in seguito a prolungata esposizione ad		
un componente		
4.4.3b - Adattamento sensoriale a Z8-12:OAc, E8-12:OAc e	"	94
Z8-12:OH in seguito a prolungata esposizione		
a Z8-12:OAc ed a due miscele dei tre componenti		
4.4.4b - Risposte comportamentali dei maschi sottoposti	"	98
al trattamento Z8-12:OAc ed alle due miscele		
4.5b - Conclusioni		102
4.6b - Bibliografia	"	107

#### 1a.- PREMESSA

#### 1.1a - Meccanismi di comunicazione negli insetti

Le specie di insetti attualmente note sono il risultato di un lungo periodo evolutivo nel quale molteplici fattori (ambientali, climatici, etc.) ne hanno influenzato struttura e comportamento. Nel predetto processo i meccanismi di interazione esistenti tra insetti e piante hanno svolto un ruolo determinante. Il rapporto mutualistico tra mondo animale e vegetale consente ed assicura, a quest'ultimi, il perpetuarsi di un gran numero di specie vegetali, le quali godono dell'indispensabile trasporto del polline per fruttificare, e garantisce, ai primi, la sopravvivenza e lo sviluppo per la maggior parte degli insetti. Alcuni fitofagi si nutrono di una (monofagi) o poche piante (oligofagi), spesso appartenenti allo stesso taxon, mentre altri possono cibarsi di molte specie vegetali (polifagi). Si suppone che le specie monofaghe ed oligofaghe selezionano la pianta ospite in seguito alla percezione di miscele di sostanze volatili più o meno specifiche, che inducono l'alimentazione e l'ovideposizione. Negli insetti polifagi il tipo di sostanze chimiche presenti nella pianta dovrebbe avere minor influenza e, se presenti, gli attrattivi saranno generici e non specifici. La comunicazione sessuale è invece mediata da miscele di sostanze, meno spesso da un singolo composto, specie-specifiche (feromoni). Essi evocano risposte comportamentali su lunghe distanze (es. attivazione ed orientamento controvento) che consentono l'avvicinamento dei sessi e, successivamente, inducono una serie di risposte a corto raggio (es. atterraggio, battito alare, estroflessione dell'apice addominale e degli eventuali cremata) finalizzate alla copula. In specie affini i feromoni sessuali garantiscono l'isolamento riproduttivo. Negli insetti fitofagi deve essere presente, inoltre, un' intima correlazione tra feromoni sessuali e sostanze volatili presenti nella pianta ospite, con effetti sia sulla percezione che sul comportamento indotto da queste sostanze, essendo noto che quelle di origine vegetale possono influenzare il rilascio del feromone sessuale. Gli esapodi comunicano, al pari di tutti gli altri organismi viventi per le necessità riguardanti il nutrimento, la protezione dagli agenti esterni, i messaggi sociali, la dispersione della specie, attraverso sostanze chimiche, oltre a stimoli visivi, tattili e comportamentali (Law e Regnier, 1971). Negli insetti adulti la localizzazione della pianta ospite e del sesso opposto è, quindi, mediata dall'attività di vari sistemi sensoriali. Gli stimoli olfattivi, visivi e sonori svolgono un ruolo preminente nell'orientamento su lunghe distanze, mentre stimoli tattili e gustativi agiscono dopo che è stato stabilito il contatto. Sebbene questi processi siano regolati dalla complessa interazione tra i diversi stimoli, quelli chimici sembrano assumere un ruolo di primaria importanza. In altre parole, il sistema di comunicazione più utilizzato è quello mediato da semiochimici, ossia sostanze chimiche segnale. La sensibilità olfattiva dell'insetto verso gli odori è generalmente molto elevata e permette il riconoscimento dell'odore e di valutare la concentrazione e la provenienza del segnale olfattivo. Il segnale trasmesso dall'organismo emittente, influenzato da stimoli esterni od interni, per raggiungere i recettori dell'organismo ricevente necessita di un opportuno mezzo disperdente (aria o acqua). Alla percezione del segnale può seguire una risposta immediata (effetto releaser) o risposte fisiologiche che possono incidere su manifestazioni comportamentali (effetto primer) (Tremblay e Rotundo, 1980). Le sostanze chimiche che agiscono da messaggeri sono divise nelle due grandi categorie dei semiochimici "intraspecifici" e "interspecifici". La drastica riduzione degli agrofarmaci di sintesi chimica (69% dei formulati commerciali ritirati dal mercato) susseguente al Programma di revisione delle ss.aa. in attuazione della Direttiva 91/414 CEE e la maggiore sensibilizzazione dell'opinione pubblica nei confronti delle tematiche ambientali, ha spinto il mondo della ricerca a considerare soluzioni alternative all'uso degli agrofarmaci a salvaguardia della difesa delle produzioni agricole. Gli studi intrapresi, a livello mondiale, sono risultati pertanto necessari anche per il maggiore rispetto verso l'ambiente, la salvaguardia degli utilizzatori e dei consumatori. In linea generale quindi la tutela dell'ambiente e della salute dell'uomo sono i principi che hanno

ispirato lo sviluppo e la diffusione di strategie innovative ed ecosostenibili di controllo, quali, l'impiego in agricoltura dei semiochimici.

#### 1.1.1a - Semiochimici

Il termine semiochimici indica tutti i composti che intervengono nelle interazioni tra gli organismi viventi, nei quali possono indurre modificazioni soprattutto di carattere etologico, talvolta anche fisiologico o perfino anatomico (Masutti e Zangheri, 2001). Sono composti attivi a concentrazioni molto basse e sono generalmente classificati in feromoni ed allelochimici (Tab. 1); i primi agiscono a livello intraspecifico e favoriscono la comunicazione all'interno della specie, i secondi, invece, hanno azione interspecifica e mediano la comunicazione tra specie e regni diversi.

Tabella 1.- Messaggeri chimici negli insetti (semiochimici).

Feromoni	Allelochimici
(effetto intraspecifico)	(effetto interspecifico)
sessuali	allomoni
aggregazione	
dispersione	cairomoni
aggressione o allarme	
traccia	sinomoni

#### 1.1.2a - Semiochimici intraspecifici

I semiochimici intraspecifici sono sostanze che favoriscono la comunicazione tra individui appartenenti alla stessa specie, meglio note con il nome di feromoni. Il termine di derivazione greca (*pherein* - trasporto + *hormone* - stimolo) venne introdotto da Karlson e Butenandt (1959) per evitare confusione con gli ormoni. Una

sostanza feromonica può agire in contemporanea da messaggero chimico intraspecifico ed interspecifico ed attrarre non solo il partner ma anche i suoi parassitoidi o predatori, agendo in tal caso da cairomone. Ogni "blend" attrattivo si contraddistingue per composizione e concentrazione delle sostanze contenute ed è strettamente specie-specifico (Birch e Haynes, 1984). Nel 1977 Shorey suddivise i feromoni in funzione delle loro modalità di azione e, tra i più comuni, ricordiamo quelli di aggregazione, dispersione, aggressione, riconoscimento e, soprattutto, quelli sessuali.

I feromoni sessuali regolano l'accoppiamento, caratterizzato da una prima fase di localizzazione del partner, in cui agiscono attrattivi sessuali a distanza, ed un successivo step di corteggiamento, in cui entrano in gioco specifici feromoni con effetto ravvicinato. Il riconoscimento della specie è un processo molto importante, poiché non sarebbe vantaggioso disperdere energie e tempo nel conseguire un accoppiamento non conspecifico e, quindi, improduttivo. Pertanto, i segnali di riconoscimento sessuale devono essere altamente specifici. Per evitare che il corteggiamento possa avvenire tra individui appartenenti allo stesso sesso, alcuni insetti emettono anche feromoni di contatto. Questa efficace strategia di selezione è, ad esempio, adottata dai maschi di *Glossina morsitans* Westwood che, prima di iniziare il corteggiamento, si toccano con i tarsi. Se il contatto avviene tra due maschi si libera un feromone (astinone) che inibisce il corteggiamento (Birch e Haynes, 1984).

Da un punto di vista chimico i feromoni sessuali sono spesso miscele di alcoli, aldeidi ed esteri, che possono essere sintetizzati dalle femmine, come avviene nella maggior parte dei Lepidotteri notturni, o dai maschi, come si verifica, ad esempio, in *Ceratitis capitata* Wiedemann, o coinvolgere entrambi i sessi, in un vero e proprio "colloquio chimico", come accade in *Bactrocera oleae* (Rossi) (Celli e Maini, 1988).

I feromoni di aggregazione inducono individui conspecifici ad affluire ed a concentrarsi nei pressi della sorgente emettitrice. Negli Scolitidi, ad esempio, svolgono duplice funzione, in quanto, l'associazione in massa di individui sullo stesso albero consente al coleottero, da una parte, di superare alcuni meccanismi di difesa della pianta e dall'altra di favorire l'incontro tra i sessi e quindi accresce le probabilità di accoppiamento (Fig.I J) (Birch e Haynes, 1984).

I feromoni di dispersione, al contrario, limitano l'aggregazione e di conseguenza la competizione intraspecifica (Birch e Haynes, 1984); tra i maggiormente studiati ricordiamo quello della mosca americana delle mele *Rhagoletis pomonella* Walsh. Il dittero, in seguito all'ovideposizione, marca il frutto con un feromone al fine di impedire ad altre femmine l'utilizzo dello stesso e riducendo, in tal modo, la competizione tra le future larve per il substrato alimentare (Fig. I N).

I feromoni di aggressione o di allarme innescano la fuga ed altri comportamenti di difesa (Masutti e Zangheri, 2001). Negli Afidi sono emessi dai sifoni dorsali ed inducono fenomeni di dispersione, mentre, negli Imenotteri sociali sono emessi da ghiandole poste in corrispondenza del pungiglione, ed inducono il raggruppamento degli individui ed il manifestarsi di fenomeni di aggressività.

I feromoni traccia sono molto comuni tra gli insetti sociali, specialmente tra formiche e termiti, che li utilizzano soprattutto per marcare itinerari di foraggiamento o durante il trasferimento della colonia ad una nuova sede (Birch e Haynes, 1984). A differenza dei feromoni di allarme, che si diffondono rapidamente e con la stessa velocità evaporano, quelli traccia sono più stabili ed il messaggio persiste per un tempo maggiore.

#### 1.1.3a - Semiochimici interspecifici

I semiochimici interspecifici, noti con il termine di allelochimici, sono messaggeri chimici che consentono la comunicazione tra specie e regni diversi (vegetale ed animale) e comprendono allomoni, cairomoni, sinomoni, apneumoni ed antiferomoni.

Gli allomoni sono sostanze chimiche di tipo difensivo, più o meno volatili, che sollecitano l'allontanamento di altre specie a vantaggio di quella emittente (Tremblay, 1999) come i secreti delle cimici, l'acido formico delle formiche, il falso feromone di allarme di alcune specie di formiche schiaviste (es. *Formica subintegra* Emery e *F. pergandei* Emery) utilizzato per mettere in fuga dai loro nidi le operaie e rapirne larve e pupe (Regnier e Wilson, 1971) ed il secreto repellente che utilizzano alcuni Imenotteri Vespoidei al fine di impedire alle formiche di saccheggiare il proprio nido (Jeanne, 1970; Pardi e Turillazzi, 1985).

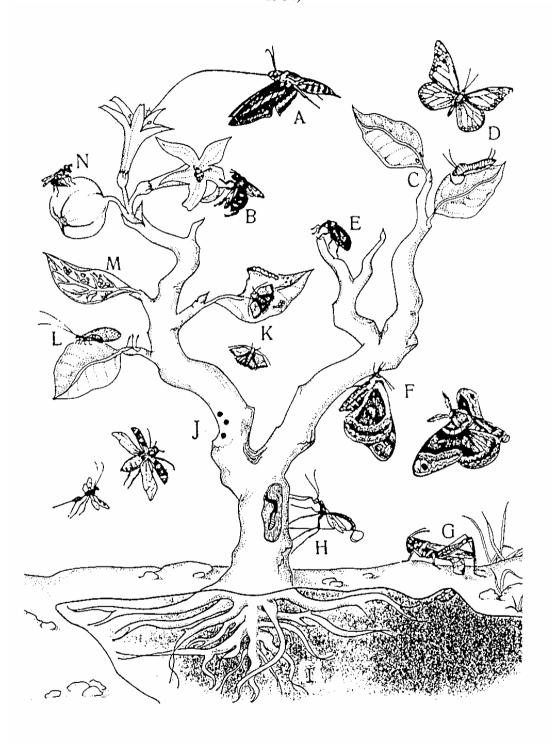
I cairomoni sono composti volatili favorevoli all'organismo che riceve il segnale, come ad esempio quelli emessi dalle piante e che risultano attrattivi per i fitofagi, la melata degli afidi che attira le crisope (Fig. I L), gli odori presenti sulle uova che richiamano i parassitoidi oofagi (Fig. I K) (Celli e Maini, 1988). Tra questi ultimi si può annoverare l'acido eptanoico emesso dalla larva della Tignola della patata *Phthorimaea operculella* Zeller, ed utilizzato dal suo parassitoide, l'Imenottero *Orgilus lepidus* Muesebeck, per localizzarla nelle gallerie scavate nei tuberi (Hendry *et al.*, 1973).

I sinomoni sono sostanze volatili utili sia all'organismo emittente che al ricevente; esempi sono l'odore emesso dai fiori che attira insetti pronubi (vantaggio per la pianta: fecondazione incrociata; vantaggio per l'insetto: nettare e polline) (Fig. I B) (Celli e Maini, 1988.) ed i composti volatili rilasciati da piante infestate che attirano i nemici naturali dei fitofagi. Foglie di pomodoro *Lycopersicon lycopersicum* (L.) Karsten ex. Farw e fagiolo *Phaseolus lunatus* L., rispettivamente infestate da *Liriomyza bryoniae* (Kaltenbach) e *L. sativae* (Blanchard), attirano rispettivamente i Braconidi *Dacnusa sibirica* Telenga (Dicke e Minkenberg, 1991) e *Opius dissitus* Muesebeck (Petitt *et al.*, 1992).

Gli apneumoni sono emessi da sostanze non viventi e svolgono funzione di messaggeri in specie sociali predatici o parassitoidi (Nordlund e Lewis, 1976).

Gli antiferomoni, infine, sono sostanze utilizzate per l'isolamento riproduttivo, in quanto sono in grado di inibire i maschi eterospecifici; anche in questo caso una sostanza può assumere diverse funzioni in base all'organismo ricevente.

Figura I.- Differenti ruoli dei semiochimici negli insetti (da Hagen *et al.*, 1984)



#### Figura I (didascalie)

- A Sfingide che si nutre di nettare.
- B Ape che sta visitando un fiore. Il fiore emette composti volatili (sinomoni), responsabili dell'attrazione del pronubo.
- C Nettári extrafiorali: si tratta di un esempio di coevoluzione tra insetti e piante. I nettári emettono sostanze volatili (sinomoni) che attirano e ricompensano predatori e parassitoidi, che proteggono la pianta dagli attacchi dei fitofagi.
- D Danaus plexippus L.: gli stadi larvali, nutrendosi di Euphorbiaceae, accumulano cardenolidi (allomoni), sostanze repellenti che verranno trasferite agli stadi seguenti di pupe e adulti, preservandole dai potenziali predatori.
- E Anthonomus sp. attratto dagli oli essenziali (cairomoni) emessi da piante di cotone. Il fatto che il  $\delta$  del Curculionide sia costretto a nutrirsi della pianta di cotone per attirare le  $\varsigma \varsigma$ , suggerisce la possibilità che uno o più costituenti della pianta vengano convertiti in feromoni sessuali.
- F Saturnide  $\mathcal{P}$  che attira un  $\mathcal{O}$  utilizzando un feromone sessuale che si origina da un idrocarburo volatile emesso dalla pianta ospite.
- G Ortottero nell'atto di ovideporre. L'ovideposizione avviene solo in caso di vegetazione rigogliosa e ricca di azoto.
- H Pseudorhyssa sternata Merril: ovidepone sfruttando il foro già praticato da Rhyssa persuasoria L. per paralizzare ed ovideporre su una larva di Siricide, individuandolo grazie a sostanze volatili prodotte da un fungo simbionte del Siricide ed altre rilasciate da R. persuasoria durante l'ovideposizione.
- I Anche le radici emettono composti (allomoni) che agiscono da deterrenti per gli insetti che vivono nel suolo.
- J I terpeni volatili emessi dalla pianta attirano alcuni Coleotteri Scolitidi (detti "pionieri") che, una volta penetrati nel tronco di un pino, emettono feromoni di aggregazione, che attirano altri ♂♂ e ♀♀ fino a che non viene raggiunta una certa densità. A quel punto, per evitare un sovraffollamento che sarebbe fatale, alcuni dei componenti della miscela fungono da deterrenti (allomoni), impedendo ad altri Scolitidi di colonizzare lo stesso substrato.
- K Ovatura di una farfalla. Alcune scaglie dell'insetto si depositano sulle uova e sulle foglie liberando idrocarburi (cairomoni), che vengono utilizzati dai parassitoidi oofagi per localizzare il proprio ospite. Durante la ricerca, i tricogrammi sfruttano anche i composti (cairomoni) emessi dalle feci delle larve e dalle aree fogliari erose.

- L Chrysoperla carnea Stephens localizza la melata degli afidi, di cui si nutre, grazie ai composti (cairomoni) in essa contenuti.
- M Colonia di afidi su una foglia, attratti dagli zuccheri di cui è ricca la pianta.
- N Dittero Tefritide nell'atto di ovideporre. Nel compiere questa operazione, l'insetto marca il frutto con un feromone, che funge da deterrente per le altre \$\pi\$\$ della sua specie e contemporaneamente da cairomone, segnalando la presenza dell'ospite ai suoi parassitoidi.

#### 2.1a - Interazioni pianta-insetto

Le piante rilasciano una moltitudine di caratteristici composti volatili che possono essere di ausilio ai fitofagi nella localizzazione della stessa. Il riconoscimento della pianta da parte di un insetto è mediato dalla presenza di determinati composti, molto spesso generici, dalla loro concentrazione e dai precisi rapporti tra le diverse sostanze. La sensibilità olfattiva degli insetti fitofagi si è comunque evoluta al fine di percepire alcune delle sostanze volatili della pianta. Il ruolo di questi odori consiste nell'orientare il fitofago verso la pianta adatta per l'alimentazione e l'ovideposizione.

L'insetto valuta continuamente le informazioni provenienti dall'ambiente circostante ed in funzione modula i suoi comportamenti. La scelta della pianta ospite avviene, attraverso la ricezione di informazioni esterne, in diversi stadi: orientamento, atterraggio, esplorazione, alimentazione ed ovideposizione (Schoonhoven, 1968; Visser, 1983). In ogni fase relativa alla selezione della pianta ospite, la composizione della miscela odorosa percepita dall'insetto subisce delle variazioni, solo in prossimità della pianta il blend si stabilizza assumendo un carattere definito.

Gli odori emessi dalle piante si dividono in generali e specifici. I primi si originano per biosintesi con produzione di alcoli, aldeidi e derivati di acidi grassi insaturi (odori generali della foglia) (Visser, 1979); per fermentazione si può ottenere etanolo ed etilacetato e per polimerizzazione isopentilpirofosfato e terpeni (Luckner,

1972). I derivati della fermentazione attraggono varie specie di *Drosophila* (Hoffman e Parsons, 1984) ed alcune specie di Scolitidi, Cerambicidi e Cleridi (Montgomery e Wargo, 1983). I terpeni ed i derivati presenti nelle resine delle conifere attraggono un gran numero di insetti dannosi alle foreste ma anche viventi a carico delle Angiosperme; ciò indica che tali composti sono diffusi in quasi tutte le piante. Alcoli, aldeidi e derivati della foglia hanno attività su vari insetti. Tali composti, detti "odori della foglia verde" (GLVs), hanno manifestato la loro azione su un gran numero di insetti, tra i quali *Leptinotarsa decemlineata* (Say), *Psila rosae* Fabricius, *Rhagoletis pomonella* Walsh, *Mamestra brassicae* L., *Anthonomus grandis* Boheman, *Ceratitis capitata* Wiedemann, *Cydia pomonella* (L.), *Plutella xilostella* L. (Reddy e Guerriero, 2000).

Gli odori specifici derivano dalla scissione di prodotti secondari della pianta. Dai glucosinolati (contenuti nelle Crucifere ed altre famiglie minori) si forma isotiocianato (p.a. di alcuni formulati chimici preposti alla disinfestazione del terreno) (Finch, 1980; Luckner, 1972), dalla S-propenilcisteina (cipolla) i solfuri (Luckner, 1972) e dalla prunasina (*Prunus padus* L.) la benzaldeide (Luckner, 1972; Petterson, 1970). In particolare i glucosinolati in presenza di acqua e dell'enzima endogeno mirosinasi, si idrolizzano originando composti biologicamente attivi quali isotiocianati, nitrili, epitonitrili e tiocianati (Fahey *et al.*, 2001).

Gli odori possono avere affetto anche sulla larva. L'adulto e la larva di *Drosophila melanogaster* Meigen sono attratte dalla medesima sostanza (Rodrigues, 1980). Le larve di *Delia antiqua* Meigen sono attirate da un ampio gruppo di sostanze solforate; gli adulti da un numero più limitato delle stesse sostanze (Matsumoto e Thorsteinson, 1968; Soni e Finch, 1979).

Le sostanze chimiche vegetali attive sugli insetti, in base alle risposte indotte, permettono la differenziazione delle piante in attrattive e repellenti. In genere, le sostanze prodotte dalle piante agiscono da cairomoni, sinomoni ed allomoni. Tra le piante arboree attrattive per gli insetti sono da ricordare le specie appartenenti al

genere *Quercus* L.. Le foglie emettono (*E*)-2-esenale, che stimola le femmine di *Antherea polyphemus* Cramer ad emettere il loro attrattivo sessuale (Riddiford, 1967).

Diverse cultivar di melo e pero contengono nell'epicarpo α-farnesene, che attira le giovani larve di *Cydia pomonella* L. (Sutherland e Hutchins, 1973) e stimola l'ovideposizione nelle femmine adulte. Tra le sostanze volatili emesse dai frutti maturi di melo e pero è stato, inoltre, identificato l'ethyl (2*E*,4*Z*)-2,4-decadienoato quale sostanza ad elevata attività cairomonale (Light *et al.*, 2001). Tale sostanza, comunemente definita "odore di pera", oltre che determinare una risposta altamente specifica, si è dimostrata attrattiva sia per gli adulti che per le larve di carpocapsa (*C. pomonella*) (Knight e Light, 2001). Il cotone emette cariofillene che, attirando gli adulti del predatore *Chrysopa carnea* Stephens, si comporta da sinomone (Flint *et al.*, 1979).

L'olio estratto dalle radici di *Acorus calamus* L. contiene alcuni principi attivi in grado di attrarre diversi insetti (Jacobson *et al.*, 1976); in particolare il β-asarone attira il maschio della mosca orientale della frutta, l'acoragermacrone la femmina della mosca del melone (*Dacus cucurbitae* Coquillett) e l'asarilaldeide il maschio e la femmina della mosca mediterranea della frutta (*C. capitata*). Molte piante emettono fenilacetaldeide, che attrae parecchi insetti fra cui *Spodoptera frugiperda* Smith e *Ostrinia nubilalis* Hübner (Cantelo e Jacobson, 1979).

Le piante repellenti, producendo sostanze ad azione sgradevole, realizzano un effetto del tipo insettifugo o antiovideponente. Foglie e fiori di *Tagetes minuta* L. contengono (*E*)-5-ocimenone, repellente sulle larve di *Aedes aegypti* L. (Maradufu *et al.*, 1978). La presenza di linalolo ad alte concentrazioni evita la deposizione di uova da parte del dittero tropicale *Anastrepha suspensa* L. in pompelmi acerbi ed arance. Il pomodoro e la cipolla hanno rispettivamente effetto repellente su *Pieris brassicae* L. e *Psila rosae* Fabricius (Tremblay, 1982).

#### 2.1.1a - Metaboliti secondari delle piante e loro ruolo nella comunicazione

Le piante danneggiate meccanicamente o da un insetto producono composti chimici volatili diversi per quantità e qualità da quelli prodotti da piante integre. I composti emessi sembrano essere legati al fitofago (specie, stadio di sviluppo) ed alla pianta (specie, genotipo, età), sebbene anche gli stress ambientali possano determinare variazioni nella composizione delle sostanze coinvolte nel meccanismo di difesa indiretta, in quanto in grado di attirare predatori e parassitoidi e indurre risposte di difesa nelle piante sane in prossimità di quelle infestate influenzando così il comportamento dei fitofagi. Le piante di grano non infestate da afidi, per esempio, attirano tali emitteri, mentre quelle già attaccate rilasciano una miscela di composti ad azione repellente verso altri afidi (Quiroz et al., 1997). Oltre a rendere un substrato vegetale appetibile o repellente per un fitofago, le sostanze emesse dalla pianta, in seguito ad un danno provocato da un insetto, possono interferire nelle interazioni tra piante e terzo livello trofico, consentendo ai parassitoidi ed ai predatori di distinguere le piante infestate da quelle indenni. È stato al riguardo dimostrato che piante di mais e cotone infestate da larve di lepidotteri rilasciano composti che attirano i parassitoidi (Tumlinson et al., 1993). Piante anche appartenenti a famiglie vegetali differenti possono emettere miscele chimiche simili; ciò permette di ipotizzare che, nel corso delle infestazioni, siano attivate vie biosintetiche comuni e che i prodotti possano essere percepiti da un ampio spettro di entomofagi. La capacità di questi ultimi di distinguere i segnali emessi dalle piante da quelli comunemente presenti nell'ambiente, indica che le piante danneggiate dai fitofagi emettono composti chimici che sono chiaramente distinguibili da quelli diffusi in risposta ad altri tipi di danno o da quelli rilasciati da piante non lese. La capacità del vegetale di differenziare le proprie emissioni in seguito al tipo di danno subito potrebbe essere legata alla presenza di induttori associati all'attività di nutrizione dell'insetto, assenti quando la foglia subisce un danno generico (Paré e Tumlinson, 1999).

#### 2.1.2a - Composti volatili emessi dalle piante in seguito ad un danno

Le piante sono caratterizzate dalla presenza di metaboliti volatili emessi dalla superficie fogliare e/o da siti specifici localizzati all'interno della foglia, in cui tali sostanze si accumulano. Queste riserve chimiche costitutive, rappresentate spesso da monoterpeni, sesquiterpeni e composti aromatici (Fig. II), sono compartimentalizzate in quantità considerevoli all'interno di strutture specializzate quali ghiandole o tricomi (Paré e Tumlinson, 1997a).

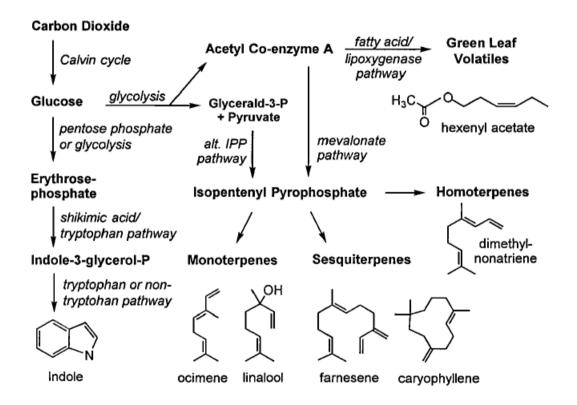


Figura II.- Vie biosintetiche che conducono al rilascio nelle piante dei composti volatili (da Paré e Tumlinson, 1999).

L'indolo rappresenta il precursore di una famiglia di composti di difesa contenenti azoto e si forma a partire dall'indolo-3-glicerol-fosfato attraverso la via

biosintetica dell'acido scichimico (Frey et al., 1997). Sia i sesquiterpeni che i monoterpeni sono sintetizzati a partire dall'isopentenil pirofosfato. La sintesi dei sesquiterpeni avviene nel citosol attraverso la via del mevalonato, mentre i monoterpeni sono sintetizzati a livello dei plastidi attraverso una via alternativa che coinvolge la gliceraldeide-3-fosfato ed il piruvato (Lichtenthaler et al., 1997). L'omoterpene (E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatriene si forma a partire dal farnesil pirofosfato, attraverso una serie di reazioni enzimatiche che complessivamente alla perdita di unità a quattro atomi di carbonio (Donath e Boland, 1994). I "green leaf volatiles" si formano a partire da un derivato dell'acido linolenico, ovvero dall'acido 13-idroperossilinolenico, che viene scisso in due frammenti, rispettivamente di 12 e di 6 atomi di carbonio. Dal frammento a 6 atomi di carbonio (3-esanale) derivano, attraverso numerosi riarrangiamenti, la vasta serie di composti denominati "green leaf volatiles".

Oltre a queste riserve, è presente un altro insieme di composti, noti come "green-leaf volatiles", che include alcoli saturi ed insaturi a sei atomi di carbonio, aldeidi ed esteri, prodotti attraverso la rottura dei lipidi di membrana (Fig. II) e rilasciati dalla foglia in seguito ad un danno meccanico. Il danno causato dai fitofagi attraverso l'attività di nutrizione provoca, a livello delle parti di piante danneggiate, il rilascio di numerosi composti chimici volatili, che rendono i profili gas cromatografici di queste piante differenti da quelli di piante indenni o che hanno subito un danno meccanico. Nel cotone, ad esempio, la rottura di particolari strutture presenti nelle foglie genera il rilascio dei terpeni immagazzinati ed aumenta l'emissione dei composti prodotti attraverso la via della lipossigenasi (GLVs). Mentre il rilascio di questi metaboliti risulta strettamente correlato al danno arrecato dall'insetto alla foglia (Loughrin *et al.*, 1994), l'emissione di un sottoinsieme di terpeni (linalolo, β-ocimene, α-farnesene, β-farnesene, nonatriene, tridecatetraene), dell'indolo (un composto contenente azoto) e dell'acetato di 3-esenile è regolata prevalentemente dal fotoperiodo, con bassi livelli durante la notte e livelli elevati

durante il periodo di massima fotosintesi, sebbene il danno compiuto dall'insetto possa incrementarne l'emissione. Alcuni ricercatori (Paré e Tumlinson, 1997b) sostengono che i composti rilasciati in quantità maggiore durante il giorno, soprattutto conseguentemente al danno compiuto dall'insetto, non siano immagazzinati nella pianta ma sintetizzati nuovamente, seguendo vie biosintetiche che risultano connesse strettamente al processo fotosintetico. Il periodo di tempo che intercorre tra l'inizio del danno ed il momento in cui i composti indotti cominciano ad essere emessi, conferma l'ipotesi che per sintetizzarli sia necessaria una serie di reazioni biochimiche, che include anche l'espressione di geni, l'assemblamento di proteine e/o l'attivazione di enzimi.

#### 2a - CAPITOLO I

#### **RIASSUNTO**

Dryocosmus kuriphilus è uno dei principali fitofagi per Castanea spp. Indagini comportamentali, chimiche ed elettrofisiologiche sono state eseguite al fine di determinare il ruolo dei volatili della pianta nella localizzazione dell'ospite da parte del cinipide telitoco. Biosaggi in olfattometro ad Y hanno mostrato che gli adulti sono significativamente attratti da materiale vegetale di C. sativa dopo un'ora dal loro lesionamento. Gli odori emessi da piantine, rametti intatti e rametti con un danno meccanico recente non sono risultati attrattivi. Il materiale vegetale della pianta non ospite Prunus laurocerasus ha un'azione repellente sul cinipide. Sono stati identificati quattordici componenti, principalmente green leaf volatiles, nello spazio di testa della pianta ospite tramite gas cromatografia abbinata a spettrometria di massa. Tutte le sostanze stimolano risposte EAG dose-dipendenti negli adulti.

Una miscela sintetica comprendente tutti i composti identificati negli stessi rapporti che si ritrovano nella pianta ospite induce risposte significativamente positive nei biosaggi in olfattometro ad Y. Il presente studio fornisce informazioni preliminari per l'identificazione degli attrattivi della pianta ospite di *D. kuriphilus* che potrebbe contribuire a sviluppare un sistema di controllo e di monitoraggio basato sull'utilizzo di semiochimici.

#### **ABSTRACT**

Dryocosmus kuriphilus is one of the most damaging pests of Castanea spp. Behavioral, chemical, and electrophysiological investigations were employed to examine the role of plant volatiles for host location by this thelytokuos cynipid. Y-tube olfactometer bioassays showed that adult wasps are significantly attracted by C. sativa twigs with at least 1-hr-old mechanical damage. Odors of undamaged host seedlings, intact twigs, and twigs with a fresh mechanical damage were not attractive. Wasps were repelled by plant materials of the non-host Prunus laurocerasus. Fourteen compounds, mainly general green leaf volatiles, were identified in the head-space of attractive host plant twigs by gas chromatography coupled to mass spectrometry. All compounds elicited dose-dependent antennal responses in adult wasps. A synthetic blend comprising all identified compounds in the same ratio as in the attractive host source induced significant positive responses in Y-tube olfactometer bioassays. The study gives a basis for future identification of host plant attractants that could contribute to semiochemical-based monitoring and management practices of this pest.

#### 2.2a - Introduzione

Molte sostanze volatili emesse dalle piante sono utilizzate dagli insetti fitofagi come messaggeri chimici (semiochimici) per localizzare i siti di alimentazione, di accoppiamento e di ovideposizione (Visser, 1986; Agelopulos *et al.*, 1999). Diversi studi suggeriscono, inoltre, che la localizzazione di tali substrati è spesso mediata da miscele di sostanze secondo rapporti ben definiti e caratteristici della pianta ospite (Bruce *et al.*, 2005). L'identificazione dei semiochimici interspecifici coinvolti nelle interazioni tra fitofagi e piante ospiti riveste non solo interesse ecologico ma anche pratico; sostanze in grado di modificare il comportamento degli insetti, infatti, sono potenzialmente utilizzabili per la messa a punto di strategie innovative ed ecosostenibili di controllo.

Dryocosmus kuriphilus Yasumatsu, 1951 (Hymenoptera, Cynipidae) è tra i principali fitofagi di Castanea spp. (Abe et al., 2007) e risulta attualmente diffuso nei principali areali di coltivazione del castagno in Italia. La specie è monovoltina e caratterizzata da partenogenesi telitoca (Zhu et al., 2007). L'efficacia del controllo chimico del fitofago è limitata dallo sviluppo endofitico degli stadi preimmaginali, dal ruolo di serbatoio di infestazione svolto dai castagneti cedui, spesso presenti in prossimità di quelli da frutto, e dai problemi legati all'esecuzione dei trattamenti su piante di elevate dimensioni e/o ubicate in terreni acclivi. L'identificazione di attrattivi specifici per D. kuriphilus potrebbe fornire un valido strumento di monitoraggio da utilizzare per programmare interventi tempestivi di lotta. A tal fine la ricerca di semiochimici coinvolti nel processo di localizzazione dell'ospite assume un ruolo di primaria importanza, in quanto lo sviluppo partenogenetico della specie esclude l'esistenza di un feromone sessuale. Le interazioni tra cinipidi galligeni e piante ospiti sono caratterizzate da un elevato grado di specificità (Ronquist e Liljeblad, 2001; Stone et al., 2002). Le comunità di cinipidi che vivono sulle diverse specie del genere Quercus variano in modo significativo con le caratteristiche chimiche della pianta ospite (Abrahamson et al., 2003). Le diverse fasi del processo di formazione della galla sono controllate dalle secrezioni larvali (Stone e Schönrogge, 2003) attraverso le quali i cinipidi manipolano i tessuti dell'ospite al fine di renderli più idonei a soddisfare i propri fabbisogni nutritivi e di protezione dai vari antagonisti (Allison e Schultz, 2005). I cinipidi galligeni depongono le uova in specifici tessuti dell'ospite ed in un determinato stadio di sviluppo dimostrando un'elevata capacità di selezionare il substrato. Tuttavia, in tali interazioni, il ruolo svolto dai composti volatili della pianta ospite è ancora poco noto.

In *Antistrophus rufus* Gillette (Hymenoptera, Cynipidae), specie a sessi distinti, è stato dimostrato che il processo di maturazione della galla porta alla formazione di specifici composti volatili che sono utilizzati dal maschio proterandro per localizzare il sito di emergenza della femmina (Tooker *et al.*, 2002; Tooker e Hanks, 2004). In saggi olfattometrici, una miscela di -pinene, (-)-camphene, -pinene e (+)-limonene è risultata attrattiva verso femmine ovideponenti della stessa specie, indicando un loro probabile coinvolgimento nella localizzazione del sito di ovideposizione (Tooker *et al.*, 2005). Saggi elettro antennografici hanno dimostrato che il sistema olfattivo degli adulti di *D. kuriphilus* è in grado di percepire un'ampia varietà di composti volatili (Germinara *et al.*, 2009a) emessi dalle foglie di *Castanea sativa* Miller (Rotundo *et al.*, 1987).

Il presente studio è stato indirizzato ad una migliore comprensione del ruolo dei composti volatili nelle interazioni tra *D. kuriphilus* e *C. sativa*.

#### 2.2.1a - Il Cinipide del castagno: origine e diffusione

Il Cinipide galligeno del castagno è specie infeudata a *Castanea* spp., segnalata in Italia sia su castagno europeo (selvatico od innestato), sia su ibridi eurogiapponesi. La specie è originaria della Cina ed è stata poi introdotta accidentalmente in Giappone (1951), Corea (1958), Stati Uniti (Georgia, 1974) e Nepal (1999) (Abe *et al.*, 2007), successivamente anche in Nord Italia (Brussino *et al.*, 2002) e nel centro Italia (Paparatti e Speranza, 2005) (Fig. III).

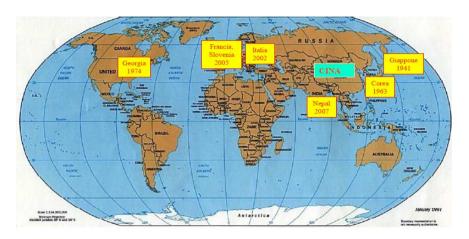


Figura III.- Distribuzione mondiale di D. kuriphilus

Dalla prima segnalazione in un'area pedemontana a sud di Cuneo (Melika *et al.*, 2004), l'Imenottero si è diffuso con grande rapidità in tutte le regioni castanicole della penisola. La diffusione dell'insetto avviene tramite volo diretto delle femmine (diffusione attiva) oppure tramite gli scambi commerciali di materiale di propagazione (marze ed innesti) infestato (diffusione passiva). Quest'ultima è senza dubbio la via di diffusione più comune e pericolosa, poiché determina l'introduzione del cinipide in aree esenti, anche a lunghe distanze (Rieske, 2007). L'introduzione di insetti esotici causa in genere notevoli problemi per la difesa delle piante attaccate a causa dell'assenza dei limitatori naturali nel nuovo ambiente colonizzato (Melika *et al.*, 2004); situazione resa ancora più grave dalla mancanza di ss.aa. registrate.

#### 2.2.2a - Tassonomia e Morfologia

D. kuriphilus è un Imenottero appartenente alla famiglia Cynipidae. La famiglia prende il nome dal latino tardo sciniphe(n), derivato dal greco sknîphes, plurale di skníps "insetto roditore", a sua volta derivato da skníptein "pungere, pizzicare" (di etimologia incerta). Più o meno equivalente a skníps è kníps, usato nel

senso di formica oppure di bruco che infesta le piante; knips sembra possa derivare da knips e grattare, grattugiare, raschiare, solleticare.

La posizione tassonomica è la seguente:

Ordine Hymenoptera

Sottordine Apocrita

Superfamiglia Cynipoidea

Famiglia Cynipidae

Genere Dryocosmus

Specie Dryocosmus kuriphilus

D. kuriphilus durante il suo ciclo di sviluppo attraversa 4 stadi (uovo, larva, pupa ed adulto).

#### 2.2.3a - Uovo

Le uova, ialine e piriformi, sono provviste di un lungo peduncolo e sono disposte in gruppo in prossimità dell'apice vegetativo all'interno delle gemme. Circa 30-40 giorni dopo la deposizione si ha il completamento dello sviluppo embrionale e, con la schiusura, il passaggio allo stadio larvale. I segni dei fori di ovideposizione sulle gemme tendono a scomparire nel corso dell'estate, e le relative osservazioni, pur se accurate, non lasciano supporre la presenza delle prime età larvali al loro interno.

#### 2.2.4a - Larva

Le larve apode ed anoftalme a maturità si presentano di colore bianco e raggiungono la lunghezza di circa 2,5 mm. Le larve sono caratterizzate da uno

sviluppo molto lento, svernano all'interno della gemme senza che queste presentino alterazioni evidenti (infestazione asintomatica).

#### 2.2.5a - Pupa

Le pupe, della lunghezza media di 2,5 mm, si presentano di colore bianco nelle prime fasi di sviluppo e bruno scuro o nere a maturità.

#### 2.2.6a - Adulto

Le femmine, lunghe circa 2,5-3,0 mm, presentano una colorazione nera a carico del torace e dell'addome, gli arti color ocra (ad eccezione dell'ultimo segmento tarsale bruno scuro), le antenne composte da 14 segmenti (di cui i primi tre ocracei, mentre i successivi di colore bruno progressivamente più scuro verso l'apice antennale), le ali anteriori con nervature poco evidenti. L'addome, grande e tondeggiante, è provvisto di un ovopositore filiforme tramite cui le femmine inseriscono le uova all'interno delle gemme.

In fase di riposo la terebra è scarsamente visibile in quanto retratta all'interno dell'addome.

#### 2.2.7a - Biologia e comportamento

La formazione di cecidi o galle, escrescenze ben localizzate e determinate, costituite da tessuti di natura ipertrofica o iperplastica, che si sviluppano in un organo vegetale come reazione patologica allo stimolo esercitatovi da un elemento parassita, il quale se ne serve come dimora durante il periodo di sviluppo, traendone anche alimento.

D. kuriphilus è una specie monofaga che presenta una sola generazione annua ed è caratterizzata da una forma di riproduzione a partenogenesi telitoca: i maschi, quindi, risultano assenti e dalle uova emergono solo femmine.

Le femmine fuoriescono dalle galle (fine giugno inizio luglio) già sessualmente mature e pronte a deporre le uova all'interno di una singola gemma. Ciascuna femmina può deporre dalle 100 alle 150 uova, per cui il potenziale riproduttivo di questa specie risulta molto elevato.

Dopo circa 40 giorni dalla deposizione delle uova si ha la schiusura. In primavera si manifestano le galle, dapprima di colore verde e successivamente rossastro, che si sviluppano in 7-14 giorni ed hanno un diametro variabile da 0,5 a 2-3 cm. Queste, a seconda delle dimensioni, possono ospitare da 1 ad 8 cellette al cui interno si sviluppa la larva che attraversa le successive età che la portano a maturazione.

A volte le galle sono confinate sulle foglie lungo la nervatura centrale, ma spesso la loro formazione può interessare i germogli, inglobando una parte delle giovani foglie e delle infiorescenze, causando il blocco dello sviluppo vegetativo dei getti colpiti ed una riduzione della fruttificazione del 60-80% (anche se si possono registrare variazioni notevoli in funzione della cultivar considerata) per la mancata produzione dei fiori femminili e degli amenti maschili. Le galle formatesi sui germogli disseccano progressivamente nel corso dell'estate e dell'autunno e possono persistere sugli alberi anche negli anni successivi.

Il decorso del ciclo biologico è influenzato da fattori climatici, legati ad esempio all'altitudine ed all'esposizione degli impianti, nonché alla diversa precocità vegetativa delle varietà coltivate.

I *Cynipidae* costituiscono una famiglia di Imenotteri i cui membri provocano, a carico delle piante, la formazione di cecidi o galle, escrescenze ben localizzate e determinate, costituite da tessuti di natura ipertrofica o iperplastica, che si sviluppano in un organo vegetale come reazione patologica allo stimolo esercitatovi da un elemento parassita, il quale se ne serve come dimora durante il periodo di sviluppo, traendone anche alimento.

#### 2.2.8a - Il castagno: generalità e inquadramento sistematico

Il castagno appartiene all'ordine Fagales, famiglia Fagaceae, genere Castanea ed il nome specifico "sativa" fa riferimento al fatto che la pianta è oggetto di coltivazione. Questa specie comprende una dozzina di specie arbustive ed arboree: queste ultime hanno il fusto prevalentemente ramificato a breve altezza e chioma globosa; le foglie sono semplici, decidue, grandi, allungate, dentate, stipolate, con picciolo molto corto; i rami dell'anno sono di norma bruni, glabri e tormentosi; tutte le specie hanno ramificazione simpodiale; le gemme laterali hanno 2-3 perule visibili; le cicatrici fogliari sono semicircolari. Sono piante monoiche con fiori riuniti in amenti eretti, maschili o misti, che compaiono a foliazione avvenuta. L'impollinazione è essenzialmente anemofila ma la presenza di nettari e l'odore penetrante dei fiori maschili fa si che siano assiduamente visitati da numerosi insetti quali api (è infatti molto noto il miele di castagno), coleotteri, ditteri e così via. Tuttavia, non si tratta di un'impollinazione strettamente insetto-dipendente nel senso stretto del termine, in quanto gli insetti visitano solo i fiori maschili essendo quelli femminili privi o quasi di elementi attrattivi; il contatto con quest'ultimi è quindi del tutto casuale. I fiori maschili sono riuniti in numerosi glomeruli di 3-7 fiori lungo l'asse dell'amento; ciascun fiore è costituito da un calice marcatamente esalobato con 6-20 stami provvisti di un lungo e sottile filamento; può essere presente un ovario rudimentale. I fiori femminili sono riuniti in gruppi di 1-3 e sono portati alla base di amenti misti; essi sono racchiusi completamente in un involucro subsferico (la cupola) provvisto di spine ramificate e brattee squamiformi; solo gli stili rimangono esterni alla cupola; ciascun fiore ha un perianzio con 6-8 lobi, fuso con l'ovario che è 6-9 loculare; gli stili sono circa 8 ed occasionalmente può esservi qualche stame abortito. Il frutto, singolo o a gruppi di 2-3, è una noce arrotondata, edule, marrone lucente, racchiusa completamente in una cupola 2-4 valvata, spinosa (il riccio). Il legno delle specie delle regioni temperate è a porosità anulare. La specie più significativa in Europa è il castagno europeo C. sativa.

E' un albero molto longevo (può superare agevolmente i 500 anni) (Fig. IV), di portamento maestoso; è alto in media una ventina di metri ma può raggiungere anche i 30-35 m di altezza e soprattutto può arrivare a diametri eccezionali di 4-6 m. Il fusto è dritto e massiccio, si ramifica presto e la chioma diviene ampia e rotondeggiante. La corteccia è dapprima liscia e di colore grigio olivastro con tracce delle lenticelle che persistono a lungo raggiungendo un'ampiezza anche di 1 cm; dopo 20-25 anni inizia a fessurarsi formando un ritidoma grigio bruno, con cordoni longitudinali lievemente spiralati, grossi, rilevati e molto allungati.



Figura IV.- Albero di Castanea sativa e particolari

Le foglie sono semplici, alterne, caduche e spiralate, ma apparentemente distiche per torsione del picciolo; sono lunghe 12-20 (25) cm, larghe 3-6 cm, con nervature nettamente rilevate e consistenza coriacea; sono di colore verde intenso sulla pagina superiore mentre è più chiara quella inferiore; la forma è ellittico-

lanceolata con la base rotondato-cuneata; il margine è dentato-crenato, l'apice è brevemente acuminato. Foliazione e fioritura sono tardive; la prima avviene fra la fine di aprile e maggio mentre la seconda va dalla fine di giugno alla metà di luglio. Specie monoica, il castagno ha infiorescenze ad amento miste o esclusivamente maschili; i due tipi differiscono per la struttura, l'ordine della comparsa, l'ontogenesi dell'infiorescenza e del fiore. Le infiorescenze maschili sono costituite da fiori maschili riuniti in cime o glomeruli ascellari di diversi fiori ciascuno; il numero medio delle cime è di 40 per amento. Queste infiorescenze si trovano alla base del ramo dell'anno, sono erette e lunghe 5-15 cm. Il fiore maschile ha un perianzio esamero e 8-12 stami più o meno lunghi e sottili. Le infiorescenze miste sono più brevi, più complesse e sono posizionate verso l'apice del ramo; sono costituite da circa 20 cime ascellari: alla base dell'infiorescenza vi sono 1-4 cime ascellari femminili; le successive sono formate da fiori maschili (3-7 per cima) ma quelle apicali ne hanno soltanto due. I fiori femminili hanno un perianzio anch'esso esamero e tormentoso, l'ovario è infero con 6-9 carpelli e altrettanti stili, rigidi e pelosi alla base. Dopo la fecondazione la cupola squamosa diventa il riccio vero e proprio. Il differenziamento delle infiorescenze ha inizio già 30-40 giorni dopo la ripresa vegetativa, cioè verso la fine della primavera o all'inizio dell'estate dell'anno precedente; la loro fioritura e questo processo continua durante i mesi estivi. Nella sua ontogenesi il fiore del castagno è in un primo momento normalmente bisessuale ma, successivamente, nei fiori maschili lo sviluppo dell'ovario si arresta mentre non giungono a maturità gli stami dei fiori femminili; il rapporto tra infiorescenze maschili e miste varia da individuo ad individuo e si modifica nel tempo. Il castagno è una specie con elevato grado di sterilità (androsterilità per anomalie staminali) e di autoincompatibilità (soprattutto gametofitica). Il riccio, dapprima verde, poi bruno giallastro e subsferico, è fortemente spinoso ed ha un diametro variabile che può arrivare anche a 10 cm. Inizialmente presenta un colore verde, poi giallastro in prossimità della maturazione quando, aprendosi in 2-4 valve, permette la fuoriuscita delle castagne. I frutti, mai separati da setti interni all'involucro, sono acheni contenuti nel riccio in numero di 2-3 e a volte anche più; hanno pericarpo liscio e coriaceo, bruno scuro omogeneo (striato nei marroni) ornato alla base da una cicatrice chiara (ilo) ed all'apice dai resti degli stili; l'interno è fortemente pubescente. I cotiledoni, bianco avorio, sono molto grandi e sono protetti da una sottile pellicola membranacea (episperma). Il frutto è tendenzialmente deiscente ma molti ricci possono cadere interi e rimanere a lungo chiusi; l'achenio è ricercato come frutto edule. Le castagne presenti in un riccio, in relazione al loro numero, possono assumere forme diverse. Se ne è presente una sola questa è globosa, mentre se ve ne sono due queste saranno appiattite dal lato di contatto e globose da quello opposto. Se è presente un terzo frutto questo sarà appiattito da ambedue i lati e di scarso interesse dal punto di vista commerciale. La fioritura inizia intorno ai 10 anni per le piante nate da seme; quelle innestate iniziano più precocemente la loro fruttificazione; nei primi anni la produzione è scarsa, in quanto la pianta non si è ancora sviluppata adeguatamente per sopportare buone produzioni. In genere, tra fioritura e maturazione nel castagno intercorrono dai 75 ai 120 giorni.

I frutti più precoci iniziano a cadere ai primi di settembre mentre i più tardivi maturano verso i primi di novembre. In Italia il castagno vegeta in tutto il piano medio-montano dell'Appennino e delle isole e nel piano basale delle Prealpi e delle Alpi; è ovviamente la specie "guida" della zona fitoclimatica del *Castanetum*. La sua diffusione è limitata dalle basse temperature e dalla siccità: ogni mutamento del clima in senso oceanico o temperato-umido ha agevolato la diffusione del castagno mentre ogni modificazione verso l'aridità e la continentalità ha ristretto questa espansione. E' specie moderatamente termofila, tipicamente mesofita nei riguardi della temperatura e dell'umidità relativa, moderatamente eliofila, sensibile alle gelate tardive, esigente in terreni molto sciolti, profondi, leggeri, freschi e ricchi in potassio e fosforo; il castagno è considerato una specie calcifuga in quanto rifugge dai suoi ricchi di calcio disponibile. E' infatti una tipica coltura da suoli acidi e subacidi (pH

tra 4,5 e 6,8), che può dare tuttavia anche ottimi risultati su suoli carbonatici; inoltre, esige terreni fertili per una buona crescita ed una buona produzione di frutti. Al fine di conseguire risultati tecnico-economici positivi è indispensabile coltivare il castagno in ambienti che rispettino le sue specifiche esigenze pedoclimatiche ed in condizioni che permettano di applicare in modo razionale adeguate tecniche colturali. Il castagno è coltivato tra i 200 ed i 1200 m s.l.m. e preferisce ambienti caratterizzati da temperature medie annue comprese tra gli 8 ed i 15°C. La coltura predilige ambienti con precipitazioni in genere superiori ai 600-700 mm/anno, distribuite in modo uniforme durante tutta la stagione vegetativa (Nicese e Ferrini, 1999). Durante la fioritura e la fecondazione sono importanti il fattore termico e la pioggia, in quanto per la germinazione del polline sono necessarie temperature di 27-30°C (Solignat, 1958). In queste fasi sono dannose le piogge prolungate che ostacolano il trasporto del polline, riducono l'allegagione ed aumentano l'incidenza del vuoto (guscioni) (Bolvansky, 1989).

#### 3.3a - Materiali e Metodi

#### 3.3.1a - Insetti

Galle contenenti stadi preimmaginali di *D. kuriphilus*, sono state raccolte nei mesi di giugno e luglio in un castagneto da frutto fortemente infestato, ubicato in provincia di Avellino (Campania, Italia). Le galle sono state conservate in gabbie alla temperatura di  $25 \pm 2$ °C, umidità relativa di  $55 \pm 5$ % ed in condizioni di luce naturale.

Gli adulti sfarfallati sono stati collezionati quotidianamente ed isolati individualmente in provette di vetro (Ø 2 cm x 8 cm) chiuse da una rete a maglia stretta (1 mm). Gli individui isolati sono stati utilizzati dopo almeno 12 ore in saggi elettrofisiologici e comportamentali.

#### 3.3.2a - Piante

Nelle prove comportamentali condotte su *D. kuriphilus* è stata utilizzata la pianta ospite *C. sativa* e la pianta non ospite *Prunus laurocerasus* L. (Rosales, Rosaceae). I rami di lauroceraso, di circa un metro di lunghezza, sono stati asportati da piante cresciute in un campo in prossimità dell'Università degli Studi del Molise in Campobasso (Molise, Italia) e posti individualmente in contenitori di vetro contenenti dell'acqua. Il materiale vegetale era impiegato per gli esperimenti entro le 24 ore dal prelievo in campo. I rami di castagno prelevati in provincia di Avellino hanno subito lo stesso trattamento della pianta non ospite.

Per alcuni biosaggi sono state utilizzate piantine di *C. sativa* di un anno di età, lunghezza compresa tra i 20 ed i 30 cm e presenza di circa 8-10 foglie. Il materiale è stato fornito dal C.R.A. di Caserta (Campania, Italia).

I campioni vegetali sono stati prelevati, per attuare il descritto iter sperimentale, nel periodo di fioritura (giugno-luglio), ovvero in corrispondenza della presenza del fitofago in campo.

#### 3.3.3a - Sostanze chimiche

Le sostanze chimiche utilizzate: (E)-2-esenale, acetato di esile, (Z)-3-esenil acetato, (E)-2-esenil acetato, esanolo, (Z)-3-esenolo, (E)-3-esenolo, (E)-2-esenolo, (Z)-3-esenil butirato, (E)-2-esenil butirato, (E)-2-esenil butirato, (E)-3-esenil esanoato, (E)-cariofillene, geranil acetato e metil salicilato (purezza 97-99%) sono state fornite da Sigma-Aldrich (Milano, Italia). (E)-cariofillene era un miscela enantiomerica.

#### 3.3.4a - Biosaggi comportamentali (olfattometro Y)

Le risposte comportamentali del cinipide ai composti volatili della pianta sono state osservate in un olfattometro a 2 vie (ad Y) in vetro (lunghezza braccio 23 cm; angolo 75°; lunghezza base tubo 30 cm; Ø interno 3 cm) (Fig. Va e Vb

particolare). Un flusso di aria (60 ml/min), generato da una pompa e regolato attraverso due flussometri, veniva fatto passare attraverso una trappola a carbone attivo ed una beuta contenente acqua distillata. L'aria, una volta purificata ed umidificata, attraversava le due "camere di scelta", costituite da due cilindri di vetro (L= 9 cm; Ø interno 3 cm) chiuse da setti in teflon. Successivamente l'aria fluiva nel tubo ad Y dove erano registrate le risposte comportamentali degli insetti.

L'apparato è stato collocato in un contenitore (90 cm x 75 cm x 40 cm), il cui fondo era rivestito di carta bianca per consentire alla luce di diffondersi in maniera uniforme; la sorgente luminosa, rappresentata da due neon bianchi rispettivamente di 36 W posti ad un'altezza di circa 1 m dal fondo e posizionati sul tubo ad Y in modo da non influenzare la scelta degli insetti garantiva un'illuminazione, all'interno del tubo, di 2,500 Lux.

Le prove sono state condotte saggiando un prodotto alla volta e lasciando vuota una delle camere di scelta o inserendo un disco di carta da filtro (Whatman  $N^{\circ}1$ , Ø 0,8 cm) impregnato con acqua distillata o con solvente. Al fine di verificare la specificità dell'insetto nei confronti dei segnali emessi dalla pianta ospite, sono stati condotti tre esperimenti aggiuntivi: (1) rametti intatti di pianta non ospite vs aria pura; (2) rametti di pianta non ospite a cui era stato inferto un danno remoto vs aria pura; (3) rametti di pianta ospite con lesione remota vs rametti della pianta non ospite con lesione simile. I rami utilizzati nella sperimentazione erano asportati dalla pianta solo prima di iniziare l'esperimento ed erano posti in contenitori d'acqua per non alterarne il contenuto fisiologico (Tasin et al., 2005). Ogni ramo del peso di circa 2 g era provvisto di 2 foglie e di 3 gemme. Il danno meccanico era ottenuto tagliando le parti vegetali in pezzi della larghezza di 0,5 cm (van Tol et al., 2002).

E' stata, inoltre, determinata la risposta comportamentale dell'insetto ad una miscela sintetica contenete i 14 componenti identificati nello stesso rapporto presente nello spazio di testa di un campione di rametti della pianta ospite a cui era stata inferta una lesione. In tal caso, in una camera di scelta era inserito un dischetto di

carta filtro  $(0.5~\text{cm}^2)$  sul quale era stata applicata la miscela da saggiare  $(5~\mu l)$ . Diverse concentrazioni della miscela  $(0.01~\text{M},\,0.1~\text{M}$  ed 1~M) sono state preparate sciogliendo le sostanze sintetiche in olio minerale (Sigma-Aldrich, Milano, Italia). Nella camera di controllo si disponeva un dischetto innescato solo con olio minerale  $(5~\mu l)$ .

Entrambi i dischi di carta erano sospesi al centro della sezione trasversale della camera di scelta e sostituiti ad ogni replica.



Figura Va.- olfattometro ad Y utilizzato per le prove comportamentali



Figura Vb.- particolare della camera di scelta contenente un disco di carta da filtro impregnato con il composto da saggiare.

La procedura utilizzata per valutare le risposte comportamentali è stata simile a quella impiegata da altri autori (Sabelis e van de Baan, 1983; Steinberg *et al.*, 1992; Potting *et al.*, 1995; Du *et al.*, 1996; Ngi-song *et al.*, 1996; Bertschy *et al.*, 1997; Bernasconi *et al.*, 1998; Hern e Dorn, 1999).

Un insetto adulto (1-2 giorni di età) era rilasciato alla base dell'olfattometro (punto di rilascio) e il suo comportamento osservato per 10 minuti (Fig. VI). Una scelta è stata considerata valida quando l'insetto rimaneva per almeno 30 secondi oltre i primi 3 cm di un braccio dell'olfattometro, opportunamente evidenziati da una linea orizzontale. In caso contrario, la risposta era registrata come "non scelta". I parametri assunti per misurare la risposta olfattometrica degli insetti sono stati rispettivamente la "prima scelta" ed il "tempo di permanenza" nei due bracci dell'olfattometro.

La posizione dello stimolo e del controllo nei due bracci dell'olfattometro è stata invertita dopo ogni prova, per evitare eventuali effetti di posizione. Per ogni stimolo saggiato sono stati utilizzati almeno 30 individui. Dopo ogni 5 osservazioni, l'olfattometro veniva lavato con acetone ed asciugato in stufa a 200 °C per 30 minuti.

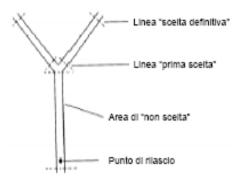


Figura VI.- Suddivisione funzionale dell'olfattometro ad Y

#### 3.3.5a - Estrazione dei composti volatili

I composti volatili emessi da *C. sativa* sono stati collezionati mediante microestrazione in fase solida (SPME) esponendo una fibra di polidimetilsilossano (100 μm) (Supelco, Bellefonte, PA) nello spazio di testa del campione disposto in un opportuno contenitore.

La microestrazione in fase solida (SPME) è una tecnica che permette di estrarre e concentrare, impiegando fibre di silice rivestite da polimeri con elevate capacita adsorbenti (fase stazionaria), una vasta serie di composti organici volatili o semi volatili da differenti matrici come aria, acqua e suolo (Zhang e Pawliszyn, 1993). Ideata per campionare i contaminanti organici presenti nell'acqua, questa tecnica è stata successivamente impiegata in numerose altre analisi ambientali (Steffen e Pawliszyn, 1996) e nello studio dei feromoni degli insetti (Malosse *et al.*, 1995). L'esito dell'estrazione è fortemente legato alla polarità del composto che si vuole estrarre ed alla scelta della fibra e dell'adsorbente con cui è rivestita; le fibre in

polidimetilsilossano sono comunemente impiegate per campionare sostanze non polari, mentre in poliacrilato per i composti polari (Vercammen *et al.*, 2000).

Rami di castagno simili a quelli impiegati nei saggi comportamentali venivano tagliati in pezzi (0,5 cm di lunghezza), su fogli di alluminio, ed utilizzati immediatamente per l'estrazione o esposti all'aria a temperatura ambiente (23±1°C) per 60 min. Il campione veniva inserito all'interno di un contenitore di vetro (25 ml), chiuso ermeticamente con un coperchio provvisto di un setto perforabile in silicone/teflon. Le diverse analisi sono state standardizzate seguendo la procedura descritta in Bech *et al.* (2008). I parametri previsti da questo metodo sono: P = tempo di permeazione = 1 min, E = tempo di esposizione della fase adsorbente = 60 min, S = tempo di ritrazione della fibra nell'ago della siringa prima dell'iniezione = 30 secondi, e T = tempo di desorbimento della fibra nell'iniettore del gascromatografo = 15 min. Prima di ogni estrazione, la fibra è stata condizionata per 30 minuti in un iniettore del gascromatografo mantenuto a 250 °C. Per ogni tipo di materiale vegetale utilizzato per l'estrazione (pianta ospite con danno recente e danno non recente) (Fig. VII) sono stati utilizzate 5 differenti piante.

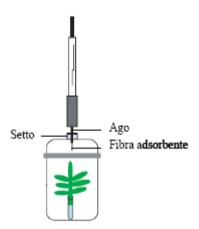


Figura VII.- Apparato utilizzato per l'estrazione mediante SPME (Tholl et al., 2006)

#### 3.3.6a - Gas Cromatografia accoppiata a Spettrometria di Massa (GC-MS)

L'analisi degli estratti è stata eseguita mediante gascromatografo (Fisons instruments, GC 8000 Series) interfacciato con spettrometro di massa (Fisons instruments, MD 800), utilizzando una colonna capillare CPWAX 52 CB (30 m x 0,32 mm i.d., 0,25 µm spessore del film) (Ruther, 2000).

Il programma di temperatura utilizzato è stato il seguente: 40°C per 3 min, a 3°C/min fino a 230°C e isoterma finale di 30 min. La temperatura dell'iniettore è stata mantenuta a 240°C. Elio è stato utilizzato come gas di trasporto con un flusso di 2 ml/min. Gli spettri di massa sono stati acquisiti utilizzando la tecnica di Ionizzazione Elettronica (EI, Electronic Ionization). I dati sono stati registrati con un impatto elettronico di 70 eV in un range di massa da 25 a 450 m/z ed una temperatura della sorgente di 200°C. Nella fase successiva il quadrupolo ha separato gli ioni prodotti in sorgente in base al rapporto m/z. I composti sono stati identificati sulla base del confronto degli spettri di massa con quelli riportati in libreria (NIST 2005). L'identità dei composti è stata confermata confrontando i tempi di ritenzione e gli spettri di massa con quelli di standard sintetici puri. Le percentuali relative delle diverse sostanze negli estratti sono state definite in base alle aree dei rispettivi picchi. Al fine di determinare la composizione percentuale dei diversi estratti, per ogni analisi la somma delle aree dei picchi è stata impostata pari al 100% ed il contributo di ogni singolo componente è stato poi calcolato.

#### 3.3.7a - Elettroantennografia (EAG)

La tecnica elettroantennografica (EAG) consente di misurare la somma dei potenziali elettrici generati dai neuroni, presenti nei sensilli olfattivi antennali di un insetto, stimolati con una determinata sostanza. Composti EAG attivi verso una specie hanno spesso un significato ecologico e, pertanto, sono potenzialmente in grado di agire come modificatori del comportamento (Vander Pers, 1991). L'EAG è

stata utilizzata per valutare la capacità delle sostanze identificate di stimolare il sistema olfattivo degli adulti di *D. kuriphilus* e di evidenziare eventuali differenze nella sensibilità olfattiva dell'insetto ai vari composti (Germinara *et al.*, 2009a). La tecnica adoperata è molto simile a quella già sperimentata in studi precedenti (Den Otter *et al.*, 1996; Germinara *et al.*, 2007) (Figg. VIII e IX).



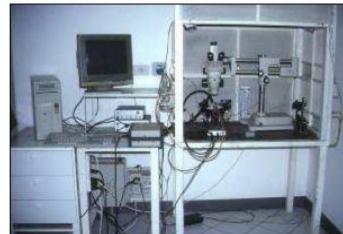


Figure VIII e IX.- Apparecchiatura per studi elettroantennografici.

L'antenna asportata da un adulto di D. kuriphilus (1 giorno di età) era collocata con la parte basale in una pipetta di vetro (Ø 1 mm) contenente 0,1 M di soluzione KCl (soluzione salina), con funzione di elettrodo di riferimento, e l'apice inserito in una pipetta simile (Ø 0,2 – 0,3 mm), con funzione di elettrodo registrante.

La conducibilità elettrica, attraverso la soluzione fisiologica, era ottenuta mediante fili d'argento rivestiti di AgCl, inseriti nelle pipette e connessi ad un amplificatore (UN-6) collegato ad un computer dotato del software EAG 2.0 per registrazione elettroantennografica (Synthec, Hilversum, The Netherlands) (Van der Pers e Minsk, 1993). L'antenna era continuamente investita da un flusso di aria a temperatura ambiente, purificata in seguito al passaggio in filtro di carbone attivo ed umidificata attraversando una bottiglia di gorgogliamento contenente acqua distillata. Sull'antenna fluiva una quantità d'aria pari a 500 ml/min attraverso un tubo in acciaio inossidabile (Ø 1 cm) la cui uscita era posizionata a circa 1 cm dall'antenna. Lo stimolo da saggiare (10 μl di una soluzione di composto sintetico in olio minerale) è stato adsorbito su una dischetto di carta da filtro (1 cm², Whatman n° 1), collocata in una pipetta Pasteur (15 cm di lunghezza) ed utilizzata come "cartuccia emana odore". Per ogni sostanza identificata sono state saggiate sette dosi da 10<sup>-3</sup> a 40 μM.

Gli stimoli, somministrati a dosi crescenti, sono stati addizionati al flusso d'aria attraverso un foro (Ø 4 mm), praticato a 9 cm dall'uscita del tubo iniettando, in 1 secondo, 2,5 cm³ del vapore di una cartuccia odorosa. L'intervallo tra due stimolazioni successive era di 30 secondi. Uno stimolo di controllo (10 µl di olio minerale) ed un di riferimento (10 µl di soluzione (*Z*)-3-esen-1-olo 1 M) sono stati applicati all'inizio dell'esperimento e dopo ogni gruppo di tre composti scelti a random, per tener conto della graduale diminuzione di sensibilità antennale durante l'esperimento. Per ogni composto saggiato, le risposte EAG sono state registrate utilizzando 5 antenne di differenti individui.

### 3.3.8a - Prove preliminari di attrattività in campo

L'attività biologica dei composti sintetici è stata valutata, in un castagneto ceduo sito in provincia di Avellino, con l'ausilio di pannelli collanti bianchi (n=5 per tesi) posizionati ad una altezza di circa 3 metri dalla superficie del terreno, nel

periodo di fuoriuscita dell'adulto dalle galle (Fig. X e XI particolare). Gli erogatori inseriti individualmente al centro dei pannelli erano costituiti da fiale in polietilene (0,1 ml) innescate con 150 mg di miscela in olio minerale (1:1) assorbiti su carta filtro. Le 7 miscele saggiate sono di seguito riportate in Tabella 2.

Le operazioni settimanali svolte nel periodo di sperimentazione riguardavano il rinnovo delle trappole e degli erogatori, la rotazione a random delle trappole ed il conteggio delle catture.



Figura X.- Pannello collante bianco



Figura XI.- Particolare di erogatore

#### 3.3.9a - Analisi dei dati

Al fine di compensare l'effetto del solvente e/o di eventuali artefatti dovuti a risposte di meccanorecettori, l'ampiezza (mV) della risposta EAG a ciascuno stimolo saggiato è stata corretta sottraendo ad essa la risposta EAG media ai due controlli (olio minerale) più vicini allo timolo (Raguso e Light, 1998).

Per compensare la diminuzione della sensibilità antennale nel corso dell'esperimento, l'ampiezza EAG risultante è stata corretta tenendo conto della riduzione della risposta EAG allo stimolo di riferimento (Den Otter *et al.*, 1991).

Nelle curve dose-risposta, è stata considerata come soglia di attivazione la dose più bassa alla quale il limite inferiore dell'errore standard della risposta media fosse maggiore del limite superiore dell'errore standard per la diluizione più bassa saggiata (Sant'ana e Dickens, 1998). Il livello di saturazione è stato rilevato alla dose più bassa per la quale la risposta media fosse uguale o inferiore a quella della dose precedente (Germinara *et al.*, 2009b).

Un test  $\chi^2$  (chi quadro) è stato utilizzato per determinare la significatività delle differenze tra il numero di insetti che hanno scelto il braccio con la sostanza da saggiare e quello presente nel lato\_del controllo nell'olfattometro. Il test-t di Student per campioni accoppiati è stato utilizzato per analizzare le differenze relative al tempo di permanenza degli insetti in ciascun braccio dell'olfattometro.

Per valutare l'efficacia delle diverse miscele utilizzate in campo, la media delle catture per trappola relativa a ciascuna di essa è stata confrontata con la media delle catture della trappola di controllo mediante il test-*t* di Student per campioni indipendenti.

4.4a - Risultati

4.4.1a - Risposte comportamentali a materiale vegetale

Piantine intere, rami integri e rami con danno meccanico recente di *C. sativa* non sono risultate significativamente attrattive per gli adulti di *D. kuriphilus* sia in termini di prima scelta che in relazione al tempo di permanenza nel braccio in cui era presente lo stimolo (Tab. 2). Gli insetti esposti a rami della pianta ospite con danno meccanico non recente hanno mostrato una preferenza significativa per tale stimolo e sono rimasti per un tempo significativamente maggiore nel braccio trattato rispetto a quello di controllo (Tab. 2).

Gli adulti di *D. kuriphilus*, sia in presenza di rami intatti che con danno meccanico non recente della pianta non ospite *P. laurocerasus*, hanno trascorso un tempo significativamente maggiore nel braccio di controllo. Allo stesso modo, in presenza di rami della pianta ospite con danno meccanico non recente e della pianta non ospite con danno simile, ha mostrato una preferenza significativa per il materiale della pianta ospite (Tab. 2).

Tabella 2.- Risposte degli adulti di D. kuriphilus, in olfattometro Y, a differenti fonti di odore della pianta ospite (Castanea sativa) e non ospite (Prunus laurocerasus)

Fonti di odore	$N^a$	Prima scelta		Tempo di permanenza (min.) nei bracci (media±SE)				
		Trattato <sup>b</sup>	$\chi^2$	P	Trattato	Controllo	t	P
Piantina ospite vs aria	32(25)	0,56	0,36	0,549	2,3±0,4	2,8±0,6	-0,615	0,544
Rami ospite con foglie integre vs aria	33(25)	0,56	0,36	0,317	2,5±0,4	2,2±0,4	0,515	0,611
Rami ospite danno recente vs aria	34(30)	0,60	1,20	0,273	2,9±0,4	2,7±0,5	0,207	0,837
Rami ospite con danno non recente vs aria	33(30)	0,80	10,80	0,001	5,1±0,6	2,4±0,6	2,688	0,012
Rami intatti non ospite vs aria	30(24)	0,33	2,67	0,102	2,6±0,2	3,6±0,2	-2,108	0,046
Rami non ospite con danno non recente vs aria	30(23)	0,17	9,78	0,002	1,0±0,2	6,6±0,5	-8,338	<0,001
Rami ospite con danno non recente vs rami non ospite con dannonon recente	34(27)	0,85	13,37	<0,001	3,9±0,5	1,0±0,3	5,129	<0,001

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> Numero totale di individui saggiati (*N*), in parentesi quelli che hanno scelto.

<sup>b</sup> Porzione di individui (tra quelli che hanno scelto) che hanno effettuato come prima scelta lo stimolo

## 4.4.2a - Identificazione dei composti volatili

L'analisi gas cromatografica abbinata a spettrometria di massa ha rilevato 15 composti volatili negli estratti ottenuti solida mediante SPME da materiale vegetale di castagno danneggiato attrattivo per il cinipide. Tramite confronto dei tempi di ritenzione e degli spettri di massa sono state confermate le identità di 14 sostanze, di cui 11 composti volatili della foglia verde, noti come green leaf volatiles (GLVs) [(E)-2-esenale, acetato di esile, (Z)-3-esenil acetato, (E)-2-esenil acetato, esanolo, (Z)-3-esenolo, (E)- 3-esenolo, (E)-2-esenil butirato, (E)-2-esenil butirato, (Z)-3-esenil esanoato], 2 terpeni [(E)-cariofillene, geranil acetato] ed 1 composto aromatico (metil salicilato), mentre un componente risulta non identificato (Tab. 3).

Sono state evidenziate differenze quali-quantitative tra le miscele di composti emesse durante la prima ora dopo il danno e l'ora successiva. Nella seconda ora, infatti, è stata rilevata la presenza di (E)-2-esenale, una significativa riduzione della percentuale di (Z)-3-esenil acetato ed un significativo aumento di quella di esanolo e (E)-2-esenolo (Tab.3).

Tabella 3.- Media relativa delle aree dei picchi (±ES) dei composti rilevati nello spazio di testa dei rametti di castagno. I volatili sono stati collezionati con il metodo SPME immediatamente dopo (recente) o dopo un'ora (remoto non recente) dal danno meccanico ed in seguito analizzati tramite gascromatografia abbinata a spettrometria di massa. Gli asterischi indicano le differenze significative tra il danno recente e non recente (t-test, \*P <0,05; \*\* P <0,01).

Composto	Purezza degli standard %	Danno recente <sup>a</sup>	Danno non recente
_	_	0-60 min	60-120 min
(E)-2-Esenale	99	0,0±0,0	1,9±0,9*
Esil acetato	99	$5,7\pm0,2$	$5,4\pm0,7$
(Z)-3-Esenil acetato	98	70,9±2,9	51,9±4,1**
(E)-2-Esenil acetato	98	$2,5\pm0,6$	$4,5\pm0,7$
Esanolo	99	$0.8\pm0.1$	2,8±0,7*
(E)-3-Esenolo	97	$0,1\pm0,1$	$0,2\pm0,1$
(Z)-3-Esenolo	98	12,5±1,8	$18,3\pm1,8$
(E)-2-Esenolo	96	$0,3\pm0,1$	1,5±0,4*
(Z)-3-Esenil butirato	98	$2,5\pm0,4$	$5,3\pm3,1$
(E)-2-Esenil butirato	95	$0,1\pm0,1$	$0,7\pm0,4$
(E)-Cariofillene	99	$1,4\pm0,8$	$0,3\pm0,2$
(Z)-3-Esenil esanoato	98	$0.8\pm0.2$	$2,4\pm0,8$
_b	-	$1,1\pm0,2$	$1,2\pm0,2$
Metil salicilato	99	$0,7\pm0,4$	$0,6\pm0,3$
Geranil acetato	99	$0,6\pm0,2$	$2,8\pm1,3$

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> Per ogni estrazione, le percentuali sono state calcolate dividendo l'area del picco di un componente dall'area totale dei componenti rilevati <sup>b</sup> non identificato

#### 4.4.3a - Risposta EAG

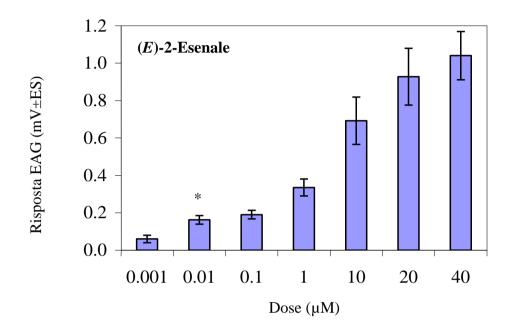
Le risposte EAG degli insetti a dosi crescenti (0,001 -  $40~\mu\text{M})$  di ciascuna sostanza sono state utilizzate per calcolare le curve dose-risposta e le soglie di attivazione (Fig. XII )

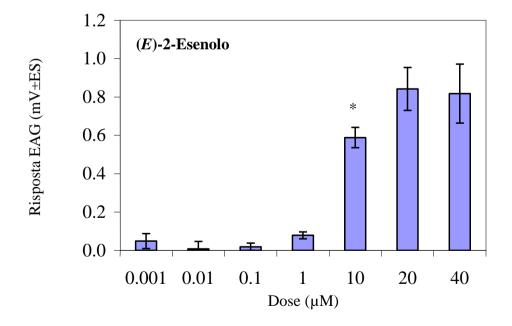
Per ognuno dei composti saggiati, l'ampiezza delle risposte elettroantennografiche è risultata crescente con la dose. Sono state registrate soglie di attivazione diverse per i differenti composti. La soglia di attivazione è risultata di  $0,01~\mu\text{M}$  per (E)-2-esenale ed (E)-2-esenil acetato, di  $0,1~\mu\text{M}$  per esanolo, (Z)-3-esenolo, (E)-cariofillene e geranil acetato e di  $1~\mu\text{M}$  per esil acetato, (Z)-3-esenil acetato, (E)-3-esenolo e (Z)-3-esenil esanoato.

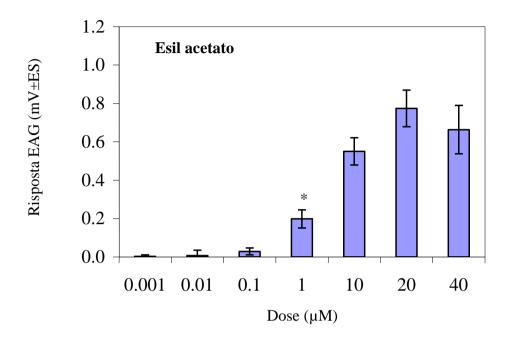
L'ampiezza delle risposte EAG ad esil acetato, (E)-2-esenil acetato, esanolo, (E)-3-esenolo, (E)-3-esenolo, (E)-3-esenolo, (E)-2-esenolo, (E)-2-esenil butirato, e metil salicilato subiva un decremento dalla dose di 20  $\mu$ M a quella di 40  $\mu$ M, indicando il raggiungimento della soglia di saturazione alla dose più bassa.

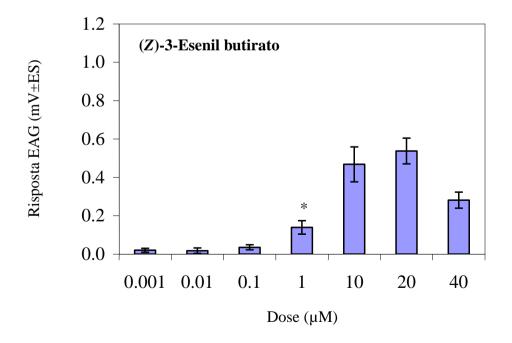
Fig. XII.- Profili EAG dose-risposta di D. kuriphilus (n=5) ai componenti identificati di C. sativa.

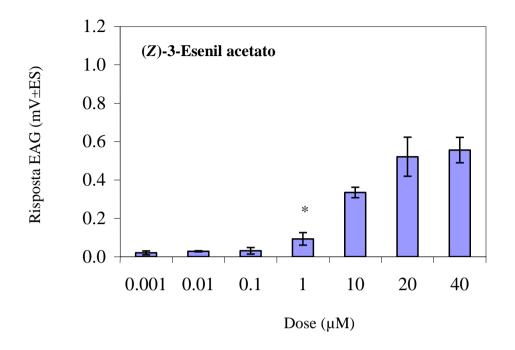
Gli asterischi indicano le dosi di attivazione.

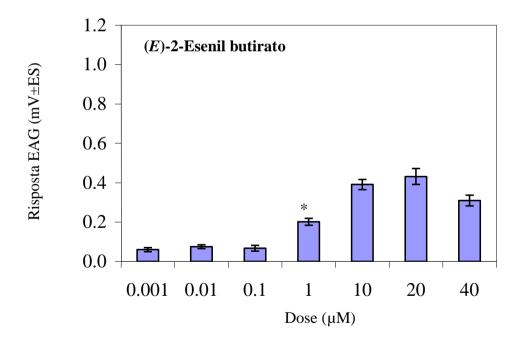


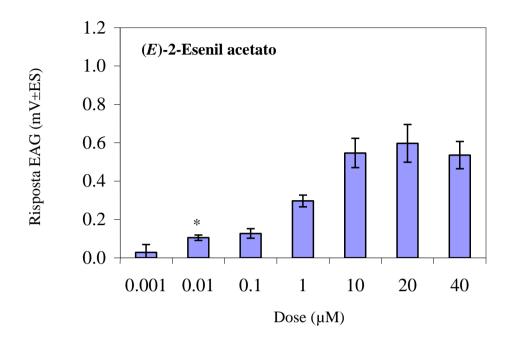


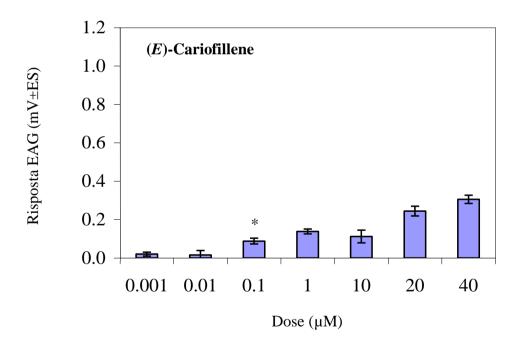


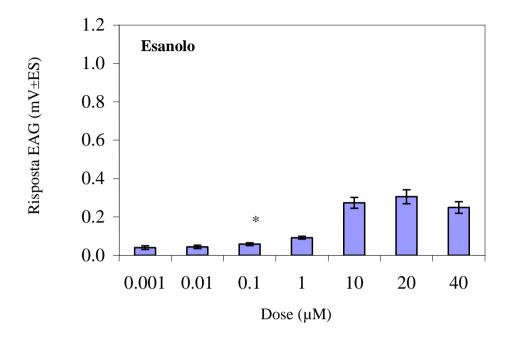


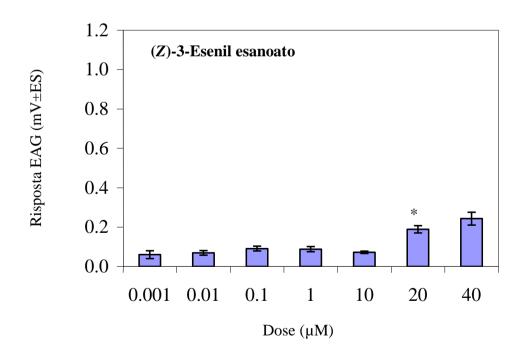


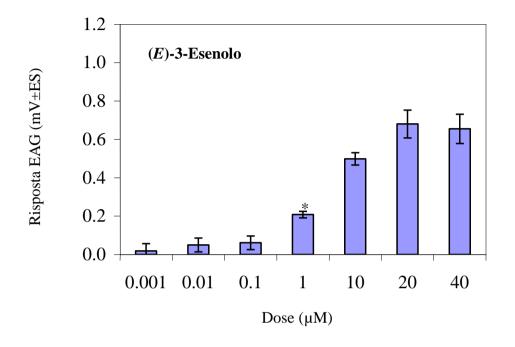


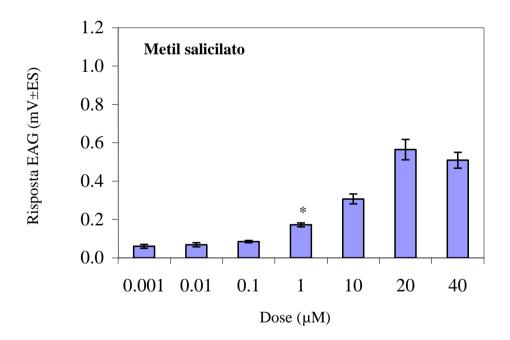


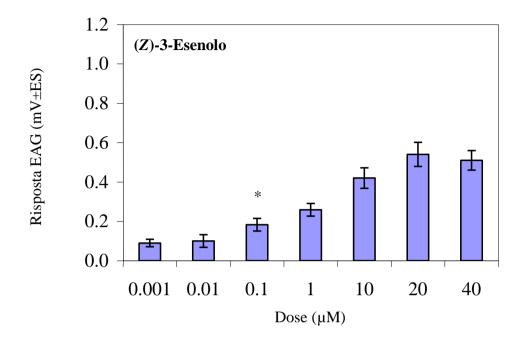


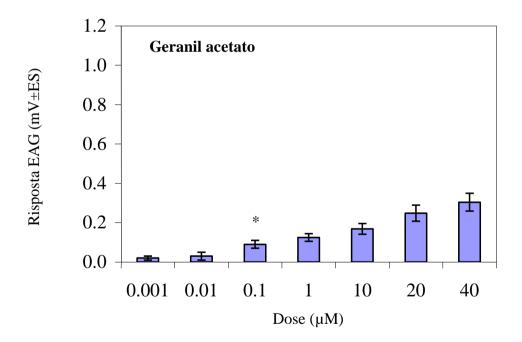












# 4.4.4a - Risposte comportamentali a sostanze sintetiche

In olfattometro ad Y, una miscela sintetica, costituita dai 14 composti identificati, negli stessi rapporti con cui erano presenti nello spazio di testa del materiale attivo, è risultata attrattiva per *D. kuriphilus*.

Dalle risposte comportamentali del *D. kuriphilus* a differenti dosi della miscela si evince una significativa attrattività dell'insetto quando esposto alle dosi  $0,05~\mu M$  e  $0,5~\mu M$  sia per il parametro di prima scelta che di tempo di permanenza nel braccio con lo stimolo. Nessuna preferenza significativa è stata mostrata alla dose di  $5~\mu M$  (Tab. 4).

Tabella 4.- Risposta comportamentale alla miscela sintetica dei 14 componenti identificati dall'estratto proveniente da una sorgente attrattiva di *C. sativa*.

Dose (µM)	N <sup>a</sup>	Prima scelta		Numero di minuti trascorsi nel braccio (media±SE)				
		Trattato b	$\chi^2$	P	Trattato	Controllo	t	P
0,05	33(25)	0,72	4,84	0,028	3,3±0,3	2,2±0,3	2,302	0,030
0,5	35(25)	0,80	9,00	0,003	$3,3\pm0,5$	$1,4\pm0,3$	2,535	0,018
5	36(25)	0,52	0,04	0,841	2,2±0,4	2,5±0,5	-0,286	0,777

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> Numero (*N*) totale di individui saggiati, tra parente quelli che hanno scelto.

<sup>b</sup> Percentuale di individui (tra quelli che hanno scelto) che hanno dato come prima scelta lo stimolo.

Nelle condizioni sperimentali adottate, la dose ottimale della miscela  $(0,5~\mu\text{M})$  ha indotto un'attrazione comparabile a quella osservata in risposta al materiale attrattivo di *C. sativa*.

Sono stati condotti ulteriori saggi olfattometrici per valutare l'attività di miscele ottenute sottraendo dal blend completo i composti appartenenti a singole classi chimiche (aldeidi, alcoli, acetati alifatici, acetati butirati, acetati esanoati, terpeni, composti aromatici), ma mantenendo inalterati i rapporti con cui le sostanze erano presenti nell'emissione della pianta (Tab. 5).

Tabella 5.- Attrattività in olfattometro ad Y di alcune miscele (0,1 M) di composti sintetici verso D. kuriphilus.

Miscela	Insetti saggiati	Prima scelta (%)		Tempo di permanenza (%)	
	(risposta)	Stimolo	P	Stimolo	P
A = tutti i composti negli stessi Rapporti della pianta	36 (25)	80	0,003	69	0,013
$\mathbf{B} = \mathbf{A} - (E)$ -2-esenale	37 (25)	72	0,028	65	0,024
$\mathbf{C} = \mathbf{A}$ — esenile acetato, ( <i>Z</i> )-3 esenil acetato, ( <i>E</i> )-2-esenil acetato	35 (25)	60	0,317	61	0,128
$\mathbf{D} = \mathbf{A} - \text{esenolo}, (E)$ -2-esenolo, $(Z)$ -3-esenolo	36 (25)	72	0,028	77	0,0002
$\mathbf{E} = \mathbf{A} - (\mathbf{Z})$ -3-esenil butirato, ( $\mathbf{E}$ )-2-esenil butirato	36 (25)	52	0,841	49	0,921
$\mathbf{F} = \mathbf{A} - \text{cariofillene}, \text{ metil salicilato}, \text{ geranil acetato}$	33 (25)	48	0,841	39	0,131
G = A - esenil esanoato	34 (25)	60	0,317	52	0,807

L'attrattività è stata conservata dalle miscele prive dell'aldeide (*E*)-2-esenale e degli alcoli alifatici [esanolo, (*Z*)-3-esenolo, (*E*)-3-esenolo, (*E*)-2-esenolo], indicando per essi un ruolo non determinante ai fini dell'attrazione. Per tutte le altre miscele, invece, è stata osservata una perdita di attrattività, suggerendo che i composti necessari per l'attrazione sono presenti nelle rimanenti categorie chimiche.

#### 4.4.5a - Prove di attrattività delle miscele in campo

Sono state condotte prove di campo per valutare l'attività di miscele ottenute sottraendo dal blend completo i composti appartenenti a singole classi chimiche (aldeidi, alcoli, acetati alifatici, acetati butirati, acetati esanoati, terpeni, composti aromatici), ma mantenendo inalterati i rapporti con cui le sostanze erano presenti nell'emissione della pianta. Un'attrattività significativamente maggiore rispetto al controllo è stata riscontrata solo nella miscela a cui erano stati sottratti gli alcoli alifatici, esanolo, (*E*)-2-esenolo, (*Z*)-3-esenolo, confermando per essi un ruolo non determinante ai fini dell'attrazione come evidenziato dai saggi olfattometrici. Per tutte le altre miscele, invece, è stata osservata un'attrattività non significativamente differente rispetto alle trappole bianche di controllo (Tab. 6).

Tab. 6.- Attrattività in campo di alcune miscele di sostanze identificate in estratti da *C. sativa* verso gli adulti *D. kuriphilus* 

Miscela	Adulti/trappola	Significatività rispetto al
	(media±ES)	controllo
		(valore <i>P</i> )
A	$44,4 \pm 7,5$	0,089
В	$45,4 \pm 8,3$	0,093
C	$34,0 \pm 4,0$	0,446
D	$48,2 \pm 5,6$	0,014*
E	$36,0 \pm 4,1$	0,252
F	$33,6 \pm 1,9$	0,337
G	$31,6 \pm 5,4$	0,833
Controllo	$30,2 \pm 2,9$	-

#### 5.5a - Conclusioni

Le antenne di D. kuriphilus perecepiscono i segnali chimici emessi dalle piante. Dall'analisi delle risposte olfattive è emerso un significativo effetto attrattivo dei composti volatili emessi dai rami di castagno con danno meccanico non recente (60-120 minuti dopo il danno) verso gli adulti dell'insetto. Piantine intere, rami integri e rami con danno meccanico recente, invece, non sono risultati attrattivi. L'importanza dei composti volatili emessi da piante danneggiate nel processo di localizzazione della pianta ospite da parte di insetti fitofagi è stata evidenziata anche in altri studi (Bolter et al., 1997; Ruther et al., 2000; van Tol et al., 2004). Il significato biologico di tale fenomeno, tuttavia, è ancora poco chiaro. E' probabile che odori emessi da piante danneggiate possano segnalare un substrato più facilmente attaccabile rispetto ad una pianta sana. In alcune specie, inoltre, è stato osservato un comportamento di aggregazione degli adulti in risposta a composti volatili emessi dalla pianta a seguito del danno provocato dall'attività trofica e di ovideposizione di individui conspecifici (Loughrin et al., 1996; Bolter et al., 1997; Sun et al., 2010). Gli odori emessi dalla pianta non ospite sono risultati repellenti verso gli adulti di D. kuriphilus. La capacità del cinipide di evitare attivamente le piante non ospiti, attraverso la percezione di stimoli chimici volatili, e non semplicemente di ignorarli, potrebbe costituire un meccanismo ulteriore per ottimizzare la localizzazione della pianta e potrebbe avere rilevanti conseguenze evolutive (Forbes et al., 2005; Feder e Forbes, 2007). Effetti deterrenti e repellenti di composti di piante non ospiti sono stati osservati anche in altri insetti monofagi (Bernays et al., 2000; Linn et al., 2005). I componenti repellenti della pianta non ospite potrebbero essere potenzialmente impiegati nel controllo del fitofago (Ukeh et al., 2010).

Sono state evidenziate differenze quali-quantitative tra le miscele di composti emesse durante la prima ora dopo il danno e l'ora successiva. Dalla prima alla seconda ora dopo il taglio è stata rilevata una presenza aggiuntiva di (E)-2-esenale,

una riduzione significativa di (Z)-3-esenil acetato ed un aumento significativo di esanolo e (E)-2-esenolo. Tali differenze probabilmente spiegano la diversa attrattività dei rami danneggiati (danno recente e non).

Gli estratti ottenuti da C. sativa sono rappresentati principalmente da composti volatili della foglia verde, oltre che da due terpeni ed un composto aromatico. I composti emessi dal materiale attrattivo per D. kuriphilus sono ampiamente diffusi nel regno vegetale e sono stati identificati in numerose piante a seguito di danno meccanico o di attacco di fitofagi (Visser, 1986; Loughrin et al., 1996; Turlings et al., 1998; Ruther et al., 2002; Takabayashi et al., 1994; Bolter et al., 1997; Hoballah e Turlings, 2005; Bruce et al., 2005). In natura, il rilascio di tali sostanze potrebbe avvenire attraverso ferite e microlesioni causate da fattori biotici e abiotici. Alcuni GLVs, inoltre, possono essere emessi in risposta ai cambiamenti fotoperiodici, durante la transizione dalla fase di luce a quella di buio (Graus et al., 2004; Chamberlain et al., 2006). I componenti volatili emessi dalla pianta conseguentemente ad un danno meccanico e/o da fitofago agevolano l'insetto nel processo di selezione della pianta ospite (Loughrin et al., 1996; Dickens, 2000; Kalberer et al., 2001; van Tol et al., 2002). Un componente presente nella miscela attrattiva di C. sativa risulta non ancora identificato, per cui non è stato possibile includerlo nelle prove comportamentali ed elettroantennografiche, sebbene, sembrerebbe poco probabile il suo coinvolgimento nella localizzazione dell'ospite da parte dell'insetto, poiché il quantitativo presente nel blend naturale non varia significativamente nel tempo.

In un precedente studio (Germinara *et al.*, 2009a), l'(*E*)-2-esenale non induceva una risposta significativa negli insetti, la maggiore presenza di questo componente nella miscela odorosa di rametti a con danno non recente, potrebbe non giustificare la maggiore attrattività rispetto alla miscela presente in materiale vegetale con danno recente. Tale informazione, in associazione con il carattere ubiquitario in natura dei composti del castagno identificati, suggerisce che la localizzazione della pianta ospite è probabilmente mediata da uno specifico rapporto dei volatili presenti in miscela piuttosto

che da un singolo componente. Essendo *D. kuriphilus* un insetto monofago è rafforzata l'ipotesi che il meccanismo di riconoscimento della pianta ospite sia mediato dalla percezione di odori presenti in specifici rapporti tra loro nella miscela (Visser, 1986; Bruce *et al.*, 2005).

Tutti i composti saggiati sono percepiti dal sistema olfattivo antennale del cinipide avendo essi indotto, almeno ad alcune delle dosi saggiate, risposte EAG misurabili e significativamente maggiori rispetto al solvente (olio minerale). Ciò conferma i risultati di uno studio precedente (Germinara *et al.*, 2009) che aveva dimostrato, per la prima volta nella famiglia dei cinipidi, la capacità dell'insetto di percepire un'ampia varietà di composti volatili. Le sostanze hanno indotto risposte EAG crescenti con la dose. Le differenti soglie di attivazione registrate per i vari composti indicano una diversa sensibilità olfattiva agli stimoli saggiati. In particolare, una bassa soglia di attivazione potrebbe indicare una maggiore capacità dell'insetto di percepire lo stimolo a distanza.

La miscela sintetica comprendente tutti i 14 volatili EAG attivi nello stesso rapporto presente nello spazio di testa del campione è risultata attrattiva verso *D. kuriphilus*, suggerendo che in essa sono presenti i composti sono coinvolti nella localizzazione della pianta ospite. Studi precedenti mostrano che solo un piccolo numero dei volatili della pianta ospite tra quelli elettrofisiologicamente attivi verso un insetto sono coinvolti nella localizzazione della pianta ospite (Rojas, 1999; Dickens, 2000, Fraser *et al.*, 2004; Tasin *et al.*, 2006) suggerendo che non tutti i 14 composti della miscela sintetica sono necessari per l'attrazione.

Per verificare il contributo delle diverse categorie chimiche di composti nel determinare l'attrazione del cinipide, sono state condotte prove preliminari di attrattività in campo. In particolare, sono state saggiate la miscela sintetica comprensiva di tutti i composti identificati ed alcune miscele parziali ottenute sottraendo dalla miscela completa singole categorie di sostanze (alcoli, aldeidi, acetati alifatici, terpeni, composti aromatici, acetati butirati, acetati esanoati). Da tale studi è emersa una significativa attrattività della miscela cui erano stati sottratti gli

alcoli alifatici, esanolo, (E)-2-esenolo, (Z)-3-esenolo, eviudenziando per essi un ruolo non determinante ai fini dell'attrazione. Tale informazione potrebbe essere oggetto di una maggiore speculazione scientifica e potrebbe fornire interessanti risposte sotto l'aspetto pratico-applicativo.

Ulteriori studi di laboratorio e di campo sono tutavia necessari per meglio definire una miscela attrattiva ottimale e per la messa a punto di un opportuno erogatore da utilizzare come strumento di monitoraggio del volo degli adulti e per lo sviluppo di strategie innovative di controllo del cinipide.

#### 5.6a - Bibliografia

- Abe, Y., Melika, G., Stone, G.N. 2007 The diversity and phylogeography of cynipid gall wasps (Hymenoptera: Cynipidae) of the Oriental and eastern Palaearctic regions, and their associated communities. Orient. Insects 41: 169-212.
- Abrahamson W.G., Hunter M.D., Melika G., Price P.W., 2003 *Cynipid gall-wasp communities correlate with oak chemistry*. J. Chem. Ecol., 29: 209-223.
- Agelopoulos N., Birkett M.A., Hick A.J., Hooper A.M., Pickett J.A., Pow E.M., Smart L.E., Smiley D.W.M., Wadhams L.J., Woodcock C.M., 1999 *Exploiting semiochemicals in insect control.* Pest Sci., 55: 225-235.
- Allison S.D., Schultz J.C., 2005 *Biochemical responses of chestnut oak to a galling cynipid.* J. Chem. Ecol., 31: 151-166.
- Bech, J.J., Smith, L., Merrill, G.B. 2008 In situ volatile collection, analysis, and comparison of three Centaurea species and their relationship to biocontrol with herbivory insects. J. Agric. Food Chem. 56: 2759–2764.
- Bernasconi M.L., Turlings T.C.J., Ambrosetti L., Bassetti P., Dorn S., 1998 Herbivore-induced emissions of maize volatiles repel the corn leaf aphid, Rhopalosiphum maidis. Entomol. Exp. Appl., 87(2): 133-142.

- Bernays E.A., Oppenheim S., Chapman R.F., Kwon H., Gould F., 2000 Taste sensitivity of insect herbivores to deterrents is greater in specialists than in generalists: a behavioural test of the hypothesis with two closely related caterpillars. J. Chem. Ecol., 26: 547-563.
- Bertschy C., Turlings T.C.J., Bellotti A.C., Dorn S., 1997 Chemically-mediated attraction of three parasitoid species to mealybug-infested cassava leaves. Fla. Entomol., 80(3): 383-395.
- Birch M.C., Haynes K.F., 1984 *Introduzione ai feromoni*. Clesav, Milano: 95 pp.
- Bolter C.J., Dicke M., van Loon J.J.A., Visser J.H., Posthumus M.A., 1997 Attraction of Colorado potato beetle to herbivore-damaged plants during herbivory and after its termination. J. Chem. Ecol., 23: 1003-1023.
- Bolvansky M. 1989 Intraspecific and seasonal variability of the full nuts proportion in european chestnut (Castanea sativa, Mill.) at selected localities in Slovakia-Rocnik. 35, cislo 10.
- Bruce T.J.A., Wadhams L.J., Woodcock C.M., 2005 *Insect host location: a volatile situation*. Trends Plant Sci., 10: 269-274.
- Brussino G., Bosio G., Baudino M., Giordano R., Ramello F., Melika G., 2002 Pericoloso insetto esotico per il castagno europeo. Informatore agrario, 37: 59-61.
- Cantelo W.W., Jacobson M., 1979 Corn silk volatiles attract many pest species of moths. J. Sci. Health, 14 (8): 695-707.
- Celli G., Maini S., 1988 *Lotta biologica integrata in agricoltura*. Cestaat, Roma: 196 pp.
- Chamberlain K., Khan Z.R., Pickett J.A., Toshova T., Wadhams L.J., 2006 *Diel periodicity in the production of green leaf volatiles by wild and cultivated host plants of stemborer moths*, Chilo partellus *and* Busseola fusca. J. Chem. Ecol., 32: 565-577.

- Den Otter, J. C., Tchicaya, T., Schutte, A.M. 1991 Effects of age, sex and hunger on the antennal olfactory sensitivity of tsetse flies. Physiol. Entomol. 16: 173–182.
- Den Otter, J.C., De Cristofaro, A., Voskamp, K.E., Rotundo, G., 1996 *Electrophysiological responses of chestnut moths*, Cydia fagiglandana *and* C. splendana (*Lep., Tortricidae*) to sex attractants and odours of host plants. J. Appl. Entomol. 120: 413-421.
- Dike M., Minkenberg O.P.J.M., 1991 Role of volatile infochemicals in farangink behaviour of the leafminer parasitoid daenusa sibirica (Diptera: Agromizidae). J. Nat. Hist. 33: 1089-1105.
- Dickens J.C., 2000 Orientation of Colorado potato beetl to natural and synthetic blends of volatiles emitted by potato plants. Agric. For. Entomol., 2: 167-172.
- Donath J., Boland W., 1994 *Biosynthesis of acyclic homoterpenes in higher plants* parallels steroid hormone metabolism. J Plant Physiol 143: 473–478.
- Du Y.J., Poppy G.M., Powell W., 1996 Relative importance of semiochemicals from the first and second trophic levels in host foraging behaviour of Aphidius ervi. J. Chem. Ecol., 22(9): 1591-1605
- Fahey J., Zalcmann A., Talalay P., 2001 *The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants*. Phytochemistry, 56: 5-51.
- Feder, J.L., Forbes, A.A. 2007 *Habitat avoidance and speciation for phytophagous insect specialists*. Funct. Ecol. 21: 585–597.
- Finch S., 1980 Chemical attraction of plant-feeding insects to plants. In: Applied Biology V (ed TH Coaker), Academic Press, London and New York, pp. 67-143.
- Flint H.M., Salter S.S., Walters S., 1979 *Caryophyllene: an attractant for the green lacewing*. Environ. Entomol. 8: 1123–1125.

- Forbes, A.A., Fisher, J., Feder, J.L. 2005 Habitat avoidance: overlooking an important aspect of host-specific mating and sympatric speciation? Evolutiomn 59: 1552–1559.
- Fraser A.M., Mechaber L.W., Hildebrand J.G., 2004 *Electroantennographic and behavioural responses of the sphinx moth* Manduca sexta *to host plant headspace volatiles*. J. Chem. Ecol., 29: 1813-1833.
- Frey M., Chomet P., Glawischnig E., Stettner C., Grun S., Winkl-mair A., Eisenreich W., Bacher A., Meeley R.B., Briggs S.P., Simcox K., Gierl A., 1997 *Analysis of a chemical plant defense mechanism in grasses*. Science 277: 696–699.
- Germinara, G.S., Rotundo, G., De Cristofaro, A. 2007 *Repellence and fumigant toxicity of propionic acid against adults of* Sitophilus granarius (*L.*) and S. oryzae (*L.*). J. Stored Prod. Res. 43(3): 229-233.
- Germinara, G. S., De Cristofaro, A., Paparatti, B., Speranza, S., Stacchiotti, M., Rotundo, G. 2009a *Electroantennographic responses of Dryocosmus kuriphilus to* Castanea sativa *leaf volatiles*. Acta Hort. 844: 387–394.
- Germinara, G. S., De Cristofaro, A., Rotundo, G. 2009b *Antennal olfactory responses to individual cereal volatiles in* Theocolax elegans (*Westwood*) (*Hymenoptera: Pteromalidae*). J. Stored Prod. Res. 45: 195–200.
- Germinara G.S., De Cristofaro A., Rotundo G., 2011 *Chemical cues for host location by the Chestnut Gall Wasp*, Dryocosmus kuriphilus. J. Chem. Ecol. 37: 49-56.
- Graus M., Schnitzler J.P., Hansel A., Cojocariu C., Rennenberg H., Wisthaler A., Kreuzwieser J., 2004 – Transient release of oxygenated volatile organic compounds during light-dark transitions in Grey poplar leaves. Plant Physiology, Vol. 135: 1967-1975.

- Hagen K.S., Dadd R.H., Reese J., 1984 *The food of insects*. In: Huffaker C.B., Rabb R.L., (Eds.). Ecological entomology. New York, John Wiley and Sons: 79-112.
- Hendry L.B., Greany P.D., Gill R.J., 1973 *Kairomone mediated host-finding behavior in parasitic Wasp* Orgilus lepidus. Ent. Exp. Appl., 16(4): 471-477.
- Hern A., Dorn S., 1999 Sexual dimorphism in the olfactory orientation of adult Cydia pomonella in response to α-farnesene. Entomol. Exp. Appl. 92(1): 63-72.
- Hoballah M.E., Turlings C.J., 2005 The role of fresh versus old leaf damage in the attraction of parasitic wasps to herbivore induced maize volatiles. J. Chem. Ecol., 31: 2003-2018.
- Hoffmann A.A., Parsons P.A., 1984 Olfactory response and resource utilization in Drosophila: interspecific comparisons. Biol J Linn. Soc., 22, 43–53.
- Jacobson M., 1976 Indian Calamus Root Oil: Attractiveness of the Constituents to Oriental Fruit Flies, Melon Flies, and Mediterranean Fruit Flies, Lloydia, 39:412.415
- Jeanne R.L., 1970 Chemical defence of brood by a social Wasp. Science, 168: 1465-1466.
- Kalberer, N. M., Turlings, T.C.J., Rahier M., 2001 Attraction of a leaf beetle (Oreina cacaliae) to damaged host plants. J. Chem. Ecol. 27:647–661.
- Karlson P., Butenandt A., 1959 Pheromones (ectohormones) i insects. Ann. Rev. Entomol. 4: 49-58.
- Knight L., Light D.M., 2001 Attractants from Bartlett pear for codling moth, Cydia pomonella (*L.*), larvae. Naturwissenschaften, 88:339–342 DOI 10.1007/s001140100244.
- Law J.H., Regnier F.E., 1971 *Pheromones*. Annu Rev Biochem 40: 533–548.

- Lichtenthaler H.K., Rohmer M., Schwender J., 1997 Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. Physiol Plant 101: 643–652.
- Light D.M., Knight A.L., Henrick C.A., Rajapaska D., Lingren B., Dickens J.C., Reynolds K.M., Buttery R.G., Merrill G., Roitman J., Campbell B.C., 2001

   A pear-derived kairomone with pheromonal potency that attracts male and female codling moth, Cydia pomonella (L.). Naturwissenschaften DOI 10.1007/s001140100243
- Linn C. JR., Nojima S., Roelofsw., 2005 Antagonistic effects of nonhost fruit volatiles on chemically-mediated discrimination of host fruit by Rhagoletis pomonella flies infesting apple, hawthorn (Crataegus spp.) and flowering dogwood (Cornus florida). Ent. Exp. Appl., 114: 97-105.
- Loughrin J.H., Manukian A., Heath R.R., Turlings T.C., Tumlinson J.H., 1994 Diurnal cycle of emission of induced volatile terpenoids by herbivore-injured cotton plants. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 91(25): 11836-11840.
- Loughrin J.H., Potter D.A., Hamilton-Kemp T.R., Byers M.E., 1996 Role of feeding-induced plant volatiles in aggregative behaviour of the Japanese beetle (Coleoptera: Scarabaeidae). Environ. Entomol., 25: 1188-1191.
- Luckner M., 1972 Secondary Metabolism in Plants and Animals. Chapman and Hall, London.
- Malosse C., Ramirez-Lucas P., Rochat D., Morin J., 1995 *Solid-phase microextraction, an alternative method for the study of airborne insect pheromones* (Metamasius hemipterus, *Coleoptera, Curculionidae*). J. High. Resolut. Chromatogr., 18(10): 669-670.
- Maradufu A., Lubega R., Dora F., 1978 *Isolation of (5E)-ocimenone, a mosquito larvicide from* Tagetes minuta. Llyodia 41 (2): 181-182.
- Masutti L., Zangheri S., 2001 *Tomologia generale e applicata*. Cedam Ed., Padova: 978 pp.

- Matsumoto Y., Thorsteinson A.J., 1968 Effect of organic sulfur compounds on oviposition in onion maggot, Hylemya antiqua Meigen (Diptera: Anthomyiidae). Appl. Ent. Zool. 3: 5-12.
- Melika G., Bosio G., Stone G. 2004 *Prime indagini sui parassitoidi di* Dryocosmus kuriphilus *Yasumatsu (Hymenoptera: Cynipidae): un nuovo insetto nocivo al castagno in Europa*. Relazione convegno sul cinipide galligeno del castagno. Cuneo, 27 maggio 2004.
- Montgomery, M.E., Wargo P.M., 1983 *Ethanol and other host-derived volatiles as attractants to beetles that bore into hardwoods*. J. Chem. Ecol. 9: 181-190.
- Ngi-Song A.J., Overholt W.A., Njagi P.G.N., Dicke M., Ayertey J.N., Lwande W., 1996 Volatile infochemicals used in host and host habitat location by Cotesia flavipes Cameron and Cotesia sesamiae (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae), larval parasitoids of stemborers on Graminae. J. Chem. Ecol. 22(2): 307-323.
- Nicese F. P., Ferrini F., 1999 *Il castagno europeo*. Informatore agrario, 44: 59-65.
- Nordlund D.A., Lewis W.J., 1976 Terminology of chemical releasing stimuli in intraspecific and interspecific interactions. J. Chem. Ecol. 2:211-220.
- Paparatti, B., Speranza, S. 2005 *Prima segnalazione del cinipide orientale del castagno* (Dryocosmus kuriphilus) *in Italia centrale*. Atti del IV Convegno Nazionale Castagno 2005. Italus Hortus 12:40.
- Pardi L., Turilazzi S., 1985 *Biologia delle Stenogastrinae*. Atti Accad. Naz. Ital. Entom., Rend. 30-32: 25-43.
- Parè P.W., Tumlinson J.H., 1997a *De novo biosynthesis of volatiles induced by insect herbivory in cotton plants.* Plant Physiol 114: 1161–1167.
- Parè P.W., Tumlinson J.H., 1997b *Induced synthesis of plant volatiles*. Nature, 385: 30-31.

- Parè P.W., Tumlinson J.H., 1999 *Plant volatiles as a defence against insect herbivores*. Plant Physiol., 121: 325-331.
- Petitt F.L., Turlings T.C.J., Wolf S.P., 1992 Adult experience modifies attraction of the leafminer parasitoid Opius dissitus (Hymenoptera: Braconidae) to volatile semiochemicals. J. Insect Behav., 5(5): 623-634.
- Pettersson L., 1970 *An aphid sex attractant*. I. Biological studies. Entomologica scandinavica 1: 63-73.
- Potting R.P.J., Vet L.E.M., Dicke M., 1995 Host microhabitat location by stemborer parasitoid Cotesia flavipes: the role of herbivore volatiles and locally and systemically induced plant volatiles. J. Chem. Ecol., 21(5): 525-539.
- Quiroz A., Pettersson J., Pickett J.A., Wadhams L.J., Niemeyer H.M., 1997 Semiochemicals mediating spacing behavior of bird cherry-oat aphid, Rhopalosiphum padi, feeding on cereals. J. Chem. Ecol., 23(11): 2599-2607.
- Raguso, R., Light D.M., 1998 *Electroantennogram responses of* Sphinx perelegans (*Lepidoptera: Sphingidae*) to floral and vegetative compounds. Entomologica Experimentalis et Applicata 86: 287-293.
- Reddy G.V.P., Guerrero A., 2000 *Behavioral responses of the diamondback moth*, Plutella xylostella, *to green leaf volatiles of* Brassica oleracea *subsp.* capitata. J. Agric. Food Chem. 48, 6025–6029.
- Regnier F.E., Wilson E.O., 1971 Chemical communication and «propaganda» in slave-maker ants. Science, 172: 267-269.
- Riddiford L. M., 1967 *Trans-2-hexenal: Mating stimulation for* Polyphemus *moths.* Science. 158 (3797): 139-141.
- Rieske L.L.K., 2007 Success of an exotic gallmaker, Dryocosmus kuriphilus, on chestnut in the USA: a historical account. Bullettin OEPP/EPPO 37, 172-174.

- Rodrigues V., 1980 *Olfactory behavior of* Drosophila melanogaster. In Siddiqi, O., Babu, P., Hall, L. M., and Hall, J. C. (eds.), Development and Neurobiology of Drosophila. New York, London, Plenum, 1980: 361-371. 50.
- Rojas C.J., 1999 Electrophysiological and behavioural responses of the cabbage moth to plant volatiles. J. Chem. Ecol., 25: 1867-1883.
- Ronquist F., Liljeblad J., 2001 *Evolution of the gall wasphost plant association.* Evolution, 55: 2503-2522.
- Rotundo G., Tonini C., Guglielmetti G., Rotundo A., 1987 *Identification of volatiles from leaves of* Castanea sativa *Miller and electroantennogram responses of* Cydia splendana (*Hübn.*) (*Lep. Tortricidae*). Annali della Facoltà di Scienze Agrarie dell'Università di Napoli-Portici, Serie IV 21: 20-38.
- Ruther J., Reinecke A., Thiemann K., Tolasch T., Francke W., Hilker, M., 2000 *Mate finding in the forest cockchafer*, Melolonta hippocastani, *mediated by volatiles from plants and females*. Physiol. Entomol., 25: 172-179.
- Ruther J., Reinecke A., Hilker M., 2002 *Plant volatiles in the sexual communication of* Melolontha hippocastani: *response towards time-dependent bouquets and novel function of (Z)-3-hexen-1-ol as a sexual kairomones.* Ecol. Entomol., 27: 76-83.
- Sabelis M.W., van de Baan H.E., 1983 Location of distant spider-mite colonies by phytoseiid predators. Demonstration of specific kairomones emitted by Tetranycus urticae and Panonychus ulmi (Acari: Tetranychus, Phytoseiidae). Entomol. Exp. Appl., 33: 303-314.
- Sant'Ana J., Dickens J. C., 1998 Comparative electrophysiological studies of olfaction in predaceous bugs, Podisus maculiventris and P. nigrispinus. J. Chem. Ecol. 24: 965–984.
- Schoonhoven L. M., 1968 *Chemosensory bases of host selection*. A. Rev. Ent. 13: 115-136.

- Shorey, H.H., 1977 *Manipulation of insect pests of agricultural crops, pp. 353-367*. In: H.H. Shorey and J. Mckelvey, Jr (eds). Chemical control of insect Behaviour: Theory and Application John Wiley & Sons, New York, USA, pp. 345-70.
- Solignat G. 1958 *Observation sur la biologie du chataigner*. Ann. Am. Plantes, 1: 31-58.
- Soni S.K., Finch S., 1979 Laboratory evaluation of sulphur-bearing chemicals as attractants for larvae of the onion fly, Delia antiqua (Meigen) (Diptera: Anthomyiidae) Bulletin of Entomological Research, 69: pp 291-298.
- Steffen A., Pawliszyn J., 1996 Analysis of flavor volatiles using headspace solidphase microextraction. J. Agric. Food Chem., 44(8): 2187-2193.
- Stone G.N., Schönrogge K., 2003 *The adaptive significance of insect gall morphology*. Trends Ecol. Evol., 18: 512-522.
- Stone G.N., Schönrogge K., Atkinson R.J., Bellido D., Pujade-Villar J., 2002 *The population biology of oak gall wasps (Hymenoptera: Cynipidae).* Annu. Rev. Entomol., 47: 633-668.
- Sun X.L., Wang G.C., Cai X.M., Jin S., Gao Y., Chen Z.-M., 2010 *The Tea Weevil*, Myllocerinus aurolineatus, *is attracted to volatiles induced by conspecifics*. J. Chem. Ecol., 36: 388-395.
- Sutherland O.R.W., Hutchins R.F.N., 1973 Attraction of newly hatched codling moth larvae (Laspeyresia pomonella) to synthetic stereo-isomers of farnesene. J. Insect Physiol.19:723–727.
- Tremblay E., 1990 *Entomologia Applicata*. Ed. Liguori pp 207.

## 2b - CAPITOLO II

### RIASSUNTO

L'adattamento sensoriale misurato come una riduzione nella risposta elettroantennografica (EAG) delle antenne dei maschi è stato proposto come uno dei meccanismi di confusione sessuale mediata da feromoni in Grapholita molesta (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae). E' stata rilevata una riduzione nella risposta EAG nella specie dopo una prolungata esposizione al componente principale del feromone (Z)-8-dodecen-1-il acetato (Z8-12:OAc) ad una concentrazione aerea di 1 ng/m³ pari a quella misurata in frutteti trattati con il feromone per generare confusione. Comunque l'effetto sulla loro abilità di orientamento verso femmine vergini in fase di richiamo poste in un tunnel di volo è molto limitato. Gli esperimenti sono stati intrapresi per determinare se l'esposizione al componente principale del feromone in combinazione con i due componenti secondari biologicamente attivi, (E)-8-dodecen-1-il acetato (E8-12:OAc) e (Z)-8-dodecen-1-olo (Z8-12:OH) induce livelli maggiori di adattamento sensoriale ed ha un'influenza maggiore sul comportamento sessuale dei maschi. L'esposizione delle antenne ad un componente della miscela feromonica induce adattamento sensoriale non solo verso lo stesso ma anche verso le altre due sostanze (adattamento incrociato). La media percentuale di adattamento sensoriale ad un componente del feromone risulta essere simile dopo 15 min di esposizione a 1 ng/m<sup>3</sup> aria di Z8-12:OAc od a 1 ng/m<sup>3</sup> aria di una miscela 1:1:1 o 93:6:1 di Z8-12:OAc, E8-12:OAc e Z8-12:OH. L'esposizione di maschi ad 1 ng/m<sup>3</sup>aria di Z8-12:OAc od alle due miscele di Z8-12:OAc, E8-12:OAc e Z8-12:OH per 15 min non ha prodotto effetti sull'abilità dei maschi di orientarsi verso una femmina vergine in fase di richiamo in un tunnel di volo. Nel presente studio sono stati studiati i meccanismi operativi di confusione sessuale tramite l'impiego di feromoni di G.molesta.

## **ABSTRACT**

Sensory adaptation measured as a reduction in electroantennogram (EAG) response of male antennae has been proposed as one of several mechanisms of sex pheromone-mediated mating disruption in the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae). A reduction in EAG response occurred in this species after prolonged exposure to its main pheromone compound (Z)-8-dodecen-1-yl acetate (Z8-12:OAc) at the aerial concentration of 1 ng/m³ measured in orchards treated with pheromone for disruption. The prolonged exposure of males to this aerial concentration of Z8-12:OAc, however, had only a small effect on their ability to orientate by flight to virgin calling females in a flight tunnel. Experiments were

undertaken to determine if exposure to the main pheromone compound in combination with the two biologically active minor compounds of this species, (E)-8-dodecen-1-yl acetate (E8-12:OAc) and (Z)-8-dodecen-1-ol (Z8-12:OH) would induce greater levels of sensory adaptation and have a greater effect on male sexual behaviour. The exposure of male antennae to one of the three pheromone compounds induced sensory adaptation to this compound and to the other two pheromone compounds demonstrating cross adaptation. Average percentage sensory adaptation to a pheromone compound was similar after 15 min of exposure to 1 ng/m³ air of Z8-12:OAc, or to 1 ng/m³ air of a 1:1:1 or 93:6:1 blend of Z8-12:OAc, E8-12:OAc and Z8-12:OH. The exposure of male *G. molesta* to 1 ng m³/air of Z8-12:OAc or the two ratios of Z8-12:OAc, E8-12:OAc and Z8-12:OH for 15 min had no effect on the ability of males to orientate by flight to a virgin calling female in a flight tunnel. The implications of the results for the operative mechanisms of sex pheromone-mediated mating disruption of this species are discussed.

#### 2.2b - Introduzione

La maggiore sensibilizzazione dell'opinione pubblica nei confronti delle tematiche ambientali, ha spinto il mondo della ricerca a considerare soluzioni alternative all'uso dei fitofarmaci nella difesa delle produzioni agricole. Gli studi intrapresi, a livello mondiale, sono risultati necessari e conseguenti alle sempre maggiori restrizioni legislative riguardanti sia il livello di residui massimi ammessi nelle produzioni commercializzate, sia il numero e la tipologia delle molecole utilizzabili. La tutela dell'ambiente e della salute dell'uomo sono i principi che hanno ispirato lo sviluppo e la diffusione di strategie innovative ed ecosostenibili di controllo, quali l'impiego in agricoltura dei semiochimici. I feromoni sessuali di sintesi in campo applicato hanno prodotto successi fin dai primi anni '60, sia nella "lotta indiretta" che "diretta" verso fitofagi dannosi, soprattutto contro i lepidotteri (Maini, 1974; Celli e Maini, 1988). I feromoni sessuali attrattivi sono prodotti in ghiandole esocrine ed emessi dalle femmine, nel caso dei dei lepidotteri, per richiamare il maschio anche da distanze notevoli. Il maschio, grazie alla presenza di sensilli chemiorecettori presenti sulle antenne, percepisce le molecole dei componenti del feromone ed intraprende il caratteristico volo orientato controvento, definito chemio-clino-tattico (Kennedy et al., 1981); in prossimità della femmina percepisce anche componenti della miscela emessi in quantità minore (componenti secondari).

La confusione sessuale mediata dall'utilizzo dei feromoni sessuali è un'efficace alternativa all'uso degli insetticidi per il controllo di alcuni fitofagi di notevole importanza economica (Cardè e Minks, 1995). Tale tecnica è basata sul principio per cui, in un ambiente con un'elevata densità di feromone, i maschi non riescono a localizzare le femmine rimanendo inibiti e più o meno inattivi (Birch e Haynes, 1984), con una conseguente diminuzione degli accoppiamenti e, quindi, della densità di popolazione nella generazione successiva. Le molecole volatili sintetiche biologicamente attive sono in genere diffuse nell'ambiente tramite

diffusori ("dispenser") a spaghetto, microfibrille, laminati plastici polistratificati o microincapsulati (Cardè, 2007). I meccanismi di azione dei trattamenti con feromone sembrano causare una riduzione nella risposta degli individui al feromone, agendo sui sensilli chemiorecettori olfattivi (adattamento sensoriale) e/o sul sistema nervoso centrale (assuefazione) e determinando nell'individuo confusione tra la sorgente naturale di feromone e quella sintetica (Bartell, 1982). E' stato ampiamente asserito che una miscela di feromone sintetico qualitativamente e quantitativamente simile al naturale attrattivo sessuale possa determinare un'efficace confusione sessuale nei tortricidi, sebbene solo limitate evidenze sostengano questa supposizione (Minks e Cardè, 1988).

Grapholita molesta (Busck), in anglosassone noto come Oriental fruit moth, è un importante fitofago a livello mondiale per pomacee e drupacee (Rothschild e Vickers, 1991) che può essere efficacemente controllato con il metodo della confusione sessuale (Trimble et al., 2000, 2004). L'impiego dei feromoni sessuali nel controllo della specie può determinare adattamento sensoriale (Baker et al., 1988; Trimble e Marshall, 2007, 2010) e/o assuefazione (Sanders e Lucuik, 1996; Rumbo e Vickers, 1997), così come competizione tra l'attrattivo naturale ed il sintetico (Sanders e Lucuik, 1996; Valeur e Löfstedt, 1996; Maini e Accinelli, 2001; Stelinski et al., 2004). Un calo nell'abilità del maschio nella ricerca del partner potrebbe prevenire o ritardare l'accoppiamento (Barclay e Judd, 1995); tuttavia, il potenziale riproduttivo di G. molesta si riduce approssimativamente del 7% per ogni giorno di ritardo nella copulazione dopo l'emergenza (Fraser e Trimble, 2001); tale informazione suggerisce che il controllo efficace della specie, tramite il metodo della confusione sessuale, potrebbe fornire risultati maggiormente validi prevenendo l'accoppiamento anziché ritardando lo stesso.

Il feromone sessuale di *G. molesta* è costituito dal componente principale (*Z*)-8-dodecen-1-il acetato (Z8-12:OAc) (Roelofs *et al.*, 1969) e dai componenti secondari (*E*)-8-dodecen-1-il acetato (E8-12:OAc), (Z)-8-dodecen-1-olo (Z8-12:OH)

e dal dodecanolo (12:OH) (Cardè *et al.*, 1979). I primi tre componenti, agendo simultaneamente, innescano nel maschio il comportamento sessuale (Baker e Cardè, 1979). E' possibile affermare che la miscela feromonale ha effetti sull'efficacia della confusione per tale fitofago. Charlton e Cardè (1981), per esempio, hanno dimostrato che una miscela dei tre componenti Z8-12:OAc, E8-12:OAc e Z8-12:OH (approssimativamente 100:7:10) risultava essere molto più efficiente nelle catture dei maschi in trappole innescate con feromone rispetto al blend costituito da solo due delle sostanze in rapporto tra loro 100:7. Un valido diffusore di feromone in grado di indurre confusione sessuale in *G. molesta* deve contenere i tre componenti sopra citati, nel reciproco rapporto 100:6:1 (Trimble *et al.*, 2004).

In studi inerenti la relazione esistente tra l'adattamento sensoriale delle antenne di G. molesta e la concentrazione aerea del feromone, Trimble e Marshall (2010) hanno stimato riduzioni del 16 e del 28% nella sensibilità del lepidottero al feromone, rispettivamente a seguito di un'esposizione di 15 e 30 minuti ad una concentrazione di 1 ng feromone/m<sup>3</sup> di aria, pari a quella misurata in frutteti trattati con il feromone per evitare l'accoppiamento. In tale studio fu utilizzato unicamente il componente principale (Z8-12:OAc) e, per tale ragione, il ruolo dell'adattamento sensoriale quale meccanismo operativo nella confusione sessuale di questa specie potrebbero essere stato sottostimato. Il primo obiettivo del presente lavoro è stato quello di determinare se la continua esposizione ai componenti secondari E8-12:OAc e Z8-12:OH possa indurre adattamento sensoriale verso gli stessi, e se l'esposizione ad uno dei tre possa stimolare l'adattamento verso le altre due sostanze del feromone (adattamento incrociato). Il secondo intento è stato relativo alla comparazione del grado di adattamento dopo esposizione delle antenne al componente principale del feromone ed a miscele di Z8-12:OAc, E8-12:OAc e Z8-12:OH. Il terzo scopo è stato di confrontare il comportamento di volo dei maschi in risposta a femmine in fase di richiamo a seguito di prolungata esposizione a Z8-12:OAc ed a miscele dei tre componenti.

# 2.2.1b - *Grapholita molesta*: origine e diffusione

La tignola, originaria della Cina settentrionale (Bovey, 1966; Zocchi, 1980), fu poi segnalata in Giappone (1899) ed in Australia (1909), ma l'esatta identificazione e descrizione avvenne solo nel 1916, quando raggiunse il continente americano. In Europa fu rinvenuta per la prima volta in Italia (Liguria) intorno al 1920 (Tremblay, 1990); successivamente si diffuse in Nazioni Europee limitrofe (Francia, Svizzera, Austria, Germania), in Marocco, Australia, Stati Uniti, Canada ed America meridionale (Argentina).

#### 2.2.2b - Uovo

Si presenta di forma lenticolare e di colore biancastro opalescente alla deposizione, successivamente vira verso l'arancio e si evidenzia un anello rossastro. L'ultima fase nota come "punto nero" è dovuta alla trasparenza del capo torace della larvetta ormai pronta allo sgusciamento. Le dimensioni dell'uovo sono 1 x 0,9 mm (Tremblay, 1990).

### 2.2.3b - Larva

Il colore può essere giallo-rosato o rossastro. Il capo si presenta più scuro con due ampie macchie brune nell'ambito delle quali si trova una banda centrale più chiara. Il pronoto è caratterizzato da alcune macchie evanescenti in prossimità del margine posteriore e sui lati. L'addome porta 4 verruche pilifere dorsali su ciascun segmento e pseudo zampe con uncini ambulacrali in numero di 45 per quelle addominali e 40 per le anali (Silvestri, 1943). Il pettine anale è di solito munito di 4-5 denti, alcuni dei quali più piccoli. Le setole dorsali terminali delle zampe toraciche sono appiattite e lunghe quanto o più delle unghie (Baker, 1963). Le dimensioni della larva variano dai 12 ai 14 mm di lunghezza (Tremblay, 1990).

## 2.2.4b - Crisalide

Il colore può essere bruno chiaro o rossastro; l'estremità è ornata di 5 spine dorsali a base larga e ben distanziate fra loro ed il cremaster è fornito di setole uncinate (Pollini, 1998). Le dimensioni della crisalide variano dai 6 ai 7 mm di lunghezza (Fig. XIII).



Figura XIII.- Crisalidi ottenute dall'allevamento in laboratorio 2.2.5b - Adulto

Le ali anteriori bruno-nerastre sono interessate da numerose virgolette biancastre sul margine costale e da 4-5 linee ondulate sul margine anale. E', inoltre, spesso presente una macchiolina biancastra in posizione preocellare. Tale colorazione è spesso poco evidente e potrebbe essere necessario l'esame dell'armatura genitale maschile, caratteristica per la forma delle valve e per i numerosi *cornuti* presenti sull'edeago. Le dimensioni del fitofago variano dai 12 ai 15 mm di apertura alare (Tremblay, 1990) (Fig.XIV).



Figura XIV.- Adulti in allevamento.

# 2.2.6b - Biologia e comportamento

Lo svernamento ha luogo come larva matura in diapausa imbozzolata per lo più sotto la corteccia degli alberi. In Italia compie agevolmente perlomeno 4-5 generazioni annue. Nelle Regioni meridionali i primi adulti compaiono già a metà marzo. L'accoppiamento si ha già dopo 2-3 giorni dallo sfarfallamento ed è spesso preceduto da voli di dispersione. Le uova, una cinquantina per ogni femmina, sono deposte di preferenza nella pagina inferiore delle foglie e la ovideposizione, che è influenzata dalla temperatura, dura mediamente 10 giorni. Le larvette neonate presentano un comportamento "vagabondo" che dura da pochi minuti a qualche giorno per poi penetrare nell'asse dei germogli, scavandovi una galleria discendente la cui presenza è indicata dall'appassire della foglia attraverso cui è avvenuta la penetrazione. Nel germoglio la larvetta compie le prime due età per passare poi in un successivo germoglio in cui compie altre due mute; in un terzo germoglio compie la

quinta ed ultima età. Raggiunta la maturità la larva si sposta nei ripari del tronco o raggiunge il terreno alla ricerca di una protezione in cui si costruisce un bozzoletto e si incrisalida..

Il danno è generalmente più grave nelle piante in vivaio ed in quelle nei primi anni di impianto (Tremblay, 1990).

## 3.3b Materiali e Metodi

## 3.3.1b - Insetti

Le crisalidi di *G. molesta* sono state ottenute in laboratorio da una popolazione suscettibile agli insetticidi (Pree *et al.*, 1998). Le larve sono state allevate su mele non mature, del diametro di 3-4 cm, che non avevano subito trattamenti con fitofarmaci (Pree, 1985) (Fig. XV). Le crisalidi sono state separate per sesso e poste in gabbie di plexiglas (33 x 33 x 33cm) collocate in camere distinte, al fine di impedire la coesistenza dei due sessi tra gli adulti emergenti (Fig. XVI). Le condizioni di allevamento sono state le seguenti: T = 23°C; UR = 60 %; Fotoperiodo = 16L:8B.



Fig. XV.- Allevamento



Fig. XVI.- Gabbie utilizzate per la sperimentazione

### 3.3.2b - Feromoni

Il componente principale del feromone di *G. molesta* (*Z*)-8-dodecen-1-il acetato (Z8-12:OAc) (Roelofs *et al.*, 1969), ed i componenti minori (*E*)-8-dodecen-1-il acetato (E8-12:OAc) e (*Z*)-8-dodecen-1-olo (Z8-12:OH) (Cardè *et al.*, 1979) sono stati forniti da Pherobank, Plant Research International, Wageningen, The Netherlands. Il componente principale del feromone Z8-12:OAc era chimicamente puro al 99.0% e conteneva lo 0.2% di (*E*)-8-dodecen-1-il acetato (E8-12:OAc).

## 3.3.3b - Dose feromone – risposta EAG

L'effetto della dose di Z8-12:OAc, E8-12:OAc e Z8-12:OH sulla risposta elettroantennografica (EAG) di G. molesta è stato determinato usando il sistema EAG Syntech (Hilversum, The Netherlands) descritto da Trimble e Marshall (2007) (Fig. XVI). Un flusso d'aria di 21/min veniva rilasciato sulla preparazione antennale attraverso un tubo in vetro di 30 cm, sul quale era presente un foro (2 mm di diametro) posizionato a 10 cm dall'uscita. Le sostanze da saggiare (50 µl) applicate su rettangoli (1 x 5 cm) di carta filtro Whatman® No. 1 (Whatman International Ltd, U.K.) sono state collocate sotto cappa per 30 min, per permettere l'evaporazione del solvente, ed inserite in una pipetta Pasteur della capacità di ~ 3 ml. La punta della pipetta veniva inserita nel flusso d'aria ed un "puff" della durata di 0,5 s e di capacità pari a 5ml di aria rilasciava l'odore nel tubo. L'antenna è stata stimolata prima con il controllo (i.e. 50 µL di etanolo puro al 99,9%) (Commercial Alcohols Inc., Brampton, Ontario) e successivamente con 10 dosi crescenti di un componente del feromone (da  $1.0 \times 10^{-11}$  a  $1.0 \times 10^{-2}$  g) ad intervalli di 1 minuto. La sorgente di odore veniva rinnovata dopo 4 ore. Per ogni componente del feromone sono state saggiate 10 antenne provenienti da altrettanti individui.



Figura XVI.- Elettroantennografo

3.3.4b - Adattamento sensoriale a Z8-12:OAc, E8-12:OAc e Z8-12:OH dopo prolungata esposizione ad un componente

Il sistema elettroantennografico ed i metodi descritti da Trimble e Marshall (2010) sono stati utilizzati per indurre e misurare l'adattamento sensoriale in maschi di *G. molesta* a seguito di continua esposizione delle antenne alle sostanze secondarie del feromone, e per verificare l'eventuale manifestarsi di adattamento incrociato tra i tre componenti del feromone della specie. Il sistema di somministrazione del feromone (pheromone sprayer), messo a punto da El-Sayed *et al.*, (1999) e modificato da Trimble e Marshall (2007) per consentire la nebulizzazione del feromone in etanolo ad aliquote molto basse (ovvero 0,125 μl/min), è stato utilizzato per condizionare il flusso d'aria con il feromone. I componenti dello sprayer sono rappresentati da una pompa da microdialisi, una siringa da 50 μL connessa ad un erogatore spray con un tubo in teflon (FEP) ed un generatore di funzione che stimola

dispositivo piezoelettrico collegato all'ugello nebulizzatore. La punta dell'erogatore veniva posizionata nel mezzo di un flusso d'aria che fluiva nel tubo attraverso un secondo foro (Ø 2 mm) localizzato a 20 cm dall'estremità. Le antenne sono state sottoposte ai seguenti trattamenti: Controllo 1 (flusso d'aria umidificato e filtrato mediante passaggio su carbone attivo, 2 l/min) (Aria); Controllo 2 (aria + EtOH, 0,125 μl/min) ed aria, EtOH e feromone 8,0 mg/ml etanolo dei relativi stimoli Z8-12:OAc, E8-12:OAc o Z8-12:OH. Come già accennato, l'etanolo e le soluzioni di feromone in etanolo sono state atomizzate a 0,125 µl/min. E' noto da precedenti studi che 8,0 mg di Z8-12:OAc/ml etanolo rilasciati in un flusso d'aria di 2 l/min a 0,125 µl/min producono una risultante concentrazione aerea pari a 0,5 ng di feromone/ml aria (Trimble e Marshall 2007, 2010). L'esperimento iniziava eseguendo una prima misurazione della risposta elettroantennografica al controllo (etanolo 50 µl) ed in sequenza, ad intervalli di un minuto, erano somministrati gli stimoli 10 µg Z8-12:OAc, 100 μg E8-12:OAc e 100 μg Z8-12:OH. L'esposizione ad etanolo ed ai trattamenti di Z8-12:OAc, E8-12:OAc o Z8-12:OH iniziava entro 15 secondi dalla misurazione dell'ultima risposta EAG al feromone, inserendo l'erogatore nel flusso d'aria del tubo. Trascorsi 15 min di esposizione al trattamento, veniva misurata una seconda risposta EAG al controllo e veniva ripetuta la procedura iniziale. Per ogni trattamento sono state utilizzate 5 antenne provenienti da altrettanti individui. Ogni componente del sistema di rilascio del trattamento (siringa da 50 µL, tubicino in teflon, erogatore spray e tubo per il rilascio di aria) era dedicato esclusivamente al singolo trattamento. Il tubo, invece, veniva rimosso, lavato con acqua distillata e detergente, sciacquato con acetone e collocato per tutta la notte in stufa termostatica (200°C) al termine di ogni esperimento.

3.3.5b - Adattamento sensoriale a Z8-12:OAc, E8-12:OAc e Z8-12:OH dopo prolungata esposizione a Z8-12:OAc ed a due miscele.

Il sistema EAG, accennato nella sezione precedente, è stato utilizzato per comparare il grado di adattamento sensoriale in antenne di G. molesta dopo esposizione ad 1 ng/ml aria di Z8-12:OAc ed a due miscele complete dei tre componenti del feromone. Le antenne sono state sottoposte ai seguenti trattamenti: Controllo 1 (flusso d'aria umidificato e filtrato su carbone attivo, 2 l/min) (aria); Controllo 2 (aria + EtOH, 0,125  $\mu$ l/min); aria + etanolo + 1,6 x 10<sup>-5</sup> mg Z8-12:OAc/ml EtOH (Z8-12:OAc); 1,6 x 10<sup>-5</sup> mg di Z8-12:OAc, E8-12:OAc e Z8-12:OH nei rapporti 1:1:1 o 93:6:1. L'etanolo e le soluzioni di feromone erano nebulizzate nel flusso d'aria a 0,125 µl/min. Il feromone presente in soluzione ad una concentrazione di 1,6 x 10<sup>-5</sup> mg e rilasciato a 0,125 µl/min in un flusso d'aria di 2 1/min, si traduce in una risultante concentrazione aerea di 1,0 x 10<sup>-6</sup> ng di feromone/ml aria pari ad 1 ng feromone/m<sup>3</sup> aria. La riduzione in risposta sensoriale stimata dopo 15 min di esposizione delle antenne di G. molesta a tale concentrazione aerea del componente principale del feromone (Z8-12:OAc) risulta corrispondente al 16 % (Trimble e Marshall, 2010). L'esperimento iniziava accoppiando un trattamento ad uno stimolo (10 µg Z8-12:OAc, 100 µg E8-12:OAc e 100 µg Z8-12:OH), entrambi selezionati casualmente. L'esperimento prevedeva l'esecuzione di una prima misurazione della risposta elettroantennografica al controllo (etanolo 50 ul) ed un minuto dopo la registrazione della risposta allo stimolo di feromone, entro 15 sec dal termine della quale iniziava l'esposizione ad uno dei trattamenti (etanolo, Z8-12:OAc, blend 1:1:1 e blend 93:6:1). Trascorsi 15 min, veniva registrata una seconda risposta EAG al controllo ed un minuto dopo al feromone. Sono state eseguite 5 repliche per ogni combinazione trattamento-stimolo. Il sistema di rilascio del trattamento era costituito da una siringa da 50 µL, un tubicino in teflon, un erogatore spray ed un tubo per il rilascio di aria,; tali componenti sono stati esclusivamente dedicati al singolo trattamento. Il tubo, invece, veniva rimosso, lavato con acqua distillata e detergente, sciacquato con acetone e collocato, per tutta la notte, in stufa termostatica (200°C) al termine di ogni esperimento.

# 3.3.6b - Risposte comportamentali dei maschi di *G. molesta* dopo esposizione a Z8-12:OAc ed a due miscele

L'effetto dei trattamenti (aria, EtOH, Z8-12:OAc, blend 1:1:1 e 93:6:1 dei tre componenti del feromone) sulla risposta comportamentale di maschi di G. molesta in presenza di femmine vergini in fase di richiamo sessuale, è stato osservato in un tunnel di volo in acrilico (55,5 cm larghezza x 87 cm altezza x 160 cm lunghezza) (El-Sayed et al., 2001). I parametri adottati sono di seguito riportati: velocità dell'aria 30 cm/sec, temperatura 22-24°C, umidità relativa 50-70%. L'intensità luminosa sul piano del tunnel di volo era corrispondente a 75 lux mentre nel punto di rilascio del maschio aumentava a 150 lux. Il pheromone sprayer utilizzato era lo stesso del precedente esperimento. Gli esperimenti sono stati eseguiti durante le tre ore precedenti l'inizio della scotofase, in corrispondenza del periodo di maggiore attività sessuale di maschi e femmine di G. molesta (Baker e Cardè, 1979). Un'ora prima di iniziare la prova, tre femmine vergini di 1-2 giorni di età erano isolate singolarmente in tubi di vetro (2 x 2 cm) chiusi ad ambo le estremità da una rete in rame con maglia di 0,8 x 0,8 mm. Le gabbiette contenenti le femmine erano posizionate su un supporto a T collocato nella parte terminale del tunnel opposta al punto di rilascio del maschio. I maschi di 2-3 giorni di età erano collocati individualmente in tubi in vetro per il rilascio (15 x 2,5 cm) le cui estremità erano chiuse con cotone idrofilo e posizionati sul piano del tunnel di volo per l'acclimatamento degli individui. Prima di ogni prova, un maschio veniva trasferito in un tubo simile a quello utilizzato per le femmine e posto per 15 minuti in una beuta in cui fluiva uno dei trattamenti. Trascorso il tempo dovuto, l'individuo veniva trasferito nuovamente nel tubo di partenza e collocato anch'esso su un apposito supporto; se l'individuo non manifestava un comportamento sessuale entro un certo

lasso di tempo, veniva spostato dal centro prima verso destra e poi verso sinistra in corrispondenza delle femmine (tre tentativi).

#### 3.3.7b - Analisi statistica dei dati

Le analisi statistiche dei dati sono state eseguite utilizzando il software JMP® 7.0 (SAS Institute, Cary, North Carolina). Le risposte EAG ed i tempi di inizio delle risposte comportamentali sono stati valutati per la bontà di adattamento (goodnessof-fit) di una distribuzione normale utilizzando il test Shapiro-Wilk. L'omogeneità delle varianze delle medie è stata analizzata usando il test Bartlett. Le analisi parametriche sono state utilizzate per verificare la significatività dell'effetto del trattamento quando i dati erano distribuiti normalmente e le varianze delle medie risultavano omogenee. Le analisi non parametriche sono state utilizzate nel caso in cui uno o entrambi i precedenti criteri non fossero soddisfatti. La significatività della dose di Z8-12:OAc, E8-12:OAc e Z8-12:OH sulla risposta EAG è stata analizzata utilizzando il test di Friedman o analisi non parametrica della varianza (ANOVA) per blocchi di dati (Zar, 2010). Un test non parametrico (analogo al Tukey parametrico) per randomizzare un blocco completo ANOVA (Zar, 2010) è stato utilizzato per identificare significativamente la differente media delle risposte EAG. L'effetto del controllo e dei trattamenti 0,5 ng e 1,0 x 10<sup>-6</sup>ng feromone/ml aria sulla risposta EAG media al controllo e la risposta EAG netta agli stimoli di feromone è stato verificato usando il test non parametrico Wilcoxon Sign-Rank. L'effetto del controllo e dei trattamenti 1.0 x 10<sup>-6</sup> ng feromone/ml aria, sul numero dei maschi che iniziavano ognuna delle cinque fasi comportamentali di volo, è stato valutato usando l'analisi multivariata (modello di regressione logistica) e per identificare trattamenti significativamente differenti è stato utilizzato il "test rapporto di verosimiglianza" (likelihood ratio test) (Freund et al., 2003). Nel caso in cui tutti i 15 individui saggiati avessero manifestato un comportamento lanalisi della tabella di contingenza conteneva uno zero strutturale (Ten Have, 2010); questi trattamenti sono stati eliminati dall'analisi (Homser e Lemeshow, 2000). L'analisi di regressione logistica è stata, inoltre, usata per verificare la significatività del trattamento sul numero di maschi che manifestavano un comportamento al primo tentativo e che quindi si attivavano in risposta alla femmina in posizione centrale. Il test non parametrico Kruskal-Wallis è stato impiegato per analizzare la significatività del trattamento sul tempo medio richiesto dal maschio per manifestare un comportamento.

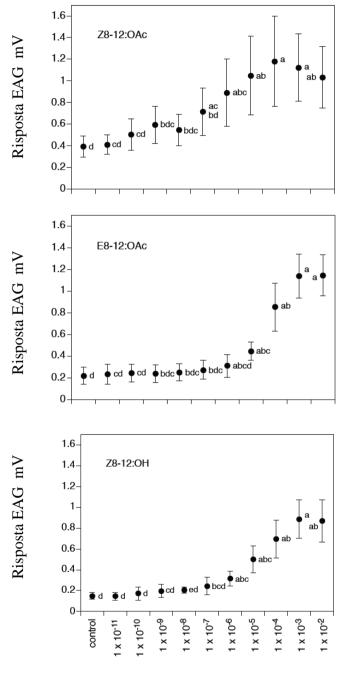
## 4.4b - Risultati

# 4.4.1b - Risposta EAG

La risposta elettroantennografica di G. molesta dipende dalla dose dello stimolo Z8-12:OAc ( $\chi^2_{10}$ = 94,0; P < 0,001) (Fig.VII). Una risposta significativamente maggiore rispetto al controllo è stata rilevata alla dose 1 x  $10^{-6}$  g (1 µg) del feromone. Non è stata riscontrata alcuna modifica nella risposta a dosi maggiori di feromone. La dose 1 x  $10^{-5}$  g (10 µg) è stata selezionata per essere utilizzata in esperimenti di misurazione dell'effetto del trattamento sulla risposta delle antenne. Questa dose è stata impiegata anche da Trimble e Marshall (2007, 2010) negli studi relativi all'adattamento sensoriale delle antenne di G. molesta.

Le risposte elettroantennografiche sono state, inoltre, influenzate dalla dose somministrate di E8-12:OAc ( $\chi^2_{10}=83,4$ ; P<0,001) e di Z8-12:OH ( $\chi^2_{10}=92,8$ ; P<0,001) (Fig. VII). Al fine di indurre una risposta maggiore al controllo è stata richiesta una dose di 1 x 10<sup>-5</sup> g (10 µg) per E8-12:OAc e di 1 x 10<sup>-6</sup> g (1 µg) per Z8-12:OH. Nessuna variazione statisticamente apprezzabile è stata rilevata a dosi maggiori di questi componenti. La risposta elettroantennografica alla dose di 1 x 10<sup>-4</sup> g (100 µg) è stata circa 4 volte maggiore rispetto al controllo ed è stata, quindi, selezionata per essere utilizzata in esperimenti di misurazione dell'effetto del trattamento sulla risposta delle antenne.

Fig.VII.- Curva dose-risposta (mV±DS) di *G. molesta* a Z8-12:OAc, E8-12:OAc e Z8-12:OH. 10 dosi crescenti da 1 x  $10^{-11}$  µg/µL a 1 x  $10^{-2}$  µg/µL.



Dose feromone

# 4.4.2b - Adattamento sensoriale a Z8-12:OAc, E8-12:OAc e Z8-12:OH in seguito a prolungata esposizione ad un componente

La riduzione registrata nella media della risposta EAG rispetto al controllo stimolo, dopo 15 minuti di esposizione, è stata del 49.7% per Z8-12:OAc, del 33.5% per E8-12:OAc e del 63.2% per Z8-12:OH (Tab. 7).

Tab. 7.- Media±DS della risposta elettroantennografica (mV) delle antenne di maschi di *G. molesta* ad un controllo stimolo prima e dopo 15 minuti di continua esposizione ai 5 trattamenti.

Trattamento	Risposte EAG media±DS		Wilcoxon Sign-Rar	
				est
	Pre-	Post-	$\overline{Z}$	P
	esposizione	esposizione		
Controllo 1 (Aria)	0.126±0.020	0.117±0.013	- 4.50	0.1563
Controllo 2 (Aria +	$0.200 \pm 0.025$	$0.179 \pm 0.024$	- 5.50	0.0938
Etanolo)				
Z8-12:OAc	$0.167 \pm 0.042$	$0.084 \pm 0.017$	- 7.50	0.0313
E8-12:OAc	$0.158 \pm 0.020$	$0.105 \pm 0.015$	- 7.50	0.0313
Z8-12:OH	$0.261 \pm 0.057$	$0.096 \pm 0.002$	- 7.50	0.0313

Sono state dedicate 5 antenne ad ogni trattamento. Le antenne sono state esposte a 6,25  $\mu$ L etanolo/mL aria nel Controllo 2 ed a 0,5 ng feromone/mL aria nei trattamenti Z8-12:OAc, E8-12:OAc e Z8-12:OH. L'effetto dei trattamenti è stato misurato utilizzando i seguenti stimoli 10  $\mu$ g Z8-12:OAc, 100  $\mu$ g E8-12:OAc e 100  $\mu$ g Z8-12:OH somministrati ad intervalli in un minuto, nell'ordine della lista, prima e dopo 15 minuti di esposizione al trattamento.

La media della risposta netta EAG, dopo 15 minuti di esposizione al trattamento Aria, ha subito una riduzione del 37% quando Z8-12:OAc è stato

impiegato come stimolo e del 30% con lo stimolo E8-12:OAc. E' stata registrata una riduzione marginalmente non significativa (P=0.0625) del 28% nella media della risposta EAG netta a Z8-12:OAc dopo 15 minuti di esposizione ad Aria. In seguito ad esposizione al trattamento Aria + Etanolo, è stata rilevata una riduzione non significativa (P=0.0625) nella media della risposta EAG del 20% e del 9% quando impiegati gli stimoli Z8-12:OAc ed E8-12:OAc. La riduzione nella risposta media EAG a Z8-12:OAc, E8-12:OAc e Z8-12:OH è stata  $\geq$  98% in seguito ad esposizione ai trattamenti Z8-12:OAc, E8-12:OAc ed Z8-12:OH. Il test Wilcoxon Sign-Rank non è stato adoperato per saggiare la significatività di riduzioni tanto ampie (Tab. 8).

Tab. 8.- Media±DS della risposta elettroantennografica (mV) delle antenne di maschi di *G. molesta* ai tre stimoli del feromone, prima e dopo 15 minuti di continua esposizione ai 5 trattamenti.

Trattamento	Stimolo	Risposte EA	G media±DS	Wilcoxon Sign-Rank test		
		Pre-esposizione	Post-esposizione	Z	P	
	Z8-12:OAc	0.879±0.210	0.553±0.180	- 7.50	0.0313	
Controllo 1 (Aria)	E8-12:OAc	0.601±0.117	$0.420\pm0.084$	- 7.50	0.0313	
	Z8-12:OH	0.390±0.084	$0.279\pm0.057$	- 6.50	0.0625	
	Z8-12:OAc	1.176±0.244	0.920±0.125	- 6.50	0.0625	
Controllo 2 (Aria + Etanolo)	E8-12:OAc	$0.524\pm0.097$	$0.476 \pm 0.108$	- 6.50	0.0625	
	Z8-12:OH	$0.418\pm0.071$	$0.430\pm0.079$	1.50	0.5938	
Z8-12:OAc	Z8-12:OAc	0.677±0.204	$0.008\pm0.008$	-	-	
	E8-12:OAc	$0.538\pm0.128$	$0.004\pm0.007$	-	-	
	Z8-12:OH	$0.434\pm0.109$	$0.005 \pm 0.007$	-	-	
E8-12:OAc	Z8-12:OAc	0.535±0.169	0.011±0.018	-	-	
	E8-12:OAc	$0.378 \pm 0.058$	$0.000\pm0.000$	-	-	
	Z8-12:OH	$0.244\pm0.052$	$0.002\pm0.005$	-	-	
Z8-12:OH	Z8-12:OAc	$0.980\pm0.175$	0.011±0.016	-	-	
	E8-12:OAc	$0.728\pm0.153$	$0.000\pm0.000$	-	-	
	Z8-12:OH	$0.644\pm0.155$	$0.000\pm0.000$	-	-	

Sono state dedicate 5 antenne ad ogni trattamento.

Le antenne sono state esposte a 6.25 μL etanolo/mL aria nel Controllo 2 ed a 0.5 ng feromone/mL aria nei trattamenti Z8-12:OAc, E8-12:OAc e Z8-12:OH. L'effetto dei trattamenti è stato misurato utilizzando i seguenti stimoli 10 μg Z8-12:OAc, 100 μg E8-12:OAc e 100 μg Z8-12:OH somministrati ad intervalli in un minuto, nell'ordine della lista, prima e dopo 15 minuti di esposizione al trattamento.

4.4.3b - Adattamento sensoriale a Z8-12:OAc, E8-12:OAc e Z8-12:OH in seguito a prolungata esposizione a Z8-12:OAc ed a due miscele dei tre componenti

Il trattamento Z8-12:OAc, E8-12:OAc ed Z8-12:OH (1:1:1) abbinato allo stimolo Z8-12:OAc ha determinato una riduzione nella risposta elettroantennografica pari al 40.9%. Dopo 15 minuti di esposizione delle antenne al trattamento Aria + Etanolo è stata registrata una riduzione del 20% marginalmente non significativa (P = 0.0625) nella risposta EAG media al controllo stimolo quando Z8-12:OAc è stato impiegato come componente stimolo. Inoltre, è stata riscontrata una riduzione del 25% non significativa (P = 0.0625) rispetto al controllo stimolo con la miscela 1:1:1 abbinata allo stimolo E8-12:OAc. Dopo 15 minuti di esposizione al blend 93:6:1 di Z8-12:OAc, E8-12:OAc ed Z8-12:OH è stata rilevata una riduzione non significativa (P = 0.0625) pari al 46% quando impiegato lo stimolo Z8-12:OAc (Tab. 9).

Tab. 9 Media±DS della risposta elettroantennografica (mV) delle antenne di maschi di *G. molesta* ad un controllo stimolo prima e dopo 15 minuti di continua esposizione ai 5 trattamenti, quando usati i tre componenti del feromone come stimoli.

Trattamento	Stimolo	Risposte EAG media±DS		Wilcoxon Sign-Rank to	
		Pre-esposizione	Post-esposizione	Z	P
	Z8-12:OAc	$0.164\pm0.060$	0.149±0.075	- 5.5	0.0938
Controllo 1 (Aria)	E8-12:OAc	$0.163 \pm 0.072$	$0.165 \pm 0.051$	0.0	0.500
	Z8-12:OH	$0.119 \pm 0.052$	$0.109\pm0.048$	- 5.5	0.0938
	Z8-12:OAc	$0.125 \pm 0.030$	$0.100\pm0.017$	- 6.5	0.0625
Controllo 2 (Aria + Etanolo)	E8-12:OAc	$0.125 \pm 0.074$	$0.155 \pm 0.060$	3.5	0.7813
	Z8-12:OH	$0.114\pm0.021$	0.103±0.016	- 4.5	0.1563
	Z8-12:OAc	$0.146 \pm 0.066$	$0.128 \pm 0.047$	- 2.5	0.3125
Z8-12:OAc	E8-12:OAc	$0.103\pm0.035$	0.101±0.049	- 2.5	0.3125
	Z8-12:OH	$0.123\pm0.043$	0.096±0.018	- 5.5	0.1250
Z8-12:OAc +	Z8-12:OAc	$0.137 \pm 0.055$	0.081±0.021	- 7.5	0.0313
E8-12:OAc + Z8-12:OH	E8-12:OAc	$0.150\pm0.036$	$0.112\pm0.032$	- 6.5	0.0625
(1:1:1)	Z8-12:OH	$0.120\pm0.023$	$0.093\pm0.030$	- 5.5	0.0938
Z8-12:OAc +	Z8-12:OAc	$0.172\pm0.033$	0.093±0.023	- 6.5	0.0625
E8-12:OAc + Z8-12:OH	E8-12:OAc	$0.149\pm0.041$	0.113±0.030	- 5.5	0.0938
(93:6:1)	Z8-12:OH	0.136±0.056	$0.102 \pm 0.028$	- 5.5	0.0938

L'esposizione di G. molesta al trattamento Aria ed Aria + Etanolo per un periodo di tempo pari a 15 minuti non ha influenzato significativamente la media nella risposta EAG netta verso i tre componenti del feromone. In seguito ad esposizione a Z8-12:OAc è stata rilevata una riduzione non significativa (P = 0.0625) del 33% per E8-12:OAc e del 64% per Z8-12:OH. La media della risposta EAG netta a Z8-12:OAc ha subito una riduzione del 70% in seguito ad esposizione al blend 1:1:1 dei tre componenti, mentre con la miscela 93:6:1 è stata rilevata una riduzione del 79% e del 32% rispettivamente per Z8-12:OAc ed E8-12:OAc. Inoltre, è stata notata un'insignificante riduzione (P = 0.0625) del 49% nella risposta a Z8-12:OH (Tab. 10).

Tab. 10.- Media±DS della risposta elettroantennografica (mV) delle antenne di maschi di *G. molesta* ad uno dei tre stimoli del feromone prima e dopo 15 minuti di continua esposizione ai 5 trattamenti.

Trattamento	Stimolo	Risposte EAG media±DS		Wilcoxon Sign-Rank t	
		Pre-esposizione	Post-esposizione	Z	P
	Z8-12:OAc	0.732±0.312	0.712±0.368	1.5	0.5938
Controllo 1 (Aria)	E8-12:OAc	$0.424\pm0.244$	0. 368±0.136	- 2.5	0.3125
	Z8-12:OH	$0.179 \pm 0.058$	$0.209\pm0.048$	4.5	0.8438
	Z8-12:OAc	$0.430\pm0.177$	$0.468 \pm 0.330$	0.5	0.5000
Controllo 2 (Aria + Etanolo)	E8-12:OAc	$0.453 \pm 0.175$	0.521±0.241	4.5	0.8438
	Z8-12:OH	$0.199 \pm 0.078$	$0.300\pm0.070$	7.5	0.9688
	Z8-12:OAc	$0.664\pm0.339$	$0.574\pm0.047$	- 3.5	0.2188
Z8-12:OAc	E8-12:OAc	$0.240\pm0.100$	0.162±0.018	- 6.5	0.0625
	Z8-12:OH	$0.257 \pm 0.093$	$0.092\pm0.080$	- 6.5	0.0625
Z8-12:OAc +	Z8-12:OAc	$0.800\pm0.243$	$0.242\pm0.278$	- 7.5	0.0313
E8-12:OAc + Z8-12:OH	E8-12:OAc	$0.324\pm0.151$	0.235±0.309	- 4.5	0.1563
(1:1:1)	Z8-12:OH	$0.233 \pm 0.152$	0.228±0.130	- 1.5	0.4063
Z8-12:OAc +	Z8-12:OAc	0.496±0.371	0.105±0.124	- 7.5	0.0313
E8-12:OAc + Z8-12:OH	E8-12:OAc	$0.386 \pm 0.227$	0.263±0.271	- 7.5	0.0313
(93:6:1)	Z8-12:OH	0.197±0.056	$0.101 \pm 0.097$	- 6.5	0.0625

Per ogni abbinamento trattamento-stimolo sono state utilizzate 5 antenne. Le antenne sono state esposte a 6,25  $\mu$ L etanolo/mL aria nel Controllo 2 ed a 1,0 x 10<sup>-6</sup> ng feromone/mL aria nei trattamenti Z8-12:OAc, E8-12:OAc e Z8-12:OH.

4.4.4b Risposte comportamentali dei maschi sottoposti al trattamento Z8-12:OAc ed alle due miscele

Le condizioni del trattamento a cui erano esposti i maschi di *G. molesta*, per un periodo di tempo pari a 15 minuti, prima di essere collocati all'interno di un tunnel di volo, in presenza di femmine in fase di richiamo, non ha prodotto significativi effetti sul tempo richiesto dall'individuo per iniziare le cinque caratteristiche fasi del volo. Tuttavia, il tempo medio richiesto dai maschi per iniziare il take-off è stato del 36% maggiore quando sono stati trattati con la miscela (1:1:1) rispetto al trattamento Z8-12:OAc. L'effetto del trattamento su questi comportamenti non è stato statisticamente rilevabile (Tab. 11; 12; 13).

Tab. 11.- Numero di maschi di *G. molesta* che, in tunnel di volo, hanno iniziato le successive fasi di volo verso una femmina in fase di richiamo dopo esposizione ad uno dei 5 trattamenti

Trattamento	Numero (N = 15)				
	Activation	Take-off	Lock-on	Close-in	Touchdown
Aria	15	15	15 <sup>a</sup>	15 <sup>a</sup>	15 <sup>a</sup>
Aria + Etanolo	15	15	15 <sup>a</sup>	15 <sup>a</sup>	15 <sup>a</sup>
Z8-12:OAc	15	15	15 <sup>a</sup>	15 <sup>a</sup>	15 <sup>a</sup>
Z8-12:OAc +	<del>.</del>				
E8-12:OAc + Z8-12:OH	15	15	14	14	14
(1:1:1)					
Z8-12:OAc +	-				
E8-12:OAc + Z8-12:OH	15	15	13	13	13
(93:6:1)					
Analisi di regressione logistica	-				
$\chi^2$	-	-	0.3768	0.3768	0.3768
df	-	-	1	1	1
P	-	-	0.5393	0.5393	0.5393

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> Esclusi dall'analisi. Numero dei maschi in parentesi. I maschi di *G. molesta* sono stati esposti a 6,25 μL etanolo/mL aria in Aria + Etanolo ed 1,0 x 10<sup>-6</sup> ng feromone/mL aria nei trattamenti (1:1:1) e (93:6:1) di Z8-12:OAc + Z8-12:OH.

Tab. 12.- Numero di maschi di *G. molesta* che, in tunnel di volo, hanno iniziato le successive fasi di volo verso una femmina in fase di richiamo, al primo dei tre tentativi, dopo esposizione ad uno dei 5 trattamenti

Trattamento	Numero (N = 15)				
	Activationttivaction	Take-off	Lock-on	Close-in	Touchdown
Aria	15	15	12	12	12
Aria + Etanolo	15	14	11	11	11
Z8-12:OAc	15	15	13	13	13
Z8-12:OAc +	-				
E8-12:OAc + Z8-12:OH	15	15	11	11	11
(1:1:1)					
Z8-12:OAc +					
E8-12:OAc + Z8-12:OH	15	15	7	7	7
(93:6:1)					
Analisi di regressione logistica					
$\chi^2$	-	-	6.6281	6.6281	6.6281
df	-	-	4	4	4
P	-	-	0.1569	0.1569	0.1569

Numero dei maschi in parentesi. I maschi di *G. molesta* sono stati esposti a 6,25 μL etanolo/mL aria in Aria + Etanolo ed 1,0 x 10<sup>-6</sup> ng feromone/mL aria nei trattamenti (1:1:1) e (93:6:1) di Z8-12:OAc + E8-12:OAc + Z8-12:OH.

Tab. 13.- Media±DS del tempo (sec) richiesto dai maschi di *G. molesta* per iniziare le diverse fasi di volo verso una femmina in fase di richiamo dopo esposizione ad uno dei 5 trattamenti.

Trattamento	Numero (N = 15)				
	Attivaction	Take-off	Lock-on	Close-in	Touchdown
Aria	4.13±2.94 (15)	57.51±59.94 (15)	3.88±4.75 (15)	3.24±1.61 (15)	1.53±0.96 (15)
Aria + Etanolo	5.34±4.14 (15)	53.79±49.50 (15)	4.34±2.03 (15)	2.95±0.97 (15)	2.20±1.54 (15)
Z8-12:OAc	5.54±2.40 (15)	81.41±116.22 (15)	3.90±2.59 (14)	3.17±1.60 (15)	1.73±0.99 (15)
Z8-12:OAc +	-				
E8-12:OAc + Z8-12:OH	4.80±3.53 (15)	74.91±117.15	5.61±5.85 (14)	3.32±1.54 (14)	1.95±1.33 (14)
(1:1:1)					
Z8-12:OAc +	•				
E8-12:OAc + Z8-12:OH	6.74±6.09 (15)	118.74±137.32	3.54±1.97 (13)	2.45±1.21 (13)	1.80±1.01 (13)
(93:6:1)					
Kruskal-Wallis test	-				
$\chi^2$	2.9344	3.6011	4.4419	3.5838	3.2853
df	4	4	4	4	4
P	0.5689	0.4627	0.3495	0.4653	0.5113

Numero dei maschi in parentesi. I maschi di *G. molesta* sono stati esposti a 6,25 μL etanolo/mL aria in Aria + Etanolo ed 1,0 x 10<sup>-6</sup> ng feromone/mL aria nei trattamenti (1:1:1) e (93:6:1) di Z8-12:OAc + E8-12:OAc + Z8-12:OH.

### 4.5b Conclusioni

Dall'analisi dei risultati è emerso che una prolungata esposizione di *G. molesta* ad una miscela sintetica, costituita dai tre componenti del feromone sessuale, non induce maggiori livelli di adattamento sensoriale o limitazioni nell'abilità di ricerca del partner, rispetto ad un'esposizione dei maschi della specie al solo componente principale del feromone. L'esposizione delle antenne ad un componente della miscela feromonale induce adattamento sensoriale non solo verso lo stesso ma anche verso le altre due sostanze. Tale informazione risponde all'ipotesi preliminare relativa al possibile verificarsi di adattamento incrociato tra i componenti. L'adattamento sensoriale è un meccanismo operativo alquanto improbabile di confusione in questa specie, poiché la prolungata esposizione dei maschi al solo componente principale del feromone od in miscela, ad una concentrazione aerea pari a quella misurata in frutteti trattati con feromone per la confusione sessuale, non produce effetti sulla loro abilità nel localizzare femmine vergini in fase di richiamo in un tunnel di volo.

La relazione osservata tra la dose di Z8-12:OAc e la risposta elettrantennografica è stata simile a quella precedentemente registrata in prove condotte da Trimble e Marshall (dati non pubblicati), sebbene nel presente studio l'elettroantennografo abbia mostrato una maggiore "sensibilità". Un'apprezzabile risposta al feromone, infatti, è stata già registrata alla dose di 0,1 ng, a differenza dei 100 ng individuati in prove precedenti. Altra differenza riscontrata è stata relativa al valore massimo della media nella risposta EAG pari a -1,160 mV contro i -0,655 mV rilevati nei saggi precedenti. La variante che potrebbe contribuire a spiegare tali divergenze è stato l'impiego di un volume di aria inferiore nel rilascio dello stimolo di feromone (5ml *vs.* 36 ml). Tutti gli altri parametri EAG, come la durata degli impulsi (0,5 s) e la capacità delle pipette Pasteur (3 ml), sono stati gli stessi adoperati nel lavoro precedente. La risposta elettroantennografica di *G. molesta* verso i componenti secondari del feromone (E8-12:OAc e Z8-12:OH) è stata dimostrata per

la prima volta. La risposta relativa delle antenne a questi componenti è risultata essere solo il 30% rispetto al componente principale del feromone (Z8-12:OAc) ad una dose stimolo di 10 μg.

Come accennato in precedenza, la prolungata esposizione delle antenne di *G. molesta* ad un'alta concentrazione di Z8-12:OAc (0,5 ng di feromone/ml aria) induce adattamento sensoriale verso lo stesso ed anche verso le sostanze secondarie del blend feromonale. Il fenomeno inverso è stato verificato esponendo le antenne ai componenti secondari, nella stessa concentrazione aerea; in tal modo è stato possibile dimostrare che l'esposizione ad un componente induce adattamento anche verso gli altri (Lee e Baker, 2008). Tali risultati, infatti, suggeriscono che almeno alcuni dei neuroni olfattivi presenti sulle antenne di *G. molesta* rispondono a tutti e tre i componenti del feromone della specie. Le registrazioni da singola cellula olfattiva su antenne della carpocapsa del melo, *Cydia pomonella* (L.) hanno dimostrato l'esistenza di tre differenti tipi di neuroni recettori (Backman *et al.*, 2000), tra cui quello maggiormente presente risultava essere il più sensibile al componente principale del feromone (*E,E*)-8,10-dodecadienolo (*E8,E*10-12:OH). Il recettore olfattivo rispondeva, inoltre, agli isomeri geometrici *E,Z*-, *Z,E*- e *Z,Z*- di *E8, E*10-12:OH, ed a (*E,E*)-8,10-dodecadienile acetato.

Non è stata registrata nessuna riduzione nella risposta EAG al controllo (50 µl etanolo) quando le antenne sono state esposte ad aria od etanolo per 15 minuti, ma la risposta al controllo diminuiva dal 34 al 63% quando le antenne sono state esposte ad un'alta concentrazione di Z8-12:OAc, E8-12:OAc o Z8-12:OH. Una possibile spiegazione per tali risultati potrebbe essere che l'esposizione ad alte concentrazioni aeree di feromone riduca la vitalità di un'antenna. Un'altra eventuale interpretazione potrebbe essere che la stimolazione dell'antenna con ogni componente del feromone, ad intervalli di un minuto, prima dell'esposizione al feromone abbia causato una maggiore riduzione della vitalità rispetto a quando l'antenna è stata prima stimolata con i componenti del feromone e poi esposta ad aria o ad aria + etanolo. In contrasto

alla scarsa riduzione nella risposta EAG al controllo stimolo dopo esposizione ad aria o ad aria + etanolo, la risposta EAG netta a Z8-12:OAc ed a E8-12:OAc diminuiva rispettivamente del 37 e del 30 % dopo esposizione ad aria. Queste riduzioni potrebbero essere state causate dalle stimolazioni con i tre componenti del feromone ad intervalli di un minuto prima del trattamento con aria, come postulato sopra, causa potenziale della riduzione nella risposta al controllo stimolo. La riduzione nella risposta EAG netta quando le antenne sono state esposte ad aria + etanolo suggerisce che l'esposizione all'alcool riduca l'affaticamento sensoriale che potrebbe essere causato dalla somministrazione degli stimoli ad intervalli di tempo ravvicinati. La riduzione percentuale del 99% nella risposta EAG, in seguito ad esposizione ad un'alta concentrazione aerea del componente principale del feromone, è stata maggiore del 20% rispetto a quella osservata in precedenti studi (Trimble e Marshall 2007, 2010). Una spiegazione della discrepanza potrebbe essere data dall'uso della risposta netta EAG senza apportare rettifiche al controllo stimolo, come nei precedenti studi. Altre possibili interpretazioni potrebbero essere la maggiore sensibilità del sistema EAG e la stimolazione dell'antenna con i tre componenti del feromone, prima del trattamento con un'alta concentrazione aerea del feromone.

La lunga esposizione di *G. molesta* ad una bassa concentrazione aerea di feromone  $(1,6 \times 10^{-5} \text{ ng/mL} \text{ aria})$  ha generato un'apprezzabile riduzione nella risposta EAG netta a Z8-12:OAc, in seguito ad esposizione delle antenne alle miscele 1:1:1 e 93:6:1 dei tre componenti, ma tale fenomeno non si è verificato quando è stato usato il solo Z8-12:OAc. Il modello di regressione polinomiale con termini al quadrato di Trimble e Marshall (2010) aveva calcolato una riduzione nella risposta EAG del 16% dopo 15 minuti di esposizione a  $1,6 \times 10^{-5}$  ng di Z8-12:OAc/ml aria mentre, alle stesse condizioni, Faraone *et al.*, hanno misurato una riduzione del 47%. Nel presente studio, la dominuzione del 14% nella risposta netta EAG è stata simile a quella predetta da Trimble e Marshall, ma tale riduzione non è stata statisticamente significativa (P = 0,2). L'adattamento verso i componenti secondari è stato rilevabile

solo per E8-12:OAc (32%) quando è stata usata la miscela 93:6:1, sebbene, in seguito ad esposizione a Z8-12:OAc sono state registrate delle riduzioni marginalmente non significative (P = 0.06) nella risposta netta EAG ad E8-12:OAc (33%) e Z8-12:OH (64%), e dopo esposizione al blend 93:6:1 dei componenti è stata riscontrata una riduzione non significativa (P = 0.06) nella risposta EAG a Z8-12:OH (49%). La percentuale media dell'adattamento sensoriale ad un componente del feromone, basata sulle riduzioni significative e non nella risposta netta, non è stata influenzata dalla composizione del feromone alla quale le antenne sono state esposte, suggerendo che non ci sarebbe alcun vantaggio nell'utilizzare una miscela completa per la confusione sessuale qualora l'adattamento sensoriale fosse un meccanismo operativo di confusione per questa specie.

Non è stata registrata una riduzione nella risposta al controllo (50 µl etanolo) quando le antenne sono state esposte ad una bassa concentrazione aerea di Z8-12:OAc, sebbene una riduzione pari al 50% sia stata rilevata in seguito ad esposizione ad alte concentrazioni aeree di questo componente. Questi risultati potrebbero essere dovuti alla grande differenza tra la concentrazione aerea alta e bassa del feromone (~ 31,000 x) od alla stimolazione delle antenne con un solo componente quando è stata usata una concentrazione bassa di feromone.

E' probabile che un più ampio periodo di esposizione dell'antenna ad una concentrazione di Z8-12:OAc più bassa, possa indurre un maggiore adattamento a questo componente. Il modello di Trimble e Marshall (2010) aveva previsto un aumento pari ad 1,8 volte dell'adattamento in *G. molesta* (16 vs. 28%) raddoppiando il periodo di esposizione da 15 a 30 minuti. Inoltre, c'è la possibilità che un periodo maggiore di esposizione possa tradursi in riduzioni significative ai componenti secondari quando è usato Z8-12:OAc da solo ed in combinazione con E8-12:OAc e Z8-12:OH.

L'adattamento sensoriale è un dubbio meccanismo operativo di confusione sessuale in *G. molesta*. La prolungata esposizione dei maschi ad una miscela sintetica

del feromone, ad una concentrazione (1 ng/m³) pari a quella impiegata in un dispenser commercialmente disponibile, non ha influenzato l'abilità di ricerca del partner. L'esposizione dei maschi ad una miscela contenente uguali quantità di ogni componente del feromone della specie, od al solo componente principale, non ha prodotto effetti sul comportamento sessuale. I risultati avvalorano quelli ottenuti da Trimble (2012) (in preparazione) e Faraone (2012) (in preparazione) che sostengono che l'esposizione dei maschi di *G. molesta* ad 1 ng Z8-12:OAc /m³ aria, per un periodo di tempo di 15 minuti, non interferisce con la loro capacità di orientarsi, in un tunnel di volo, verso femmine in fase di richiamo sessuale.

Nel presente studio, i maschi di *G. molesta* sono stati esposti al feromone per 15 minuti, ma in condizioni naturali potrebbero esserne esposti per molte ore prima che le femmine divengano sessualmente attive e comincino ad emettere feromone. In prove condotte in tunnel di volo, Trimble (2012) ha osservato una riduzione del 10% nel numero di maschi che localizzavano una femmina con successo dopo 30 minuti di esposizione ad 1 ng di Z8-12:OAc /m³ aria. Un maggior periodo di esposizione potrebbe avere un più grande impatto sul comportamento maschile e/o essere in grado di rilevare altri effetti imputabili alla composizione del feromone.

Le condizioni ideali presenti nel tunnel di volo potrebbero aver compensato le eventuali disabilità indotte nel maschio dalla pre-esposizione ad atmosfera condizionata con feromone. I maschi di *G. molesta* sono stati, infatti, posizionati a 130 cm da una femmina, in assenza di turbolenze ed in una zona in cui era molto probabile la presenza del feromone. In un frutteto, il maschio potrebbe essere maggiormente distanziato dalla femmina, ed un flusso d'aria con turbolenze potrebbe essere la causa di una scia non continua a concentrazioni di feromone più basse; in queste condizioni, il grado di adattamento sensoriale, osservato dopo esposizione al feromone, potrebbe manifestare effetti sull'abilità dei maschi nel localizzare le femmine.

- 4.6b Bibliografia
- Backman, A.C., Anderson, P., Bengtsson, M., Löfqvist, J., Unelius, C.R., and Witzgall, P. 2000. Antennal response of codling moth males, *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae), to the geometric isomers of codlemone and codlemone acetate. J. Comp. Physiol. A 186: 513–519.
- Baker, T.C., and Cardé, R.T. 1979. Analysis of pheromone-mediated behaviors in male *Grapholitha molesta*, the Oriental fruit moth. Environmental Entomology, 8: 956–968.
- Baker, T.C. and Cardé, T. 1979. Endogenous and exogenous factors affecting periodicities of female calling and male sex pheromone response in *Grapholita molesta* (Busck). Journal of Insect Physiology 25: 943–950.
- Baker, T.C., Hansson, B.S., Löfstedt, C., and Löfqvist, J. 1988 Adaptation of antennal neurons in moths is associated with cessation of pheromonemediated upwind flight. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 85: 9826–9830.
- Barclay H.J., and Judd G.J.R. 1995. Models for mating disruption by means of pheromone for insect pest control. Research in Population Ecology, **37**: 239–247.
- Bartell, R.J. 1982. Mechanisms of communication disruption by pheromone in the control of Lepidoptera: a review. Physiological Entomology, 7:353-364.
- Cardé, A.M., Baker, T.C., and Cardé, R.T. 1979. Identification of a four-component sex pheromone of the female oriental fruit moth, *Grapholitha molesta* (Lepidoptera: Tortricidae). Journal of Chemical Ecology, **5**: 423–427.
- Cardé, R.T. 2007. Using pheromones to disrupt mating of moth pests, pp. 122–169.In M. Kogan, P. Jepson (eds.), Perspectives in ecological theory and integrated pest management. Cambridge University Press, New York
- Cardé, R.T., and Minks, A.K. 1995. Control of moth pests by mating disruption: successes and constraints. Annual Review of Entomology, 40: 559–585.

- Charlton, R.E., and Cardé, R.T. 1981. Comparing the effectiveness of sexual communication disruption in the oriental fruit moth (*Grapholitha molesta*) using different combinations and dosages of its pheromone blend. Journal of Chemical Ecology, **7**: 501–508.
- El-Sayed, A.M., Fraser, H.M. and Trimble, R.M. 2001. Chemical identification and behavioural activity of (Z)-11-tetradecenal in an eastern North American population of the obliquebanded leafroller. The Canadian Entomologist 133: 365-374.
- El-Sayed, A.M., Gödde, J. and Arn, H. 1999. Sprayer for quantitative application of odor stimuli. Environmental Entomology. 28: 947–953.
- Faraone, N., d'Errico G., Caleca, V., De Christofaro, A., and Trimble, R.M. 2012. Potential for using the monoterpeniod Citral alone and in combination with sex pheromone for managing the oriental fruit moth by mating disruption. J. Chem. Ecol. (*in preparation*).
- Fraser, H.W., and Trimble, R.M. 2001. Effect of delayed mating on the reproductive biology of the Oriental fruit moth (Lepidoptera: Tortricidae). The Canadian Entomologist, **133**: 219–227.
- Freund, R., Littell, R. and Creighton, L. 2003. Regression using JMP®. SAS Institute, Cary, NC.
- Hosmer, D.W. and Lemeshow, S. 2000. Applied logistic regression, 2<sup>nd</sup> edition. John Wiley and Sons, Inc.
- Maini, S., and G. Accinelli, G. 2001. Confusione disorientamento e distrazione sessuale: confronti tra erogatori di feromone di *Cydia molesta* (Busck). Informatore Fitopatologico, **10**: 36-40.
- Minks, A.K., and Cardé, R.T. 1988. Disruption of pheromone communication in moths: is the natural blend really most efficacious? Entomologia Experimentals et Applicata, **49**: 25–36.
- Pollini, A., 1998. Manuale di entomologia applicata. Edagricole, pp. 1462.

- Pree, D J. 1985. *Grapholita molesta*, pp. 307-311. *In* S. Pritam and R.F. Moore (eds.), Handbook of insect rearing, volume 1. Elsevier, New York
- Pree, D.J., Whitty, L. Van Driel, L. and Walker, G.M. 1998. Resistance to insecticides in oriental fruit moth populations (*Grapholita molesta*) from the Niagara peninsula of Ontario. The Canadian Entomologist 130: 245–256.
- Roelofs, W.L., Comeau, A., and Selle, R. 1969. Sex pheromone of the oriental fruit moth. Science, **224**: 723.
- Rothschild, G.H.L., and Vickers, R.A. 1991. Biology, ecology and control of the oriental fruit moth, pp. 389-412 *In* L.P.S. van der Geest and H.H. Evenhuis (eds.), Tortricid pests, their biology, natural enemies and control. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands
- Rumbo, E.R., and Vickers, R.A. 1997. Prolonged adaptation as possible mating disruption mechanism in oriental fruit moth, *Cydia* (=*Grapholita*) *molesta*. Journal of Chemical Ecology, **23**: 445–457.
- Sanders, C.J., and Lucuik, G.S. 1996. Disruption of male oriental fruit moth to calling females in a wind tunnel by different concentrations of synthetic pheromone. Journal of Chemical Ecology, **22**: 1971–1986.
- SAS Institute. 2007. JMP® version 7. SAS Institute, Cary, NC.
- Stelinski, L.L., Gut, L.J., Pierzchala, A.V., and Miller, J.R. 2004. Field observations quantifying attraction of four tortricid moths to high-dosage pheromone dispensers in untreated and pheromone-treated orchards. Entomologia Experimentalis et Applicata, **113**: 187–196.
- Ten Have, T.R. 2010. Structural and sampling zeros, pp. xx–xx *In* P. Armitage and T. Colton (eds.), Encyclopedia of biostatistics, 2<sup>nd</sup> edition. John Wiley & Sons, Inc.
- Tremblay, E. 1990. Entomologia applicata. Ed. Liguori. Pp 402.

- Trimble R.M. 2012. Pre-exposure to synthetic pheromone affects obliquebanded leafroller oriental fruit moth male sexual flight behavior. Environmental Entomology (in preparation).
- Trimble, R.M., Pree, D.J., and Carter, N.J. 2001. Integrated control of oriental fruit moth (Lepidoptera: Tortricicidae) in peach orchards using insecticide and mating disruption. Journal of Economic Entomology, 94: 476–485.
- Trimble, R.M., Pree, D.J., Barszcz, E.S., and Carter, N.J. 2004. Comparison of a sprayable pheromone formulation and two hand-applied pheromone dispensers for use in the integrated control of oriental fruit moth (Lepidoptera: Tortricidae). Journal of Economic Entomology, **97**: 482–489.
- Trimble, R.M., and Marshall, D.B. 2007. Quantitative method for pheromone delivery in studies of sensory adaptation of moth antennae. Physiological Entomology, **32**: 388–393.
- Trimble, R.M., and Marshall, D.B. 2010. Differences in the relationship between sensory adaptation of antennae and concentration of aerial pheromone in the oriental fruit moth and obliquebanded
- Valeur PG & Löfstedt C (1996) Behaviour of male oriental fruit moth, *Grapholita molesta*, in overlapping sex pheromone plumes in a wind tunnel. Entomologia Experimentalis et Applicata 79: 51 59.
- Zar, J.H., 2010. Biostatistical analysis. 5<sup>th</sup> ed. Prentice-Hall, Upper Saddle River. New Jersey pp. 994.

## RINGRAZIAMENTI

Desidero esprimere i miei più vivi ringraziamenti a tutto il corpo docente del Dipartimento di Scienze Animali, Vegetali e dell'Ambiente (Prof. Trematerra Pasquale, Coordinatore del Dottorato di Ricerca in "Difesa e qualità delle produzioni agroalimentari e forestali (XXIV Ciclo) ed i tutors, Proff. Rotundo Giuseppe, De Cristofaro Antonio e Trimble Robert Mitch.) per il sostegno datomi durante le attività effettuate nel triennio del dottorato.

Un particolare ringraziamento al Dott. Germinara Giacinto Salvatore per avermi seguito con scrupolo e competenza nelle attività di laboratorio e di campo che mi hanno permesso di operare con autonomia lavorativa.

111