

UNIVERSITÁ DEGLI STUDI DI NAPOLI “FEDERICO II”

DIPARTIMENTO DI AGRARIA



SCUOLA DI DOTTORATO

Sustainable Agricultural and Forestry Systems and Food Security

XXXIII ciclo

TESI DI DOTTORATO

**NUOVE PROSPETTIVE DI CONTROLLO DI *BACTROCERA OLEAE* (ROSSI)  
(DIPTERA: TEPHRITIDAE) MEDIANTE L'ALTERAZIONE DEL SUO  
MICROBIOMA E DELLA SUA BIOLOGIA CON L'UTILIZZO DI SOSTANZE DI  
DERIVAZIONE NATURALE**

Candidato:  
**Giovanni Jesu**

Tutor:  
**Prof. Francesco Vinale**  
**Prof.<sup>ssa</sup> Stefania Laudonia**  
Tutor aziendale:  
**Dott. Luigi Lorenzano**  
Tutor Università ospitante:  
**Prof. David Giron**  
Coordinatore Ph.D.:  
**Prof. Albino Maggio**





# Sommario

<b>INTRODUZIONE</b>	<b>1</b>
<i>BACTROCERA OLEAE</i> (ROSSI)	1
<i>Storia e distribuzione di B. oleae</i>	1
<i>Morfologia di B. oleae</i>	2
Stadi preimaginali	2
Adulti	3
<i>Fenologia e caratteristiche biologiche di B. oleae</i>	4
<i>Danni e lotta</i>	5
CANDIDATUS ERWINIA DACICOLA	8
BIOCHAR E ACQUE AFFUMICATE	13
METABOLITI SECONDARI DI ORIGINE MICROBICA	14
<i>Funghi appartenenti al genere Trichoderma e loro attività</i>	16
Ruolo dei metaboliti secondari di Trichoderma spp.	17
<i>Metaboliti Secondari coinvolti nella competizione</i>	18
<i>Metaboliti Secondari coinvolti nell'induzione di resistenza</i>	19
<i>Metaboliti Secondari coinvolti nella promozione della crescita</i>	20
<b>SCOPO DELLA TESI</b>	<b>21</b>
<b>MATERIALI &amp; METODI</b>	<b>23</b>
BIOSAGGI DI INGESTIONE	23
<i>Raccolta e Allevamento</i>	23
<i>Produzione di filtrati colturali fungini</i>	23
<i>Estrazione ed isolamento dei metaboliti secondari fungini</i>	24
Estrazione	24
Isolamento dell'acido harzianico	25
<i>Preparazione delle Diete</i>	26
<i>Biosaggi di ingestione</i>	27
<i>Metodologie di Raccolta ed Elaborazione dei Dati Biologici</i>	28
Mortalità:	28
Consumo di dieta:	28
Ovideposizioni:	28
Mortalità allo stadio di pupa, sex ratio e adulti neosfarfallati:	28
Mortalità degli stadi preimaginali della F1:	28
Elaborazione dei dati:	28
<i>Metodologie di Raccolta ed Elaborazione dei Dati Molecolari</i>	29
Effetti dei trattamenti sul simbionte	29
Elaborazione dei dati	31
COMPOSTI VOLATILI	31
<i>Produzione composti</i>	31
<i>Analisi quali-quantitative</i>	31
<i>Biosaggi topici</i>	32
<i>Biosaggi in Olfattometro</i>	32
<i>Elettroantennografia</i>	33
<i>Stimoli e saggi EAG</i>	33
<i>Metodologie di Raccolta ed Elaborazione dei Dati</i>	35
Effetti sull'etologia	35
Effetti sul comportamento in olfattometro	35
Risposte sensoriali	35
PROVE DI CAMPO	36
<i>Organizzazione Prove di Campo</i>	36
<i>Metodologie di Raccolta ed Elaborazione dei Dati</i>	37
<b>RISULTATI</b>	<b>39</b>
BIOSAGGI DI INGESTIONE	39
<i>Dati Biologici</i>	39
Mortalità e Consumo di dieta:	39

Ovideposizioni:	40
Mortalità allo stadio di pupa:	41
Sex ratio:	41
Adulti neosfarfallati:	41
<i>Dati Molecolari</i>	44
Effetti dei trattamenti sul simbiote nei bulbi esofagei (BE)	44
Effetti dei trattamenti sul simbiote negli Intestini (ADs)	45
<i>Variabilità stagionale</i>	46
COMPOSTI VOLATILI	47
<i>Biosaggi Topici</i>	47
<i>Saggi Olfattometrici</i>	47
<i>Saggi Elettroantennografici</i>	51
CARATTERIZZAZIONE GC-MS DELLE ACQUE AFFUMICATE	52
PROVE DI CAMPO	57
<b>DISCUSSIONI E CONCLUSIONI</b>	<b>62</b>
<b>RINGRAZIAMENTO PARTNER</b>	<b>67</b>
<b>INDICE DELLE FIGURE</b>	<b>68</b>
<b>INDICE DELLE TABELLE</b>	<b>69</b>
<b>INDICE DEI GRAFICI</b>	<b>71</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>75</b>

## Introduzione

### *Bactrocera oleae* (Rossi)

#### Storia e distribuzione di *B. oleae*

*Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) (Rossi), 1790 è ritenuto l'insetto chiave dell'olivicoltura nella gran parte dei Paesi del Bacino del Mediterraneo causando un calo nella produzione mondiale del 5% (Montiel Bueno & Jones, 2002a). È un insetto ben noto da molto tempo, probabilmente già identificato al periodo delle prime domesticazioni dell'Olivio. Teofrasto di Ereso, della scuola Peripatetica (~371-286 A.C.) fondata dal suo maestro Aristotele, ne parla in *Historia plantarum* (Fortenbaugh & Gutas, 1992). Nel testo descrive un "verme nei frutti dell'olivo" sottolineando l'importanza che ricopre nella produzione dell'olio (Hort, 1916):

“οἱ δὲ καρποὶ σκωληκοῦνται τινῶν, οἷον ἐλάας ἀπίου μηλέας μεσπίλης ῥόας. καὶ ὁ γε τῆς ἐλάας σκώληξ ἐὰν μὲν ὑπὸ τὸ δέρμα γένηται διαφθεῖρει τὸν καρπὸν, ἐὰν δὲ τὸν πυρῆνα διαφάγη ὠφελεῖ. κωλύεται δὲ ὑπὸ τῷ δέρματι εἶναι ὕδατος ἐπ' Ἄρκτου ῥῶ γενομένου. γίνονται δὲ καὶ ἐν ταῖς δρυπεπέσι σκώληκες, αἵπερ καὶ χεῖρους εἰς τὴν ῥύσιν· ὅλως δὲ καὶ δοκοῦσιν εἶναι σαπραί· δι' ὃ καὶ γίνονται τοῖς νοτίοις καὶ μᾶλλον ἐν τοῖς ἐφύδροις.”

“E i frutti di alcune piante vengono infestati dai vermi, come olive, pere, mele, nespole e melograni. Il verme che infesta le olive, se appare sotto la buccia, distrugge il frutto; ma se ne divora il nocciolo è benefico. La sua comparsa sotto la buccia è evitata se piove dopo il sorgere di Arturo. I vermi si presentano anche su frutti che maturano sull'albero e questi sono più dannosi, poiché influenzano la resa dell'olio. In effetti questi vermi sembrano essere un tutt'uno con il marcio; per cui compaiono quando c'è del vento proveniente da sud ed in particolare in luoghi umidi”

(Estratto da *Historia plantarum* IV volume, XIV, 9-10 di Teofrasto da Ereso e traduzione)

Benché *B. oleae*, la mosca delle olive (Olive Fruit Fly - OLF), sia comunemente ritenuta una specie Mediterranea tanto quanto la sua pianta ospite *Olea europaea* subsp. (ssp) *europaea* (= *O. europaea* var. *sativa* Lehr.), nessuna delle due ha effettive origini mediterranee. Gli studi filogeografici indicano come origine il Sud-Est del continente africano (Zohary, 1994; Angiolillo *et al.*, 1999; Nardi *et al.*, 2005, 2010). Lo stretto legame tra pianta e fitofago, ha determinato l'attuale diffusione in tutte le aree in cui l'Olivio è coltivato ad eccezione del Sud America e dell'Oceania (Rice, 2000; Rice *et al.*, 2003; Nardi *et al.*, 2005, 2010; Zygouridis *et al.*, 2009; Müller *et al.*, 2019). Le varietà selvatiche di olivo sono state le prime utilizzate dall'uomo (Zohary & Hopf, 2000) e tra queste, molto probabilmente l'olivo selvatico o oleastro *O. europaea* subsp. *cuspidata* (Wall. ex

DC.) Ciffieri (=syn. *Olea africana* Mill.) e subsp. *sylvestris* (Miller) Hegi (= var. *Oleaster* (Hoffmanns and Link) sono state le prime a comparire nel Bacino del Mediterraneo (Zohary & Spiegel-Roy, 1975; Baldoni *et al.*, 2002; Besnard *et al.*, 2007, 2009), ben prima dell'avvento delle varietà domestiche (Lumaret *et al.*, 2004). In seguito ai processi di desertificazione di parte del continente africano, la pianta ospite è andata incontro a successive suddivisioni filogenetiche, fino all'odierna distinzione in *Olea europaea*, presente in Nord Africa ed Europa, e *Olea europaea* subsp. *cuspidata* presente invece nel resto dell'Africa ed in Asia (Nardi *et al.*, 2010). Le prime popolazioni della mosca hanno raggiunto il Bacino del Mediterraneo nel Pleistocene (Nardi *et al.*, 2010; Hoelmer *et al.*, 2011; Bon *et al.*, 2016), mentre la domesticazione dell'olivo si data intorno al IV millennio A.C in Medio Oriente (Zohary & Hopf, 2000; Lumaret *et al.*, 2004). *Olea europaea* subsp. *europaea* var. *europaea* approdò effettivamente nel Mediterraneo successivamente e solo grazie a scambi commerciali (Ruiz Castro, 1948; Boardman, 1976; Newton *et al.*, 2014).

### Morfologia di *B. oleae*

*B. oleae* è un Dittero carpo-fago Tephritidae, sottofamiglia Dacinae, ascritta dopo revisione al Genere *Bactrocera* nel 1998 (Drew, 1989) (Tabella 1). Con circa 500 generi ed oltre 4700 specie descritte, la famiglia Tephritidae è la più ampia nell'ordine *Diptera* (White, 2006; Pape & Thompson, 2020). In questa sola famiglia, hanno identificato circa 70 specie di rilevanza economica in agricoltura (White & Elson-Harris, 1992), e le più dannose sono risultate a comportamento principalmente carpo-fago (Norrbom *et al.*, 1999).

	Classificazione
Phylum	<a href="#">Arthropoda</a>
Subphylum	<a href="#">Hexapoda</a>
Class	<a href="#">Insecta</a>
Ordine	<a href="#">Diptera</a>
Sottordine	<a href="#">Brachycera</a>
Superfamiglia	<a href="#">Tephritoidea</a>
Famiglia	<a href="#">Tephritidae</a>
Sottofamiglia	<a href="#">Dacinae</a>
Tribù	<a href="#">Dacini</a>
Genere	<a href="#">Bactrocera</a>
Specie	<a href="#">Bactrocera oleae (Rossi, 1790)</a>

Tabella 1: Tassonomia di *Bactrocera oleae*.

### Stadi preimaginali

Le uova di *B. oleae* sono biancastre ed ellittiche, di 0,12 mm  $\varnothing$  per 0,7 mm di lunghezza, e presentano un micropilo che assolve le funzioni respiratorie (Mouzaki & Margaritis, 1987; Mouzaki *et al.*, 1991). Gli stadi larvali, di colore bianco giallastro, sono 3 e possono essere distinti in base alle

dimensioni. Si presentano con la testa fortemente modificata ed incassata nel torace ed è provvista di apparato cefalofaringeo, di maggiori dimensioni e più sclerotizzato nella larva matura (Phillips, 1946; Belcari, 1989; Tremblay, 1994). Il sistema respiratorio è metapneustico nelle prime età e anfipneustico, con stigmi sviluppati anche al protorace, nel terzo stadio larvale. La larva di terza età raggiunge la lunghezza di 6-7 mm e possiede la capacità di spiccare un balzo piegandosi inizialmente su sé stessa per poi proseguire il movimento con un brusco rilascio ed il successivo raddrizzamento del corpo (Phillips, 1946; Belcari, 1989; Tremblay, 1994). Presenta diverse spatole disposte in maniera differente in base ai segmenti toracici e sternali su cui si trovano. Il pupario nella forma tipica a barilotto di 4-6 mm di lunghezza, presenta una colorazione giallo marrone (Tremblay, 1994).

### Adulti

Gli adulti neosfarfallati sono lunghi 4-5 mm e possono facilmente essere discriminati da quelli di specie simili con le quali condividono alcune caratteristiche morfologiche comuni e tipiche del Genere. I palpi mascellari e l'apparato boccale sono marrone chiaro mentre gli occhi composti sono normalmente di colore verde metallico o blu. Le piccole antenne, poste centralmente nella zona frontale, tra i due occhi, sono caratterizzate da un funicolo con sezione circolare che tende ad appiattirsi nella zona distale, con un'arista laterale, tipica dei brachiceri. Il capo ha colorazione fulva con un paio di macchie nere in prossimità del punto di inserzione delle antenne. Il torace è di colore arancione-rossiccio, con lo scuto, il metanoto ed il post scutello neri, in contrasto con i lobi postpronotali e lo scutello che sono gialli. La fessura episternale è presente e non raggiunge le setole notopleurali. Le ali sono ialine con lobo anale ed alula, presentano stigma e venature C, SC, R<sub>1</sub>, R<sub>2+3</sub>, R<sub>4+5</sub>, M<sub>1</sub>, Cu-A<sub>1</sub>, Cu-A<sub>2</sub>, A<sub>1</sub>+Cu-A<sub>2</sub> e r-m e dm-cu ben visibili. All'apice, in prossimità della venatura R<sub>4+5</sub>, è visibile una tipica macchia bruna. L'addome è marrone scuro in direzione anterolaterale sui tergiti III e IV, con una coppia di macchie su ogni tergite dal I al IV. Le femmine presentano un ovopositore di sostituzione parzialmente invaginato nell'urite VII. I maschi hanno organo copulatore ancorato all'ampolla rettale, provvisto di due testicoli a forma di fuso e vasi deferenti piuttosto brevi, come anche il canale eiaculatore, che termina in una relativamente grossa ampolla eiaculatrice (De Marzo *et al.*, 1976), e presentano una serie di setole disposte a pettine, su entrambi i lati del III tergite. Sono inoltre presenti una coppia di organi perifallici, denominati surstili, con lobi moderatamente corti, collegati alla placca sottogenitale ovale (Tzanakakis & Tsitsipis, 1967; Belcari, 1989; Tremblay, 1994).

## Fenologia e caratteristiche biologiche di *B. oleae*

*B. oleae* è considerato un insetto omodinamo poiché ha la capacità di completare l'intero ciclo vitale indipendentemente dal periodo dell'anno, purché la temperatura sia superiore a 7,5° C (Tzanakakis, 2003, 2006). La specie tuttavia incontra molte difficoltà nel dar luogo a nuove generazioni a causa della scarsità invernale di olive, su cui gli stadi preimaginali si sviluppano da carpofagi (Fletcher, 1987). Le drupe di *Olea verrucosa* (Wild.) Link, *Olea crysophilla* Lam. sono segnalate come ospiti occasionali invernali in assenza di frutti, di *O. europaea* coltivata o selvatica (Fletcher, 1987; Tzanakakis, 2003; Daane & Johnson, 2010). Gli adulti possono nutrirsi a carico di svariate fonti di cibo di origine organica per superare così anche l'inverno (Bateman, 1972; Fletcher, 1987; Drew & Yuval, 1999).

In presenza di drupe la deposizione delle uova avviene al disotto dell'esocarpo. Le femmine adulte attuano alcuni comportamenti peculiari per assicurare la disponibilità di cibo alle larve neonate (Tzanakakis, 2003). Il più noto e particolare è il cosiddetto "bacio della ferita" durante il quale, le femmine succhiano e rigurgitano il succo che fuoriesce a seguito della puntura più volte consecutivamente (Petri, 1907; Cirio, 1971). Tale comportamento determina la marcatura della drupa ed evita, in modo non permanente, la ovideposizione di altre femmine a carico del medesimo frutto (Lo Scalzo *et al.*, 1994; Tzanakakis, 2006). Inoltre, con il rigurgito vengono rilasciati i simbionti che verranno assunti dalle larve neonate (Bigiotti *et al.*, 2019a). Le femmine adulte identificano le olive idonee per la deposizione quando raggiungono un peso di circa 3,5 g, e comunque quando l'endocarpo inizia ad indurire e restano suscettibili d'attacco fino all'invaiaitura (Daane & Johnson, 2010), preferendo sempre le drupe meno infestate (Giunti *et al.*, 2020). Le larve si nutrono del mesocarpo, scavando gallerie sempre più profonde finché non raggiungono l'endocarpo. La terza età larvale risale verso la superficie del frutto e lo abbandona per impuparsi nel terreno. In tal caso, le larve mature abbandonano i frutti e raggiungono il suolo con un balzo, impupandosi ad una profondità compresa tra 1 e 9 cm (Tzanakakis, 2006). Talvolta la larva può impuparsi nel frutto e dar luogo alla formazione di una camera pupale sigillata dal solo epicarpo del frutto. Tendenzialmente, lo stadio di pupa si completa all'interno dei frutti durante i periodi estivi e più comunemente nel suolo in autunno (Tzanakakis, 2003; Preu *et al.*, 2020).

Lo sviluppo di ogni stadio è fortemente influenzato dalle condizioni ambientali. Se queste sono ottimali, l'incubazione dell'uovo dura 1-2 giorni, mentre gli stadi larvali e di pupa durano circa 8-9 e 9-10 giorni rispettivamente (Tsitsipis, 1977; Neuenschwander & Michelakis, 1979). Le soglie limite minime e massime di temperatura sono 7,5-10 °C e 30-32 °C per le uova e 10-12,5 °C e 30-32 °C per gli stadi larvali. Le temperature ottimali di sviluppo sono di 24-25 °C Tsitsipis (1977). Lo

sviluppo degli stadi preimaginali che si completa in presenza delle temperature limite massime, dà luogo fino al 48% di tasso di mortalità pupale (Tsitsipis, 1980). Dopo lo sfarfallamento, la maturità sessuale viene raggiunta dagli adulti nel giro di 5-8 giorni (Canale *et al.*, 2012). I maschi sono poligami e possono accoppiarsi più volte al giorno (Zervas, 1982), mentre le femmine si accoppiano da 1 a 3 volte in tutta la loro vita (Zouros & Krimbas, 1970). Gli accoppiamenti avvengono sempre nel tardo pomeriggio e/o al crepuscolo, sia in campo che in condizioni di laboratorio (Mazomenos, 1989). Le femmine fecondate iniziano ad ovideporre da 1 a 10 uova al giorno dopo 3-5 giorni dall'accoppiamento (Tzanakakis, 2006). In pieno campo il numero di generazioni può variare in funzione di molti fattori pedoclimatici, ma anche in base alla quantità e qualità delle olive disponibili (Burrack & Zalom, 2008; Kounatidis *et al.*, 2008; Daane & Johnson, 2010). *B. oleae* può completare 3-4 generazioni all'anno nell'Italia Centro-Settentrionale, e fino a 5-7 nelle zone costiere e Meridionali d'Italia, con migliori condizioni climatiche per lo sviluppo dell'insetto (Delrio & Cavalloro, 1977), similmente a quanto accade sulle coste di altri Paesi Mediterranei (Tzanakakis, 2006; Wang *et al.*, 2009). Queste aree, infatti, sono caratterizzate da alti livelli di umidità e temperature alte durante l'autunno, spesso fino alla metà di novembre, permettendo così alla mosca di raggiungere elevate densità di popolazione. Le avverse condizioni ambientali estive, molto calde e secche, determinano drastiche riduzioni delle densità di popolazione, per effetto di una fase di quiescenza riproduttiva ed un aumento della mortalità (Mourikis & Fytizas, 1970; Fletcher *et al.*, 1978; Fletcher & Kapatos, 1983). Le attività e la dinamica delle popolazioni di *B. oleae* durante l'inverno e la primavera sono invece più complesse da osservare e determinare (Raspi *et al.*, 1997, 2002; Ragolini *et al.*, 2007). Diversi studi hanno descritto che la mosca può svernare come larva nei frutti di *cultivar* tardive, come pupa nel suolo e come adulto (Neuenschwander *et al.*, 1981; Kapatos & Fletcher, 1984; Ragolini *et al.*, 2007). Marchini *et al.* (2017) hanno osservato che gli ovari delle femmine catturate in marzo-aprile contengono già cellule spermatiche e i corpi lutei, residui di precedenti fecondazioni delle uova che indica il completamento di una prima generazione già ad inizio primavera.

## Danni e lotta

*B. oleae* danneggia i frutti della pianta ospite (Daane & Johnson, 2010) causando una riduzione quali-quantitativa del prodotto fresco e dell'olio, interferendo su proprietà e composizione (Pereira *et al.*, 2004). I report pubblicati da ISTAT e ISMEA mostrano come in anni particolarmente favorevoli alla mosca, con estate fresca ed umida, le infestazioni hanno determinato una forte riduzione della produzione di olive: fino al 35% nel 2014-2015 rispetto agli anni precedenti. È stata stimata una perdita media annua di 800 milioni di dollari americani nella produzione di olive causata dall'insetto (Montiel Bueno & Jones, 2002a), la cui crescita incontrollata può portare fino al 90% di danno

alla produzione (P. Katsoyannos, 1992; Ordano *et al.*, 2015). Il danno principale è quantitativo ed è causato dagli stadi larvali che durante il loro sviluppo consumano tra 50 e 150 mg di polpa, in funzione della *cultivar* attaccata (Neuenschwander & Michelakis, 1978). Le micro vibrazioni dovute al movimento delle larve all'interno dei frutti causano inoltre cascole premature (Tzanakakis, 2006). Il danno qualitativo è dovuto alla proliferazione di microorganismi sulle aree necrotiche dei frutti danneggiati (Angerosa *et al.*, 1992). Lo stesso livello d'infestazione ha impatti economici differenti in funzione della destinazione finale delle olive. La soglia di tolleranza per le infestazioni della mosca per le olive da mensa è praticamente nulla, mentre può raggiungere il 30% della produzione attaccata per le olive da olio, in funzione della qualità dell'olio che si ha intenzione di produrre (Neuenschwander & Michelakis, 1978; Daane *et al.*, 2005). La presenza di larve nelle drupe determina un aumento dell'acidità del prodotto finale e altera i livelli di fenoli, steroli e perossidi, riducendo la qualità dell'olio che presenta off-flavour sgradevoli (Angerosa *et al.*, 1992; Gómez-Caravaca *et al.*, 2008). Torres-Vila *et al.* (2003) hanno osservato inoltre, che la perdita di qualità e l'incremento di acidità sono influenzate dalla durata dello stoccaggio dei frutti prima della molitura, periodo durante il quale possono svilupparsi muffe (*Fusarium* e *Penicillium*), lieviti (*Torulopsis* e *Candida*) ma anche batteri (*Xanthomonas*). La scelta di differenti *cultivar* influenza l'impatto della mosca sulla produzione (Al-Zaghal & Mustafa, 1987; Gümüşay *et al.*, 1990; Burrack & Zalom, 2008) al punto tale che l'infestazione può essere inferiore al 10% della produzione o raggiungere il 31%, in funzione solo di questo fattore (Iannotta & Scalercio, 2012). Come spesso accade, le *cultivar* più resistenti hanno però una minor resa in termini quali-quantitativi, quindi in fase di impianto occorre fare una valutazione a riguardo, considerando anche che un olio di alta qualità può ancora essere ottenuto con un'infestazione del 10% (Gucci *et al.*, 2012). Secondo altri autori, anche infestazioni del 30% (Neuenschwander & Michelakis, 1978) ed infestazioni passive, con olive con i fori di sfarfallamento, del 30% (Caleca *et al.*, 2017) non influenzano particolarmente la qualità dell'olio prodotto. Altri fattori che possono influenzare l'impatto della mosca sulla produzione sono il calibro delle olive, il periodo di maturazione, la durezza dell'epicarpo, la presenza sulla superficie delle drupe di sostanze quali caolino e rame o di melata e deiezioni di uccelli, nonché il quantitativo di composti alifatici presenti (Donia *et al.*, 1971; Neuenschwander *et al.*, 1985; Iannotta *et al.*, 2007). Elevate quantità di cianidina ed oleuropeina nelle drupe causano un abbassamento dei livelli di infestazione di *B. oleae* (Iannotta *et al.*, 2007). Infine, il periodo di raccolta e la *cultivar* allevata, possono modificare l'impatto complessivo di *B. oleae* sulla resa (Torres-Vila *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2004; Tamendjari *et al.*, 2004; Tzanakakis, 2006).

Il livello di tolleranza delle piante ospiti verso infestazioni di OLF è un risultato assai complesso da determinare e può dipendere dalle sinergie tra fattori morfologici, chimici e meccanici (Corrado *et*

*al.*, 2016; Grasso *et al.*, 2017). In risposta all'atto di nutrizione delle larve a carico delle olive, sono stati osservati anche meccanismi complessi a livello molecolare che coinvolgono differenti geni, già noti nelle risposte ossidative agli stress, nella difesa e nel metabolismo e nelle stesse strutture vegetali (Grasso *et al.*, 2017). Le strategie di controllo più conosciute ed utilizzate finora sono state caratterizzate dall'uso di esche proteiche avvelenate e interventi di copertura, nei programmi classici di lotta chimica, con gli Esteri Fosforici, Piretroidi e Spinosoidi (Skouras *et al.*, 2006; Thomas & Mangan, 2006; Kakani & Mathiopoulos, 2008; Margaritopoulos *et al.*, 2008). Sono noti fenomeni di insorgenza di resistenza agli organofosfati (Tsakas & Krimbas, 1970; Stasinakis *et al.*, 2001; Skouras *et al.*, 2006; Margaritopoulos *et al.*, 2008; Lantero *et al.*, 2020). Alternative a basso impatto per il controllo sono le catture massali (mass trapping) con esche alimentari, cromotropiche e feromoni (Broumas, 1985). Le esche alimentari sono in gran parte costituite da proteine, lieviti e sali di ammonio (Haniotakis *et al.*, 1986; Díaz-Fleischer & Aluja, 2000; B. I. Katsoyannos & Kouloussis, 2001; Thomas & Mangan, 2006). L'attrattività cromotropica è ottenuta con il colore giallo (520-580 nm) (Prokopy *et al.*, 1975) ed è sfruttata in combinazione con le trappole collanti e McPhail (Katsoyannos, 1989). Alcuni studi hanno evidenziato effetti avversi nell'uso delle trappole cromotropiche gialle che risultano poco specifiche e catturano indiscriminatamente impollinatori e nemici naturali (Maredia *et al.*, 1992; Bowie *et al.*, 1999; Laubertie *et al.*, 2006; Wallis & Shaw, 2008), con impatti sulla biodiversità (Neuenschwander, 1982). Il controllo delle popolazioni mediante l'applicazione della tecnica dell'insetto incompatibile (Incompatible Insect Technique – IIT) e del maschio sterile (Sterile Insect Technique – SIT), ha in passato dato luogo a risultati tutt'altro che incoraggianti (Economopoulos, 1970; Economopoulos & Zervas, 1982; Estes *et al.*, 2012a), ma è recentemente ritornato in auge grazie a studi sull'attività degli endosimbionti (Riegler & Stauffer, 2002; Zabalou *et al.*, 2004, 2009; Apostolaki *et al.*, 2011) e sulla capacità competitiva per l'accoppiamento dei maschi resi sterili con quelli selvatici (Ahmadi *et al.*, 2018). Recentemente si è attribuita la variabilità delle risposte da SIT ad alterazioni del microbioma dell'insetto, causate dalla dieta utilizzata negli allevamenti. Infatti, è uso comune aggiungere alle diete, negli allevamenti degli insetti, gli antibiotici, per evitare la proliferazione di microrganismi (Ben-Yosef *et al.*, 2010, 2014, 2015; Estes *et al.*, 2012a; Ras *et al.*, 2017). Tra le tecniche di controllo proposte ed utilizzate per la lotta in pieno campo, sebbene con un impatto tutt'altro che trascurabile, c'è l'utilizzo del rame, che determina una diminuzione delle deposizioni (Prophetou-Athanasidou *et al.*, 1991). Il rame causa una mortalità diretta della mosca (Belcari & Bobbio, 1999; Iannotta, 2004; Sacchetti *et al.*, 2004; Caleca *et al.*, 2010) che Rosi *et al.* (2007) hanno ipotizzato essere dovuta ad un effetto simbiocida. Un'altra sostanza inerte comunemente utilizzata nei programmi di controllo integrato è una sospensione acquosa di minerali caolinici raffinati che, dà luogo ad un film bianco che ricopre le foglie e

le olive senza modificarne lo sviluppo e la traspirazione. Il caolino altera la capacità di orientamento e svolge un effetto repellente nei confronti degli adulti di *B. oleae* (Saour & Makee, 2004). L'uso del caolino consente di tenere sotto controllo le infestazioni a livelli paragonabili a quanto ottenibile con i trattamenti tradizionali con agrofarmaci (Saour & Makee, 2004). Infine, sono stati condotti differenti tentativi di controllo biologico, ma con scarsi risultati, per difficoltà di allevamento e di adattamento dei nemici naturali ai nuovi ambienti di introduzione ed alle varietà coltivate (Delucchi, 1957; Monastero & Delanoue, 1966; Liaropoulos *et al.*, 1977; Kapatos *et al.*, 1977; Wharton, 1989; Raspi & Loni, 1994; Miranda *et al.*, 2008; Yokoyama *et al.*, 2008).

### *Candidatus Erwinia dacicola*

I batteri endosimbionti sono distinti in primari e secondari. I primari sono trasmessi alla progenie degli ospiti per via materna, utilizzando la linea germinale (Giron *et al.*, 2017) e vivono in cellule specializzate, i batteriociti, sviluppate nel corso di lunghi periodi di coevoluzione dell'insetto ospite (Tremblay, 1960; Braendle *et al.*, 2003; Baumann, 2005). Gli endosimbionti secondari possono trovarsi all'interno o all'esterno delle cellule e sono trasmessi alla progenie o a individui intraspecifici sia per via verticale che orizzontale (Russell *et al.*, 2003; Dale & Moran, 2006; Klepzig *et al.*, 2009; Oliver *et al.*, 2010). Le prime relazioni simbiotiche hanno avuto luogo circa 300 milioni di anni fa (Moran & Telang, 1998) ed ad esse è attribuito il merito biologico dei successi ottenuti dagli insetti nei processi evolutivi (Douglas, 1998; Moran & Baumann, 2000; Janson *et al.*, 2008). I primi studi sulle relazioni mutualistiche tra insetti e microorganismi risalgono agli inizi del secolo scorso (Petri, 1909; Stammer, 1929), ma solo con le moderne tecniche di Sequenziamento Genetico (Next Generation Sequencing – NGS) è stato possibile individuare simbionti obbligati non allevabili (Moran & Wernegreen, 2000). Gli effetti degli endosimbionti batterici sulla fitness è dovuta ad azioni dirette sui loro insetti ospiti per efficienza nutritiva, maggiore resistenza alle avversità climatiche ed ai patogeni e/o ai parassitoidi, ad azioni dirette sulla fisiologia delle piante ospiti ed infine per effetti sulla modalità di riproduzione dell'ospite (Girolami, 1973, 1983; Douglas, 1998, 2009, 2013; Douglas *et al.*, 2001; Currie *et al.*, 2003; Zientz *et al.*, 2004; Dale & Moran, 2006; Moran & Degnan, 2006; Dunbar *et al.*, 2007; Mazzon *et al.*, 2008, 2010, 2011; Moran *et al.*, 2008; Akman Gündüz & Douglas, 2009; Engelstädter & Hurst, 2009; Kaltenpoth, 2009; Kaiser *et al.*, 2010; Apostolaki *et al.*, 2011; Giron & Glevarec, 2014; Ben-Yosef *et al.*, 2015; Brune & Dietrich, 2015; Viale *et al.*, 2015; Giron *et al.*, 2016, 2017; Joubert & O'Neill, 2017).

La specie più abbondante nel microbioma di *B. oleae* in popolazioni selvatiche di tutto il mondo è “*Ca. Erwinia dacicola*” (Belcari *et al.*, 2003; Capuzzo *et al.*, 2005; Kounatidis *et al.*, 2008; Sacchetti

*et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2008; Estes *et al.*, 2009; Ben-Yosef *et al.*, 2010; Estes *et al.*, 2012a; Savio *et al.*, 2012). “*Candidatus Erwinia dacicola*”, della classe *Grammaproteobacteria* (Baumann & Moran, 1997), è un simbionte persistente (P-symbiont) di *B. oleae* (Capuzzo *et al.*, 2005). Si rinviene nell’ospite durante l’intero ciclo vitale e solo in simbiosi con quest’ultimo. La sequenza genica della porzione 16S dell’rRNA evidenzia una prossimità con *Erwinia persicina* ed *Erwinia rhapsodica*, patogeni vegetali del sottogruppo di *Erwinia amylovora*, l’agente del colpo di fuoco batterico delle pomacee. “*Ca. Erwinia dacicola*” quindi, a differenza degli endosimbionti obbligati di altri insetti monofagi (Baumann & Moran, 1997; Gil *et al.*, 2004; Baumann, 2005; Kikuchi *et al.*, 2009), presenta caratteristiche genomiche simili a quelle dei batteri patogeni delle piante. Già nel 1909, Petri descrisse per *B. oleae* la presenza di una “estroflessione vescicoliforme dorsale della faringe”, con all’interno batteri vivi ed attivi. Questa estroflessione è stata successivamente definita “Bulbo Esofageo” (BE) (Girolami, 1973; Capuzzo *et al.*, 2005; Sacchetti *et al.*, 2008). Le relazioni tra microorganismi e ditteri *Tephritidae* sono note anche per altre specie (Tabella 2), così come la presenza della struttura esofagea con variazioni di forme e grandezze e classificate secondo diverse tipologie (Tabella 3) (Girolami, 1973, 1983). “*Ca. Erwinia dacicola*”, ospitato nel BE, si moltiplica e migra nelle ghiandole contrattili perianali delle femmine adulte al raggiungimento della maturità sessuale. La secrezione delle ghiandole perianali imbratta il corion all’atto dell’ovideposizione. I batteri si localizzano principalmente attorno al micropilo. La trasmissione verticale avviene al momento della schiusa, attraverso il micropilo dell’uovo (Mazzini & Vita, 1981) e con l’ingestione del corion durante la schiusa delle larve (Sacchetti *et al.*, 2008). La trasmissione verticale descritta è nota anche per altri Ditteri (Miyazaki *et al.*, 1968; Drew *et al.*, 1983; Drew & Lloyd, 1991; Drew & Yuval, 1999; Lauzon *et al.*, 2000, 2003; Lauzon, 2003; Behar *et al.*, 2008, 2009).

Le larve neonate ospitano inizialmente il simbionte nei ciechi intestinali situati tra lo stomodeo ed il mesentero dove continuano a moltiplicarsi durante lo sviluppo larvale. Le analisi PCR e microscopiche hanno dimostrato che “*Ca. Erwinia dacicola*” è presente nelle cellule epiteliali dei tessuti dei ciechi gastrici dell’intestino medio delle larve. La capacità di sopravvivenza e sviluppo in condizioni endo- ed extra-cellulari è piuttosto insolita nei batteri non patogeni e sono riportati in letteratura pochi altri esempi (Cheng & Aksoy, 1999; Pais *et al.*, 2008). Lo sviluppo endocellulare durante gli stadi di sviluppo, unico noto per i Tefritidi (Lauzon, 2003; Estes *et al.*, 2009), spiega come “*Ca. Erwinia dacicola*” riesca a sopravvivere al complesso processo distruttivo e ricostruttivo dello sviluppo olometabolico dell’ospite (Greenberg, 1959; Jiang *et al.*, 1997; Baechrecke, 2000; Estes *et al.*, 2009). Negli adulti di *B. oleae*, l’assenza del batterio negli ovari e nei testicoli conferma che la trasmissione verticale si verifica solo attraverso la contaminazione del corion delle uova (Sacchetti

et al., 2008). Recentemente è stata descritta una trasmissione orizzontale, per trofallassi, tra gli adulti (Bigiotti et al., 2019a).

Batterio \ Tefritide	<i>Anastrepha ludens</i>	<i>Anastrepha suspensa</i>	<i>Bactrocera dorsalis</i>	<i>Bactrocera tryoni</i>	<i>Ceratitis capitata</i>	<i>Rhagoletis pomonella</i>	<i>Rhagoletis completa</i>
<i>Acinetobacter</i> sp.					•		
<i>Alcaligenes</i> sp.						•	
<i>Cedecea lepagei</i>			•				
<i>Cedecea</i> sp.			•				
<i>Citrobacter freundii</i>	•		•	•		•	
<i>Enterobacter agglomerans</i>		•	•		•	•	
<i>Enterobacter cloacae</i>			•	•	•	•	
<i>Enterobacter sakazakii</i>			•				
<i>Erwinia herbicola</i>				•			
<i>Escherichia coli</i>			•	•		•	
<i>Flavobacter multivorum</i>				•			
<i>Klebsiella oxytoca</i>			•	•	•	•	•
<i>Klebsiella ozaenae</i>				•			
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	•		•		•	•	
<i>Klebsiella</i> sp.			•				
<i>Kluyvera</i> sp.			•				
<i>Proteus</i> spp.				•			
<i>Providencia rettgeri</i>			•	•			
<i>Providencia</i> sp.				•			
<i>Providencia stuartii</i>			•				
<i>Pseudomonas maltophilia</i>				•			
<i>Pseudomonas melophthora</i>						•	
<i>Pseudomonas putida</i>					•		
<i>Pseudomonas</i> sp.					•		•
<i>Serratia liquefaciens</i>				•			
<i>Serratia marcescens</i>				•	•		
<i>Serratia</i> sp.			•				•
<i>Staphylococcus aureus</i>	•						
<i>Xanthomonas</i> sp.							•

Tabella 2: Batteri associati ai Tefritidi di importanza economica (Sacchetti, 2003).

Tipo <i>Bactrocera</i> o <i>Dacus</i>	Tipico di <i>B. oleae</i> , di forma sferica e caratterizzato da un'importante carica di batteri simbiotici, con cellule epiteliali colonnari nella zona inferiore.
Tipo <i>Ceratitis</i>	Caratteristico di <i>Ceratitis capitata</i> (Wiedemann, 1824) ed altre <i>Trypetinae</i> e <i>Dacinae</i> ad eccezione di <i>B. oleae</i> . Di forma sferica ma più piccolo del Tipo precedente, spesso ospita batteri, e con cellule epiteliali colonnari nella parte superiore.
Tipo <i>Ensina</i>	Caratteristico di alcuni generi della sottofamiglia <i>Tephritinae</i> . Di forma ovoidale, piccolo, senza cellule epiteliali colonnari ma di contro presenta un'ampia tonaca muscolare. Non sono mai stati rinvenuti batteri al suo interno, ma quando l'insetto è attore di una simbiosi con batteri ospitati nell'intestino medio, presenta questo tipo di Bulbo Esofageo.
Tipo <i>Chaetorellia</i>	Osservato in altre specie di <i>Tephritinae</i> . È intermedio tra il Tipo <i>Ceratitis</i> ed il Tipo <i>Ensina</i> .

Tabella 3: Classificazione dei Bulbi Esofagei (BE) nei Tefritidi proposta da Girolami (1973).

Nell'intestino degli adulti, gli enterobatteri simbiotici formano un biofilm intestinale, che ha valenza di una struttura metabolicamente attiva e agisce come un organo accessorio, influenzando i processi

catabolici dell'azoto. I biofilm possono svolgere inoltre una funzione protettiva verso sostanze tossiche (Costerton *et al.*, 1995; Lauzon *et al.*, 2000, 2009; Gjersing *et al.*, 2005). La carica batterica negli adulti neosfarfallati non è molto elevata, ma il numero si moltiplica velocemente durante i primi giorni dallo sfarfallamento raggiungendo soglie elevate in soli 5 giorni quando non è più possibile eliminarli del tutto mediante una somministrazione orale di antibiotici (Estes, 2009; Estes *et al.*, 2009). Oltre “*Ca. Erwinia dacicola*” batteri secondari del microbiota di *B. oleae*, sono *Acetobacter tropicalis*, *Pantoea* e *Providencia* spp. ed altre *Pseudomonadaceae* (Kounatidis *et al.*, 2008; Sacchetti *et al.*, 2008; Estes, 2009; Estes *et al.*, 2009; Estes *et al.*, 2012a; Liscia *et al.*, 2013a; Ben-Yosef *et al.*, 2015). Alcuni di questi, sono fonte nutrizionale aggiuntiva per il dittero e si rinvergono sul filloplano dell'olivo (Sacchetti *et al.*, 2007, 2008). La presenza dell'endosimbionte in *B. oleae* spiega l'etologia della specie, diversa da quella nota per altre mosche carpofaghe.

Le mosche della frutta depongono le uova in frutti invaiati o già maturi (Fletcher, 1987), così facendo, assicurano un ottimale pabulum per lo sviluppo larvale (Greany, 1989; Messina & Jones, 1990; Joachim-Bravo *et al.*, 2001; Rattanapun *et al.*, 2009). *B. oleae* ovidepone in olive non ancora mature e ciò le permette di completare più generazioni già prima della completa maturazione dei frutti (Kapatos & Fletcher, 1984; Neuenschwander *et al.*, 1985). I frutti acerbi dell'olivo, come noto anche per altri frutti, sono caratterizzati da alti contenuti di metaboliti secondari che li rendono resistenti agli attacchi di patogeni ed erbivori per i loro effetti tossici, antimicrobici ed anti-nutritivi (Gutierrez-Rosales *et al.*, 2012; Whitehead & Bowers, 2013). In particolare, le drupe acerbe contengono notevoli quantità di oleuropeina, un glicoside fenolico amaro, che può arrivare a rappresentare il 14% del peso secco dell'intero frutto (Amiot *et al.*, 1986; Alagna *et al.*, 2012; Gutierrez-Rosales *et al.*, 2012). Come altri composti fenolici, l'oleuropeina è un agente alchilante (Bennett & Wallsgrove, 1994; Felton & Gatehouse, 1996; Taiz & Zeiger, 2010; Pentzold *et al.*, 2014). Per attivazione enzimatica, da parte di  $\beta$ -glucosidasi e fenolossidasi, l'oleuropeina dà luogo a chinoni ed aldeidi molto reattivi, complessandosi con legami covalenti con le lisine contenute nei tessuti vegetali e formando composti di elevato peso molecolare (Konno *et al.*, 1999; Koudounas *et al.*, 2015) ad attività antibatterica ed antimicotica (Brenes *et al.*, 2011; Dobler *et al.*, 2011). I livelli di oleuropeina e  $\beta$ -glucosidasi decrescono durante la maturazione del frutto (Amiot *et al.*, 1986; Briante *et al.*, 2002; Alagna *et al.*, 2012) mentre aumenta il contenuto in lisina nella polpa (Zamora *et al.*, 2001). L'azione dell'endosimbionte consente lo sviluppo delle larve della mosca in presenza di chinoni ed aldeidi complessati con la lisina. In uno studio abbastanza recente, Ben-Yosef *et al.* (2015) hanno dimostrato che la presenza di “*Ca. Erwinia dacicola*” è vitale per lo sviluppo delle larve di *B. oleae* all'interno delle olive e che può addirittura accelerarlo migliorando la nutrizione delle larve.

Nello stesso studio inoltre, è stata dimostrata una capacità di sviluppo larvale di insetti aposimbiontici che variava in funzione della maturazione delle olive, a conferma, che le variazioni di quantità dell'oleuropeina, della lisina e delle proteine, sono un fattore chiave nella difesa passiva dei frutti e che il simbionte svolge un ruolo determinante all'interno di questo processo (Ben-Yosef *et al.*, 2015). Sul ligustro (*Ligustrum* spp.), i cui frutti contengono elevate quantità di oleuropeina è stato osservato che le mosche presentano difficoltà o addirittura arresti nella crescita, dovuti alla contestuale carenza di lisina (Konno *et al.*, 2009, 2010). L'effetto sulla efficienza nutrizionale degli endosimbionti è stato sperimentalmente verificato. Le diete addizionate con antibiotici in condizioni di laboratorio hanno un effetto simbiocida ed aumentano la mortalità larvale in OLF e quindi larvicida per l'insetto (Fytizas & Tzanakakis, 1966; Estes *et al.*, 2012b; Ben-Yosef *et al.*, 2015; Ras *et al.*, 2017). Lo stesso effetto è stato dimostrato per il Rame, largamente utilizzato in pieno campo, per il controllo proprio di *B. oleae* (Tzanakakis, 1985; Belcari & Bobbio, 1999; Belcari *et al.*, 2005a; 2005b).

La presenza di biofilm batterici nell'intestino è nota anche per altri Tefritidi (Lauzon *et al.*, 1998, 2003; Liu *et al.*, 2016) con endosimbionti secondari dei generi *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Pantoea* e *Providencia*, tutti facenti parte della famiglia *Enterobacteriaceae* (Lauzon *et al.*, 1998, 2003; Liu *et al.*, 2016). Le femmine adulte di queste mosche introducono i simbionti nelle camere di deposizione assieme alle uova (Miyazaki *et al.*, 1968; Drew & Lloyd, 1991; Lauzon *et al.*, 2000, 2003; Lauzon, 2003; Behar *et al.*, 2008, 2009). Gli enterobatteri simbiotici formano un biofilm intestinale che può svolgere anche una funzione protettiva verso sostanze tossiche (Costerton *et al.*, 1995; Lauzon *et al.*, 2000, 2009; Behar *et al.*, 2005, 2008; Gjersing *et al.*, 2005; Berasategui *et al.*, 2016). Per questi ditteri è stata descritta una attività detossificante che ha determinato l'istaurarsi di resistenze nei confronti di alcune molecole insetticide (Boush & Matsumura, 1967; Genta *et al.*, 2006; Kikuchi *et al.*, 2012; Ceja-Navarro *et al.*, 2015; Cheng *et al.*, 2017). Anche *Wolbachia* spp. è stato individuato come simbionte secondario in diverse specie della famiglia *Tephritidae* (O'Neill *et al.*, 1992; Werren *et al.*, 1995; Min & Benzer, 1997; Werren, 1997; Zhou *et al.*, 1998; Stouthamer *et al.*, 1999; Jeyapakash & Hoy, 2000; Kittayapong *et al.*, 2000; Riegler & Stauffer, 2002; Selivon *et al.*, 2002; Dedeine *et al.*, 2003; Fry *et al.*, 2004; Zabalou *et al.*, 2004; Rocha *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2007; Arthofer *et al.*, 2009; Zabalou *et al.*, 2009; Saridaki & Bourtzis, 2010). Il batterio può agire sulla riproduzione degli ospiti a diversi livelli, inducendo incompatibilità citoplasmatica (CI), partenogenesi telitoca e femminizzazione (Stouthamer *et al.*, 1990; Hoffmann & Turelli, 1997; Rigaud, 1997; Hurst *et al.*, 1999).

## Biochar e Acque affumicate

Attraverso una pirolisi completata a bassi livelli di ossigeno e ad alte temperature, da 250 °C fino a oltre 800 °C, è possibile ottenere un carbone vegetale denominato comunemente Biochar. Il materiale, ricco in carbonio (Lehmann & Joseph, 2015), è stato definito dall'International Biochar Initiative (IBI) come: “un materiale solido ottenuto da una conversione termochimica di biomassa in condizioni di scarsità di ossigeno” (International Biochar Initiative, 2015). In studi recenti sono state esaminate le caratteristiche del Biochar nell'ottica di un suo potenziale utilizzo per incrementare le riserve di carbonio del suolo (Lehmann, 2007) e nella gestione e riciclo dei rifiuti organici (Navia & Crowley, 2010). Sono state riportate anche le sue capacità benefiche nella gestione del suolo, poiché migliora la capacità di accumulo d'acqua (Novak *et al.*, 2012), svolge una funzione tampone nei processi di acidificazione (Xu *et al.*, 2012), trattiene ed adsorbe molecole tossiche nel suo reticolo (Oleszczuk *et al.*, 2012) e stimola la proliferazione della microflora benefica a discapito di quella patogena (Oramahi & Yoshimura, 2013; Bonanomi *et al.*, 2015; Jaiswal *et al.*, 2018; Oramahi *et al.*, 2018, 2020). Tutto ciò ha determinato una costante e forte espansione della produzione di Biochar a fine commerciale (Vochozka *et al.*, 2016). A seguito del processo di pirolisi, oltre la frazione solida, si ottengono prodotti secondari costituiti da bio-oli/bio-carburanti ed una frazione volatile di miscele di metano, composti organici volatili (VOCs), diossido ed ossido di carbonio, idrogeno e aerosol di fumo con particelle di differenti dimensioni (Pennise *et al.*, 2001; Cornelissen *et al.*, 2016). Questi gas e fumi ottenuti tramite pirolisi possono essere pericolosi per la salute umana e contribuire anche al cambiamento climatico, ma possono essere riutilizzati in interessanti applicazioni tecnologiche (Vamvuka, 2011) e agricole (Kulkarni *et al.*, 2011). Il fumo prodotto dal processo ha tra l'altro, la capacità di stimolare la germinazione di alcuni semi (de Lange & Boucher, 1990). L'effetto stimolante può essere osservato in diverse piante selvatiche e coltivate, grazie all'attività di sostanze presenti nel fumo, denominate “karrikine” (Chiwocha *et al.*, 2009). In questo gruppo di composti rientra il karrikinolide (KAR1) che è stato identificato ed isolato dal fumo ottenuto dalla cellulosa e che presenta elevata capacità di stimolazione della germinazione dei semi quando utilizzato a concentrazioni molto basse (Flematti *et al.*, 2004). Ulteriori studi sono stati condotti allo scopo di verificare se il fumo e i suoi prodotti derivati, potessero essere utilizzati per il controllo di patogeni vegetali (Oramahi & Yoshimura, 2013; Yang *et al.*, 2016).

Dal punto di vista applicativo, il fumo può essere distribuito sui semi tal quale (Kulkarni *et al.*, 2011) o come aceto di legno, definito anche distillato di legno o liquore pirolegnoso, liquido e ricco di acetone, acido acetico ed una miscela di diverse altre sostanze organiche con attività antimicrobica. Queste ultime sono principalmente fenoli, alchil-aril eteri e chetoni (Oramahi *et al.*, 2018).

Un'altra metodica prevede l'utilizzo delle Acque Affumicate, in inglese Smoke-Waters (SWs), soluzioni ottenute facendo gorgogliare il fumo prodotto dal processo di pirolisi in dell'acqua distillata. La prima produzione registrata di SWs risale al 1990 (de Lange and Boucher). La produzione di SWs è più dispendiosa rispetto alla distillazione necessaria per ottenere l'aceto di legno, ma di contro, le SWs sembrano essere più efficaci nel controllo delle malattie delle piante e nella stimolazione della loro crescita. Recentemente è stato descritto un effetto fitossico di SWs per applicazioni topiche su diverse piante coltivate (Bonanomi *et al.*, 2021). Opportunamente diluite, le SWs agiscono viceversa come promotori di crescita. In prove di laboratorio le SWs hanno fortemente diminuito la capacità di schiusa di uova del nematode galligeno *Meloidogyne incognita* (Nematoda: Meloidogynidae) e hanno inoltre mostrato l'interessante capacità di repellenza/confusione e attrattività nei confronti di femmine adulte di *B. oleae* (Bonanomi *et al.*, 2021).

### Metaboliti secondari di origine microbica

Per metabolismo primario si intende quel susseguirsi di reazioni biochimiche che portano alla produzione dei metaboliti, necessari per la crescita ed il mantenimento delle funzioni cellulari, e che sono precursori delle biomolecole essenziali come gli acidi nucleici, le proteine, i carboidrati ed i lipidi. Il metabolismo primario è parte integrante della fase di crescita logaritmica o esponenziale, cioè la fase di rapida crescita dei microrganismi, in cui si moltiplicano velocemente sfruttando al massimo le risorse esterne. Alla fine di questa fase c'è il massimo accumulo di metaboliti primari che possono poi essere trasformati in altri prodotti, tra cui i Metaboliti Secondari (MS), nella successiva fase di crescita stazionaria, mediante specifici *pathway*. Sfruttati favorevolmente dall'uomo, anche ben prima della loro scoperta (Demain & Fang, 2000), è solo ad inizio '900 che si comincia ad approfondirne lo studio (Fleming, 1929), quando era pensiero comune che i MS fossero composti a basso peso molecolare prodotti esclusivamente in laboratorio, mentre oggi è ben noto a tutti che sono prodotti dagli esseri viventi in natura (Baquero & Asensio, 1979), soprattutto da piante, microrganismi e funghi (Demain & Fang, 2000; Vinale *et al.*, 2009a). La produzione di MS è spesso completata attraverso dei *pathway* inusuali che contemplano anche precursori ottenuti con il metabolismo primario, come gli amminoacidi (Zeilinger *et al.*, 2016).

I funghi producono una quantità importante di MS che svolgono un ruolo nello sviluppo della virulenza (Fleming, 1929) e varie funzioni di comunicazione e difesa, ponendoli in differenti relazioni con gli altri organismi che vivono nello stesso habitat (Macheleidt *et al.*, 2016). Molti di questi MS hanno interessanti attività biologiche: 1) producono un vantaggio competitivo nei confronti di batteri, piante, insetti, animali ed altri funghi; 2) favoriscono il trasporto di metalli; 3) facilitano la

simbiosi con microbi, piante, nematodi, insetti ecc.; 4) possono fungere da ormoni sessuali (Demain & Fang, 2000).

C'è un'enorme variabilità nella conformazione e nel processo di formazione dei MS, e spesso la loro produzione è correlata a specifici passaggi della differenziazione morfologica e della sporulazione. Inoltre, è stato rilevato che vengono prodotti maggiormente nelle colture in batch rispetto a quelle in continuo (Demain & Fang, 2000) e che sono molto differenti tra i differenti ceppi della stessa specie (Herbert, 1994).

I funghi sono ampiamente utilizzati per la produzione di importanti MS, utilizzabili come antibiotici, vitamine, composti farmaceutici, ma anche fungicidi, regolatori di crescita per le piante ed ormoni. Tra i MS di origine fungina c'è ad esempio la ciclosporina (un principio attivo ad effetto immunosoppressivo), ricavata da *Tolypocladium inflatum*, o la lovastatina, utile nel controllo del colesterolo, prodotta da *Aspergillus terreus* e la penicillina, sintetizzata da *Penicillium chrysogenum*. Sono presenti anche composti non inerenti la sfera della salute umana, come le gibberelline prodotte da *Fusarium fujikuroi*, che sono ormoni vegetali, ma noti anche in quanto fattori di virulenza di questo fungo.

I microrganismi fungini possono produrre MS con azione negativa e tossica, come le micotossine (Demain & Fang, 2000), e tra questi possiamo ricordare gli antiproliferativi e citotossici aspiridoni prodotti da *Aspergillus nidulans*, le aflatossine prodotte da *Aspergillus flavus* e le gliotossine prodotte da *Aspergillus fumigatus*, la cui tossicità viene ascritta al ponte disolfuro presente in questo specifico metabolita (Brakhage, 2013). Nella letteratura veterinaria sono riportati, con molti esempi, effetti tossici delle micotossine su organismi animali, sin dagli anni '70 del secolo scorso, e ciò ha portato ad un crescente interesse della comunità scientifica per l'argomento (Campbell & Stoloff, 1974; Marroquín-Cardona *et al.*, 2014). Tra le principali micotossine pericolose per la salute pubblica ci sono le aflatossine, le ocratossine, le fumonisine, il deossinivalenolo e lo zearalenone, tutti prodotti da funghi distribuiti in tutto il mondo, cosa che ne aumenta la presenza e l'incidenza in cibo e mangimi (H. J. Lee & Ryu, 2017).

I MS di origine fungina sono biosintetizzati come famiglie di sostanze naturali molto simili tra loro, in quanto prodotti da enzimi meno specifici per il loro substrato rispetto a quelli sfruttati per il metabolismo primario (Hanson, 2003). La produzione di alcuni composti rispetto ad altri può essere stimolata modificando il substrato colturale, le condizioni esterne di sviluppo o mimando interazioni biotiche (co-culture) (Vinale *et al.*, 2017a; Pan *et al.*, 2019). Composti inerenti la stessa famiglia, spesso possono mostrare attività biologiche differenti tra loro (Hanson, 2003). La gran parte dei MS

rientra in una delle seguenti famiglie: Polichetidi ed acidi grassi; Terpenoidi e Steroidi; Fenilpropa-  
noidi; Alcaloidi; Amminoacidi specializzati e peptidi (Hanson, 2003). I funghi sintetizzano nume-  
rosi MS con differenti strutture e proprietà chimiche, anche se non sono fondamentali per la loro  
sopravvivenza, in particolare Ascomiceti e Basidiomiceti sono importanti produttori di polichetidi,  
peptidi non ribosomiali, terpeni e alcaloidi, prodotti attraverso *pathway* specifici (Herbert, 1994) e  
molto variegati (Chiang *et al.*, 2009). I MS prodotti possono sia venire incorporati in elementi cel-  
lulari strutturali sia essere rilasciati nell'ambiente come sostanze volatili o solubili, svolgendo così  
importanti ruoli nella regolazione delle interazioni tra gli organismi. Le fitotossine, ad esempio,  
sono prodotte da funghi patogeni e sono parte integrante delle interazioni con gli ospiti. Anche le  
micotossine che abbiamo detto possono causare danni e addirittura morte negli animali, vengono  
prodotte durante la colonizzazione delle piante ospiti. I pigmenti fungini hanno un'attività antiossi-  
dante e gli antibiotici hanno la capacità di inibire o uccidere altri microorganismi. Va comunque  
ricordato che le attività biologiche non sono limitate ad un gruppo specifico o ad un singolo meta-  
bolita e che ognuno di essi può produrre effetti differenti su differenti e specifici target (Karlovsky,  
2008). Gli antibiotici vengono prodotti dai funghi per ottenere un vantaggio competitivo, che gli  
permette poi di poter occupare spazio e quindi avere un miglior accesso ai nutrienti. Gran parte dei  
MS utili di origine fungina sono stati isolati e caratterizzati con un approccio che prevede il costante  
monitoraggio della bioattività dei composti durante i test *in vitro* ed *in vivo*. Di tutte le frazioni così  
generate viene valutata l'attività biologica, vengono poi selezionate solo quelle che presentano l'at-  
tività desiderata, continuando questa procedura finché non viene purificato il principio attivo  
(Ghisalberti, 2003; Colegate & Molyneux, 2008).

### Funghi appartenenti al genere *Trichoderma* e loro attività

*Trichoderma* è un deuteromicete che è possibile isolare su diversi substrati ma difficilmente a carico  
di piante vive (Samuels, 1996). Vari ceppi fungini appartenenti al genere *Trichoderma* hanno un'im-  
portante capacità di controllo nei confronti di funghi fitopatogeni (Migheli *et al.*, 1998; Mukherjee  
*et al.*, 2003; Lorito *et al.*, 2010) e numerose specie hanno mostrato anche di avere effetti positivi  
sulle colture (Dixit *et al.*, 2011), come induttori di resistenza a stress biotici ed abiotici e/o svolgendo  
attività biofertilizzanti (Woo & Pepe, 2018).

L'attività di biocontrollo viene realizzata mediante differenti sistemi:

- 1- antibiosi, spesso in combinazione con produzione di enzimi in grado di degradare le pareti cellulari, in modo da poter inibire la crescita.
- 2- parassitismo diretto (M. Mukherjee *et al.*, 2007; Ruocco *et al.*, 2009; López-Mondéjar *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2011);

- 3- competizione diretta per le fonti nutrizionali come il ferro o l'azoto e per l'occupazione delle nicchie ecologiche e degli spazi fisici (Vinale & Sivasithamparam, 2020);
- 4- stimolazione o induzione di meccanismi nelle piante coinvolti nella resistenza (Whipps, 2001; Harman *et al.*, 2004; Vinale *et al.*, 2008a; Vinale *et al.*, 2008b).

#### Ruolo dei metaboliti secondari di *Trichoderma* spp.

La produzione di MS attivi è stata spesso descritta in ceppi di *Trichoderma* e la loro efficacia è stata dimostrata mediante l'utilizzo di ceppi mutati, con produzione di MS alterata o assente rispetto al ceppo originale (Whipps, 2001). Una delle caratteristiche tipiche del genere *Trichoderma* è correlata all'importante variabilità nella produzione di MS (Keswani *et al.*, 2019) e nei cluster biosintetici di alcune specie come *T. atroviride* e *T. virens*, probabilmente dovuta al fatto che questi funghi svolgevano una vita micoparassitica in passato (Druzhinina *et al.*, 2011; Kubicek *et al.*, 2011), meno spinta invece in specie come *Trichoderma reesei* (Kubicek *et al.*, 2011).

I MS osservati in *Trichoderma* spp. appartengono a diverse classi di sostanze naturali: dai polichetidi ai terpeni e peptaiboli (Sivasithamparam & Ghisalberti, 1998; Vinale *et al.*, 2008a; Vinale *et al.*, 2008b; Reino *et al.*, 2008).

L'analisi dei genomi sequenziati di *Trichoderma*, tra cui *T. atroviride*, *T. gamsii*, *T. harzianum*, *T. reesei* e *T. virens*, ha permesso l'identificazione di differenti geni coinvolti nella produzione di MS (Mukherjee *et al.*, 2012a; Mukherjee *et al.*, 2012b). Alcuni rientrano nel cluster genetico per la codifica di fattori di trasporto e trascrizione, di enzimi come la polichetide sintetasi, sintetasi di peptidi non ribosomiali, sintetasi di terpeni ed altri enzimi come le ossidoreduttasi (Zeilinger *et al.*, 2016). Alcuni MS in *Trichoderma* spp. si comportano come pattern molecolari coinvolti nell'induzione della resistenza o l'attivazione di un network necessario per sopperire ad un attacco di un patogeno o ad uno stress ambientale (Hermosa *et al.*, 2013).

Il 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone (6PP) è un pirone caratterizzato da forte aroma di cocco che è stato identificato ed isolato da differenti specie di *Trichoderma*, tra cui: *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. koningii* e *T. viride* (Collins & Halim, 1972; Claydon *et al.*, 1987; Simon *et al.*, 1988), la cui produzione è in stretta relazione con le capacità di biocontrollo (Worasatit *et al.*, 1994; Poole *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2012; Mutawila *et al.*, 2016). Un altro MS correlato all'attività antagonistica di *Trichoderma* spp. è l'harzianolide, isolato da *T. harzianum* (Almassi *et al.*, 1991; Claydon *et al.*, 1991; Ordentlich *et al.*, 1992; Vinale *et al.*, 2006) e che ha mostrato attività contro *Gaeumannomyces graminis* (Almassi *et al.*, 1991; Vinale *et al.*, 2006), limitato la crescita nei confronti di *P. ultimum*, *R. solani* (Vinale *et al.*, 2006), *B. cinerea*, *P. ultimum* e *R. solani* (Vinale *et al.*, 2009a). Tra gli altri MS isolati da *Trichoderma* spp. correlati all'attività antagonistica di questi funghi possiamo citare ad esempio

la viridina, il cerinolattone, la gliotossina, la gliovirina ed il T22azafilone che ha mostrato attività antifungina contro *B. cinerea*, *Leptosphaeria maculans*, *G. graminis* var. *tritici*, *P. cinnamomi*, *P. ultimum*, *R. solani* (Vinale *et al.*, 2006; Vinale *et al.*, 2009a), oltre a diversi altri peptaiboli (Vinale *et al.*, 2008a; 2008b), la tricodermina (Jin *et al.*, 2007; Degenkolb *et al.*, 2008; Y. Shi *et al.*, 2009; Sha *et al.*, 2013; Shentu *et al.*, 2014), l'harziandione (Ghisalberti *et al.*, 1992; Mannina *et al.*, 1997), il 10,11-diidrocicloneretriolo, la cateniobliuna C, il sohrinone A (Qi-Cun *et al.*, 2014a) e le koningine, isolate inizialmente da *T. koningii*, da cui prendono il nome, ma anche da *T. harzianum* (Ghisalberti & Rowland, 1993) e *T. aureoviride* (Cutler *et al.*, 1999). Le koningine sono dei pirani che hanno sia un effetto benefico diretto per le piante (Vinale *et al.*, 2014) sia attività antibiotica contro *G. graminis* var. *tritici* (Almassi *et al.*, 1991; Ghisalberti & Rowland, 1993), *F. oxysporum*, *Bipolaris sorokiniana*, *P. cinnamomi*, *Pythium middletonii* (Dunlop *et al.*, 1989), *Alternaria panax*, *F. oxysporum* e *Fusarium solani* (Chen *et al.*, 2015). *T. harzianum* e *T. koningii* producono anche steroidi, risultati efficaci nel controllo di *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *C. albicans*, *Macrophomina phaseolina*, *F. oxysporum*, *Pyricularia oryzae*, *R. solani* e *S. rolfsii* (Ahluwalia *et al.*, 2014, 2015; Qi-Cun *et al.*, 2014b).

#### *Metaboliti Secondari coinvolti nella competizione*

Tra le varie abilità mostrate dai funghi del genere *Trichoderma* rientra anche la capacità di competere con altri microrganismi per l'ottenimento di fonti di sostentamento, necessarie per lo sviluppo e la riproduzione. Tra i nutrienti essenziali per lo sviluppo c'è il ferro, poco disponibile in condizioni aerobiche, soprattutto per la tendenza naturale di  $Fe^{3+}$  a reagire con l'ossigeno per formare idrossidi ferrici insolubili (Expert, 1999). Alcuni ceppi utilizzano dei composti organici a basso peso molecolare, chiamati siderofori, capaci di chelare stabilmente il  $Fe^{3+}$ . Questa capacità può essere sfruttata sia nel biocontrollo o nei processi di biorisanamento, sia per promuovere la crescita delle piante (Ahmed & Holmström, 2014).

In condizioni di particolare carenza di ferro, alcuni ceppi di *Trichoderma* hanno la capacità di rilasciare coprogeno, coprogeno B, coprogeno C e ferricrocina (Anke *et al.*, 1991). Tra i siderofori vi è l'acido harzianico (HA) (Vinale *et al.*, 2013) (Figura 1), isolato da filtrati colturali di *T. harzianum* (M10) che ha mostrato avere la capacità di promuovere la crescita nelle piante (Vinale *et al.*, 2009a; 2009b) e di inibire la crescita di vari funghi, come *Pythium irregular*, *R. solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* (Vinale *et al.*, 2012a) e *Uncinula necator* (Pascale *et al.*, 2017).

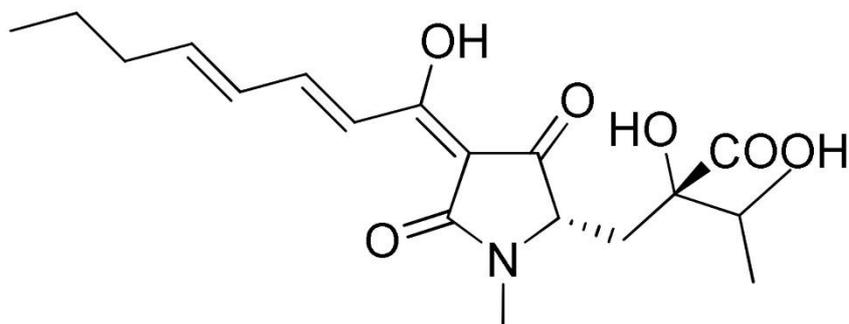


Figura 1: Struttura dell'acido harzianico (HA).

### Metaboliti Secondari coinvolti nell'induzione di resistenza

L'attività di biocontrollo in alcuni casi avviene in maniera indiretta, stimolando cioè la resistenza della pianta ospite (Harman *et al.*, 2004; Vinale *et al.*, 2008a; 2008b), e questa risposta positiva può variare in funzione del corredo genetico delle piante stesse (Lorito *et al.*, 2010).

I metaboliti secondari possono comportarsi come composti antibiotici ma anche essere coinvolti nell'induzione di resistenza nell'ospite (Vinale *et al.*, 2012b), come dimostrato dalla diminuzione dei sintomi degli attacchi di *Botrytis cinerea* e *Leptosphaeria maculans* in pomodoro e colza dopo l'applicazione di 6PP (Vinale *et al.*, 2008a; 2008b).

I polichetidi sono i MS più prodotti in natura (Ramírez-Valdespino *et al.*, 2019), e uno di questi, l'aspinolide C, prodotto da *Trichoderma arundinaceum*, induce resistenza nelle piante stimolando l'espressione dei geni PR1b1 e PR-P2 coinvolti nel *pathway* mediato dall'acido salicilico (SA), mentre un suo derivato (aspinolide B) sopprime parzialmente i geni relativi al SA, risultando avere efficacia contro funghi patogeni come *B. cinerea* e *Fusarium sporotrichioides* (Malmierca *et al.*, 2015a). La sovra espressione di geni *pal1* e *aos*, coinvolti nella difesa nelle piante di mais durante le interazioni con *T. vires* è correlata ai MS prodotti dal fungo (Mukherjee *et al.*, 2012a; 2012b).

I VOC svolgono un ruolo cruciale nelle interazioni multitrofiche (Ramírez-Valdespino *et al.*, 2019) ed alcuni di questi inducono l'espressione di geni correlati al SA, come nel caso del tricodiene, che può limitare anche lo sviluppo di radici accessorie, come accade anche per il 6PP, lasciando dedurre che questo specifico VOC è coinvolto nell'invio/ricezione di segnali tra pianta e fungo (Malmierca *et al.*, 2015b).

Gli enzimi Nox1 e NoxR svolgono un ruolo di regolazione nei processi di interazione di *T. atroviride*, nello specifico, una carenza di uno dei due porta ad una liberazione di VOC con un effetto inibitorio sulla crescita delle piante mentre Nox2 può essere implicato nella regolazione della produzione di altri VOC con attività fungistatica (Cruz-Magalhães *et al.*, 2019). Anche i peptaiboli, ampiamente prodotti dai funghi di questo genere (Degenkolb *et al.*, 2003), possono svolgere un

ruolo di elicitori di difese nelle piante in contatto con i funghi che li producono (Engelberth *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2003; Viterbo *et al.*, 2007), ad esempio i peptaiboli 11-, 14- e 18-mer di *T. virens* sono importanti antibiotici ma al contempo inducono la sintesi di SA in *Arabidopsis thaliana* (Velázquez-Robledo *et al.*, 2011). *T. longibrachiatum* produce invece la trichokonina VI, che ha l'abilità di alterare la struttura delle radici dell'ospite, aumentandone il contenuto in auxine all'interno ed interrompendone il gradiente, agendo sulla loro biosintesi in loco e sul loro trasporto polare (W.-L. Shi *et al.*, 2016).

#### *Metaboliti Secondari coinvolti nella promozione della crescita*

I funghi appartenenti al genere *Trichoderma* possono migliorare la germinazione, la crescita e la resa delle piante (Harman *et al.*, 2004). L'applicazione di diversi MS di *Trichoderma* spp. tra cui il 6PP, le koningine, il trichocarano A-D, l'harzianopyridone, il cicloneodiolo, l'harzianolide e l'acido harzianico, può modulare la crescita ed avere effetti di promozione con un'azione auxino-simile (Cutler *et al.*, 1986, 1989; Cutler & Jacyno, 1991; Macías *et al.*, 2000; Vinale *et al.*, 2008a; 2008b; 2009a; 2009b; Garnica-Vergara *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2016; Nieto-Jacobo *et al.*, 2017). Prove condotte con 6PP applicato a piantine di *Solanum lycopersicum* L. 1753 hanno dimostrato come gli effetti siano dose dipendenti (Mazzei *et al.*, 2016), mentre in altre prove si è registrata la capacità di aumentare la resa, il quantitativo di polifenoli e dell'attività antiossidante nell'uva (Pascale *et al.*, 2017). Il cerinolattone, un metabolita estratto da *T. cerinum* (Vinale *et al.*, 2012b), limita la crescita di *Rosellinia necatrix* (Arjona-Girona *et al.*, 2014) ma al contempo stimola la germinazione dei semi di pomodoro dopo soli tre giorni dall'applicazione (Vinale *et al.*, 2012b), analogamente a quanto mostrato anche da altri composti simili (Kim *et al.*, 2006; Vinale *et al.*, 2016). La crescita, la resa e l'assorbimento di nutrienti da parte di piante di soia sono invece migliorate con applicazioni di HA, 6PP e combinazioni di vari ceppi di *Trichoderma* (Marra *et al.*, 2019).

## Scopo della Tesi

Il progetto di ricerca svolto in questo triennio ha avuto lo scopo di individuare nuove soluzioni per il controllo di *B. oleae*. In particolare, il disegno sperimentale è stato costruito per verificare le risposte di fitness della mosca alle alterazioni della carica del simbionte “*Ca. Erwinia dacicola*” in un’ottica ecosostenibile, utilizzando sostanze in grado di inibire il microrganismo simbionte. Le prove sono state condotte su individui provenienti da popolazioni selvatiche aggiungendo alle diete i composti da saggiare, in condizioni di laboratorio ottimali. La scelta di utilizzare mosche selvatiche (mosche *wild* - Mw) è basata sulla necessità di valutare l’attività delle sostanze in condizioni quanto più possibile simili a quelle rinvenibili su popolazioni di campo, in particolare in riferimento al microbiota dell’insetto. Allo scopo, sono state impiegate sostanze naturali di origine fungina in forma pura (acido harzianico e 6-pentil- $\alpha$ -pirone) o in miscela (estratti da filtrati colturali di *Coniothyrium aleurites* e *Trichoderma saturnisporum*). Inoltre, il butenolide naturale denominato karrikinolide e le acque affumicate (SWs) ottenute per raccolta dei fumi per la produzione di biochars sono stati utilizzati con l’obiettivo sia di contenere il simbionte sia di controllare direttamente la popolazione di mosca delle olive.

I dati raccolti hanno riguardato i quantitativi medi di dieta consumata, la mortalità per entrambi i sessi ed eventuali alterazioni di fitness connessa alla capacità di accoppiamento ed ovideposizione delle femmine. Sulla progenie ottenuta da mosche così trattate, è stata valutata la capacità di completare il ciclo biologico, fino allo sfarfallamento dei nuovi adulti e la loro *sex ratio*.

Con la supervisione del Prof. David Giron, presso l’Institut de Recherche sur la Biologie de l’Insecte (IRBI) di Tours (FR), è stato possibile analizzare il microbioma mediante real-time qPCR sul DNA estratto dai BE degli individui adulti. In tal modo è stato possibile valutare l’effettiva alterazione del titolo di “*Ca. Erwinia dacicola*” dovuto alla somministrazione delle sostanze scelte per i biosaggi.

Sono stati allestiti biosaggi in laboratorio e prove in pieno campo per valutare gli effetti delle acque affumicate sull’etologia e sulla biologia della mosca. Le SWs sono state applicate a varie concentrazioni ed in miscela per analizzare l’attività in “olfattometro a doppia scelta”, per verificare l’eventuale variazione del comportamento delle mosche in presenza di olive attrattive, ed in biosaggi topici. In collaborazione con il Dipartimento di Scienze Agrarie, degli Alimenti e dell’Ambiente dell’Università di Foggia, sono state condotte analisi elettro-antennografiche delle singole SWs. Le diverse SWs sono state caratterizzate mediante gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS) presso la School of Molecular Sciences dell’University of Western Australia, in Crawley (Perth - WA).

Nel biennio 2019-2020 sono state svolte prove di campo utilizzando le miscele di SWs sia presso l'azienda partner I.L.Co.A. (partner del presente dottorato industriale), sita in Crotone, sia nell'azienda Olio Carcillo, sita in Pozzilli (IS). La distanza e le differenze pedoclimatiche tra i due luoghi in cui si sono svolte le prove hanno permesso anche di valutare se l'effetto riscontrato fosse dipendente da fattori esterni. Anche per queste prove è stata valutata la presenza del simbionte naturalmente presente nelle popolazioni oggetto di studio.

## Materiali & Metodi

### Biosaggi di Ingestione

#### Raccolta e Allevamento

Branche con drupe ad inizio allegagione, di olivi *cv.* Leccino (Parco Gussone, di Portici (NA), UTM: 445093,878 E; 4518644,785 N 33T) sono state protette con manicotti di tessuto non tessuto al fine di preservare per il maggior tempo possibile le olive da attacchi di *B. oleae*. All'interno dei manicotti è stata inserita della paglia in modo da interporre una barriera fisica alla infestazione di *B. oleae* e di rallentare al contempo lo sviluppo delle olive, consentendo una disponibilità prolungata di drupe verdi e fresche per l'intero periodo delle sperimentazioni (Figura 2). I biosaggi sono stati svolti utilizzando esclusivamente insetti selvatici (Mw), che assicuravano popolazioni naturali di “*Ca. Erwinia dacicola*”.



Figura 2: Manicotti protettivi su branche di olivo per preservare per il maggior tempo possibile le olive da attacchi di *B. oleae* e manicotto aperto con olive ancora verdi e fresche (a dicembre 2019).

#### Produzione di filtrati colturali fungini

I composti utilizzati nei biosaggi sono stati estratti da filtrati colturali di *Trichoderma harzianum* M10 (Vinale *et al.*, 2009b). 20  $\mu$ l di una sospensione di spore in acqua ( $1 \cdot 10^8$  spore/ml) sono stati inoculati in piastre Petri di 90 mm  $\varnothing$  contenenti un terreno di coltura di Potato Dextrose Agar (© PDA - HiMedia, Mumbai, MS, India), preparato secondo le indicazioni in etichetta ed aggiungendo acido lattico al 5% per prevenire proliferazioni batteriche. Un'incubazione al buio a  $24 \pm 2$  °C ha permesso così alle colonie di svilupparsi sul mezzo selettivo fino a riempire le piastre Petri ed a completa sporulazione. Metà del contenuto di ogni singola piastra è stato suddiviso in piccoli pezzi inoculati in condizioni di sterilità sotto cappa a flusso laminare, in una beuta (Pyrex, 5 l) contenente 2,5 l di substrato liquido Potato Dextrose Broth (© PDB HiMedia, Mumbai, MS, India). Ogni beuta è stata poi incubata a 25 °C in condizioni statiche per tre mesi fino a completa sporulazione del

micelio superficiale (Figura 3). Al termine dell'incubazione il micelio è stato rimosso mediante filtrazione sotto vuoto con filtri in tessuto non tessuto. Il filtrato colturale è stato conservato a 4 °C fino alla successiva fase di estrazione.



Figura 3: colonie di *Trichoderma harzianum* in fase di sviluppo su medium solido e liquido.

## Estrazione ed isolamento dei metaboliti secondari fungini

### Estrazione

Il filtrato colturale è stato sottoposto ad estrazione liquido/liquido con solvente organico. Il filtrato, posto sotto cappa chimica, è stato versato in un imbuto separatore ed estratto con Acetato di Etile (EtOAc -  $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$  -  $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ ), rapporto filtrato acquoso/solvente 1:1 v/v. Le densità differenti dei due fluidi hanno dato luogo ad una separazione di fase. Il protocollo prevede a questo punto ripetuti passaggi di agitazione e riposo per ottimizzare il passaggio dell'estratto nell'Acetato di Etile.

Nel dettaglio si è così proceduto:

- Agitazione vigorosa per 3 volte dell'imbuto separatore ed attesa che si creasse una nuova separazione di fase completa. } X 3
- Deflusso dell'esausto acquoso (più denso) in una beuta posta al di sotto dell'imbuto separatore, utilizzando l'apposito rubinetto di cui è provvisto, per riversarlo nello stesso imbuto dall'apertura posta in alto, prima di richiuderla. } X 3

L'Acetato di Etile è stato raccolto ed addizionato di Solfato di Sodio Anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) allo scopo di rimuovere l'acqua presente. La soluzione è stata poi filtrata utilizzando carta da filtro (© Whatman No. 4, Brentford, UK) e versata in un pallone di vetro per la successiva eliminazione del solvente al Rotavapor (© IKA - RV10 digital) (Figura 4).

Al termine dell'eliminazione del solvente, il residuo solido è stato raccolto solubilizzandolo con il minimo volume possibile di Acetato di Etile e versato in una vial con tappo a pressione, pulita e precedentemente pesata. Il solvente è stato nuovamente rimosso in corrente di azoto ed il residuo è stato quantificato (400 mg per litro di filtrato colturale).

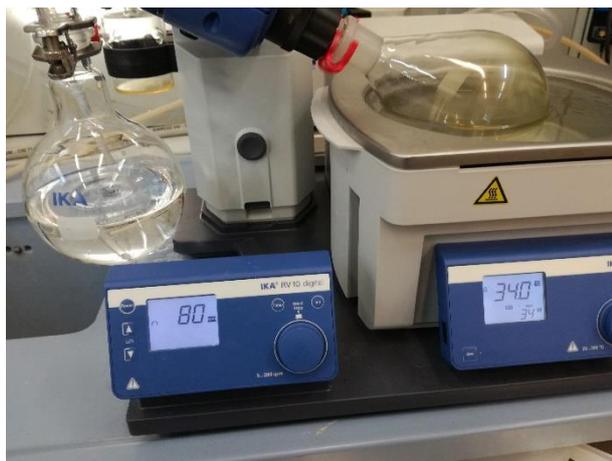


Figura 4: Distillazione al Rotavapor durante il processo di estrazione di metaboliti secondari da colonie fungine.

### Isolamento dell'acido harzianico

L'isolamento dell'Acido Harzianico (HA) è stato condotto in ambiente basico. In particolare, il residuo organico è stato solubilizzato in Diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , a 10 mg/ml). La soluzione ottenuta è stata versata in un imbuto separatore in cui è stato successivamente aggiunto Idrossido di Sodio (NaOH) 2M in rapporto 1:2. Si è quindi proceduto con una nuova serie di agitazioni della miscela alternate a periodi di riposo, di seguito descritta nel dettaglio:

- Agitazione vigorosa per 3 volte dell'imbuto separatore ed attesa che si creasse una nuova separazione di fase completa. } X 3
- Recupero della fase inferiore costituita da Diclorometano e della meno densa, contenente gli acidi Harzianico ed iso-Harzianico, per conservarla. Aggiunta nell'imbuto separatore di nuovo Idrossido di Sodio (NaOH) 2M in rapporto 1:2 con il Diclorometano recuperato e reinserto nell'imbuto. } X 3

Con l'ultima separazione, il Diclorometano contenente le impurezze apolari è stato eliminato definitivamente. Tutta la soluzione basica (NaOH) ottenuta è addizionata di Acido Cloridrico (HCl) 2 M in agitazione fino ad intorbidimento della soluzione (precipitazione degli acidi organici HA ed isoHA).

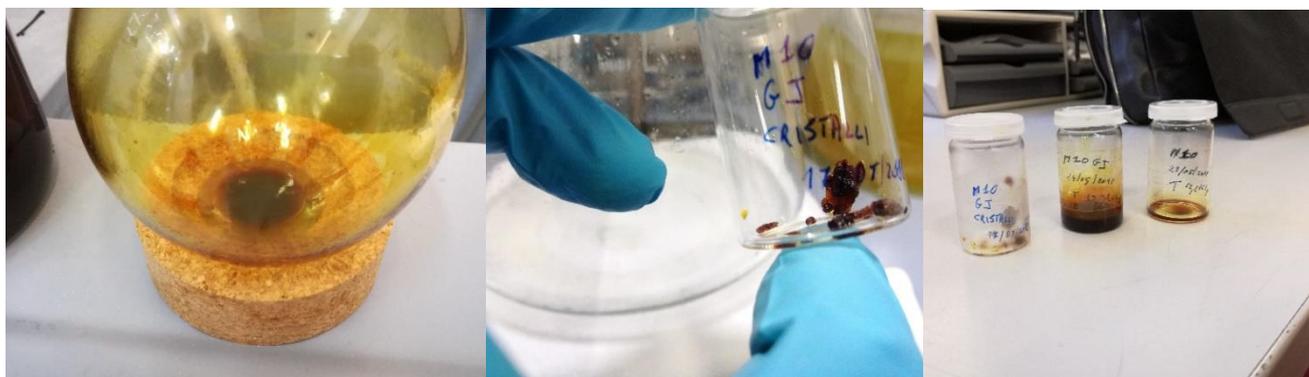
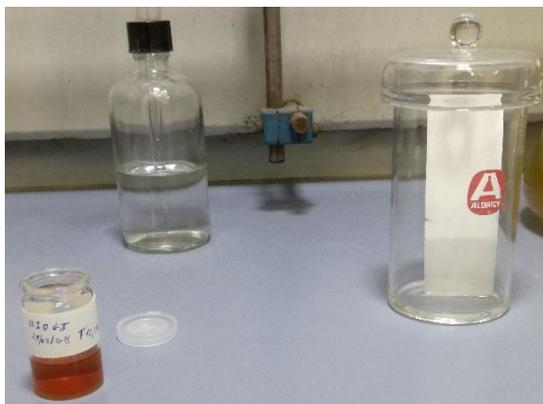


Figura 5: Ultimi passaggi dell'estrazione di acido harzianico da culture fungine e materiale puro ottenuto (cristalli).

Il precipitato ottenuto è stato filtrato sottovuoto ed il liquido raccolto nella beuta codata è stato eliminato. Il precipitato presente sul filtro Büchner è stato recuperato mediante lavaggi con Acetato di Etile. La soluzione così ottenuta è stata anidrificata con Solfato di Sodio Anidro e mescolata per eliminare residui acquosi. Sono stati quindi ripetuti i passaggi già descritti per la prima fase e nella vial con tappo a pressione è stato raccolto esclusivamente HA (Figura 5). Prima di procedere con la



*Figura 6:* Cromatografia su Strato Sottile (Thin Layer Chromatography - TLC) a fase inversa delle sostanze estratte con lamina sottile (Alluminio + C18) ed un eluente composto da Metanolo (CH<sub>3</sub>OH), Acetonitrile (CH<sub>3</sub>CN) ed acqua sterile in rapporto 3:4:3 in una camera cilindrica di vetro chiusa.

disidratazione spinta, l'estratto è stato analizzato con la Cromatografia su Strato Sottile (Thin Layer Chromatography - TLC) a fase inversa, utilizzando una lamina sottile (Alluminio + C18) ed un eluente composto da Metanolo (CH<sub>3</sub>OH), Acetonitrile (CH<sub>3</sub>CN) ed acqua sterile in rapporto 3:4:3 in una camera cilindrica di vetro chiusa (Figura 6). Il prodotto isolato è stato anche caratterizzato mediante analisi LC-MS qTOF. Il metabolita presentava gli stessi valori di R<sub>f</sub> (TLC) e MS (LC-MS qTOF) di uno standard autentico già presente nei nostri laboratori. La resa finale di tutti i procedimenti è stata di circa 250 mg di HA.

## Preparazione delle Diete

Le diete utilizzate per i biosaggi sono state preparate diluendo il composto scelto in 300 mg di saccarosio e sono state previste quattro repliche. Per ogni trattamento, sono state preparate diete a tre diluizioni consecutive con rapporto di 1:5. Inoltre, sono state preparate le diete di controllo positiva e negativa, costituite rispettivamente da solo saccarosio e da saccarosio e Piperacillina (© Sigma) in quantità di 100 µg/ml. Le sostanze utilizzate per le diete sono state preventivamente diluite al 5% in peso secco, sempre in saccarosio. Le diete sono state dunque preparate secondo lo schema in Tabella 4.

Ad ogni dieta sono stati aggiunti 150 µl di acqua distillata per miscelare tutte le componenti all'interno di piastre Petri di 3 cm ø. Una volta completamente diluite e ben miscelate, sono state lasciate asciugare totalmente in ambiente controllato, in laboratorio. Ogni dieta è stata pesata per ottenere i dati di consumo.

Codice	Sostanze saggate	%
CONT	Saccarosio	100
ANT	Piperacillina	0,001
HA-5	Acido Harzianico	0,5
HA-1		0,1
HA-2		0,02
6PP-5	6-pentyl- $\alpha$ -pirone	0,5
6PP-1		0,1
6PP-2		0,02
Cu-5	Ossicloruro di Rame	0,5
Cu-1		0,1
Cu-2		0,02
MET-5	Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di <i>Coniothyrium aleurites</i>	0,5
MET-1		0,1
MET-2		0,02
TRI-5	Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di <i>Trichoderma saturnisporum</i>	0,5
TRI-1		0,1
TRI-2		0,02
K	Karrikinolide	0,0001
Rep. MIX	Mix di Acque Affumicate ottenute da cellulosa, legno, mais ed erba medica, a 300 e 500 °C	150 $\mu$ l
Attr. MIX	Mix di Acque Affumicate ottenute da sansa di olive a 300 e 500 °C	150 $\mu$ l

Tabella 4: Elenco dei trattamenti utilizzati durante i biosaggi, loro codici identificativi e quantità per unità di dieta.

## Biosaggi di ingestione

Sono state raccolte ogni due settimane e nello stesso sito, olive con punture di ovideposizione di *B. oleae*, e conservate in contenitori di plastica di dimensioni 35 x 25 x 15 cm (Storage Box Spring), provvisti di fori di areazione. I contenitori sono stati posti in cella climatizzata a  $24 \pm 2$  °C,  $60 \pm 10\%$  UR e 12:12 rapporto luce/buio. Sul fondo è stato posto uno strato di carta assorbente. La presenza di pupari di Mw è stata controllata ogni due giorni. I pupari sono stati raccolti e trasferiti in cilindri di plastica trasparente di 20 cm  $\varnothing$  x 15 cm d'altezza, provvisti di tappo a pressione, con fori d'areazione, e mantenuti anch'essi in condizioni ottimali, in attesa degli sfarfallamenti. Allo sfarfallamento, le Mw sono state raccolte utilizzando un aspiratore in gruppi di 15 individui distinti per



Figura 7: Primo passaggio del biosaggio di ingestione con i sessi separati (A), olive verdi esposte per il secondo passaggio (B) e femmina di *B. oleae* ovideponente durante quest'ultimo (C).

sesto. Ogni gruppo è stato alimentato *ad libitum* per 14 giorni con la dieta specifica a loro destinata dal programma delle prove (Fig. 7A). A ciascun gruppo è stato assicurato l'abbeveramento mediante batuffoli di ovatta, imbevuti quotidianamente d'acqua, disposti sul tappo dei contenitori. Dopo 14 giorni, con le mosche nutrite con la stessa dieta, sono stati costituiti gruppi di un numero variabile di individui sopravvissuti e di entrambi i sessi (Fig. 7B). A questi, oltre la dieta, sono state esposte per tre giorni olive verdi e fresche in rapporto 1:1 con le femmine presenti nei singoli gruppi di biosaggio (Fig. 7C). Questa seconda fase è stata ripetuta per due volte, quindi le mosche sono state raccolte e conservate in alcool 90% a -18 °C.

## Metodologie di Raccolta ed Elaborazione dei Dati Biologici

Alla fine di ogni replica sono stati raccolti i seguenti dati:

**Mortalità:** al 14<sup>mo</sup> giorno di trattamento e per i due sessi.

**Consumo di dieta:** Le diete sono state pesate all'inizio ed al termine delle singole prove. Il consumo di dieta è stato espresso con il valore medio calcolato in funzione della mortalità riscontrata durante le prove.

**Ovideposizioni:** È stato calcolato il numero di punture medio per drupa e per femmina. La metà delle drupe con punture di ovideposizione sono state dissezionate per valutare il rapporto tra punture sterili e fertili.

**Mortalità allo stadio di pupa, *sex ratio* e adulti neosfarfallati:** La metà delle olive con punture di ovideposizione è stata posta in camera climatizzata  $24 \pm 2$  °C,  $60 \pm 10\%$  UR e 12:12 rapporto luce/buio. Sono stati computati il numero di nuovi adulti sfarfallati, la *sex ratio*.

**Mortalità degli stadi preimaginali della F1:** è stata rilevata la mortalità allo stadio di pupa.

**Elaborazione dei dati:** I dati osservati sono stati preventivamente elaborati con una media delle due esposizioni di tutte le repliche biologiche, ponderata sul numero di olive esposte. I dati così ottenuti sono stati sottoposti all'analisi della varianza a una via (ANOVA) e al test post-hoc di Student-Newman-Keuls per valutare le eventuali differenze significative.

## Metodologie di Raccolta ed Elaborazione dei Dati Molecolari

### Effetti dei trattamenti sul simbiote

Sono state utilizzate 4 femmine per ogni gruppo di ogni replica. Le analisi sono state condotte presso i laboratori dell'Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte (IRBI) dell'Université de Tours (Francia) e presso il laboratorio Tremblay del Dipartimento di Agraria dell'Università degli studi di Napoli "Federico II". Le quantificazioni assolute del simbiote ospitato nel BE e negli addomi (ADs) sono state ottenute mediante qPCR Real-Time. Per procedere all'estrazione del DNA è stato utilizzato il protocollo High-Salt, leggermente modificato. Questo, basato sulla precipitazione, non necessita di alcun kit specifico, ad eccezione del buffer TNES costituito da 2,5 ml 1 M Tris-HCl con pH = 7,5, 4 ml 5M NaCl, 10 ml EDTA, 5 ml SDS 0,5% ed aggiunta finale di acqua fino a raggiungere il volume di 50 ml. Sotto cappa laminare, i campioni sono stati lavati velocemente in Ipoclorito di Sodio 5% e risciacquati più volte in acqua distillata, successivamente sono stati lasciati ad asciugare su carta assorbente sterile. I campioni così trattati, sono stati dissezionati con una lama da bisturi sterile separando il capo e l'addome dal torace, facendo attenzione ad eliminare eventuali residui di zampe e ali, che avrebbero potuto interferire con il processo di estrazione. Le parti dissezionate sono state poste in due Eppendorf safe-lock 1,5 ml., distinte per la regione del corpo, con l'aggiunta di 35 µl di una soluzione di Proteinasi K 20 mg/ml (Thermo Fisher Scientific Waltham, Massachusetts – USA). Il contenuto della provetta è stato quindi pestellato con un pestello sterile, successivamente sono stati aggiunti 600 µl di TNES, ed è stato ancora pestellato e rimestato al fine di distruggere e mescolare meccanicamente tutte le cellule presenti ed il loro contenuto. Le provette sono state chiuse e poste in un bagnetto a 55 °C per 3 ore. Completato questo step, sono stati aggiunti 166,7 µl di NaCl 6M in ogni provetta che è stata poi agitata per inversione 5 volte e centrifugata a 13300 rpm per 7 minuti a temperatura ambiente (20 °C ± 2°C). Il surnatante è stato recuperato delicatamente e messo in una nuova Eppendorf safe-lock da 1,5 ml ed è stato aggiunto un volume uguale, ~ 600-700 µl, di Etanolo 100% preliminarmente conservato in ghiaccio per 30 minuti. Le Eppendorf sono state agitate per inversione 15 volte e messe in centrifuga refrigerata a 4 °C per 18 minuti a 13300 rpm. Facendo attenzione a non eliminare il DNA, (talvolta visibile come massa biancastra), si è proceduto all'allontanamento dell'Etanolo. Ad ogni provetta sono stati aggiunti nuovamente 450 µl Etanolo 100% freddo, poi ancora eliminato dopo 5 agitazioni per inversione. La procedura è stata ripetuta un'ultima volta con 450 µl di Etanolo 70% a temperatura ambiente, successivamente eliminato lasciando le provette aperte in ghiaccio, per far evaporare gli ultimi residui di Etanolo. La durata di questa fase è stata variabile, a partire da un minimo di 25-30 minuti, in funzione della temperatura del laboratorio. Il pellet di DNA così ottenuto è stato risospeso in 20 µl

di acqua distillata sterile. Lo stesso protocollo di estrazione è stato applicato anche su più pool di mosche selvatiche e non trattate, con l'obiettivo di ottenere una curva standard per la comparazione dei dati. Si è quindi proceduto alla clonazione della regione 16s dell'rDNA di "Ca. Erwinia dacicola" su vettori *Escherichia coli*, utilizzando il TOPO® TA Cloning® Kit (Life Technologies - Thermo Fisher Scientific - Carlsbad, California, U.S.A.) e la stessa coppia di primer usata

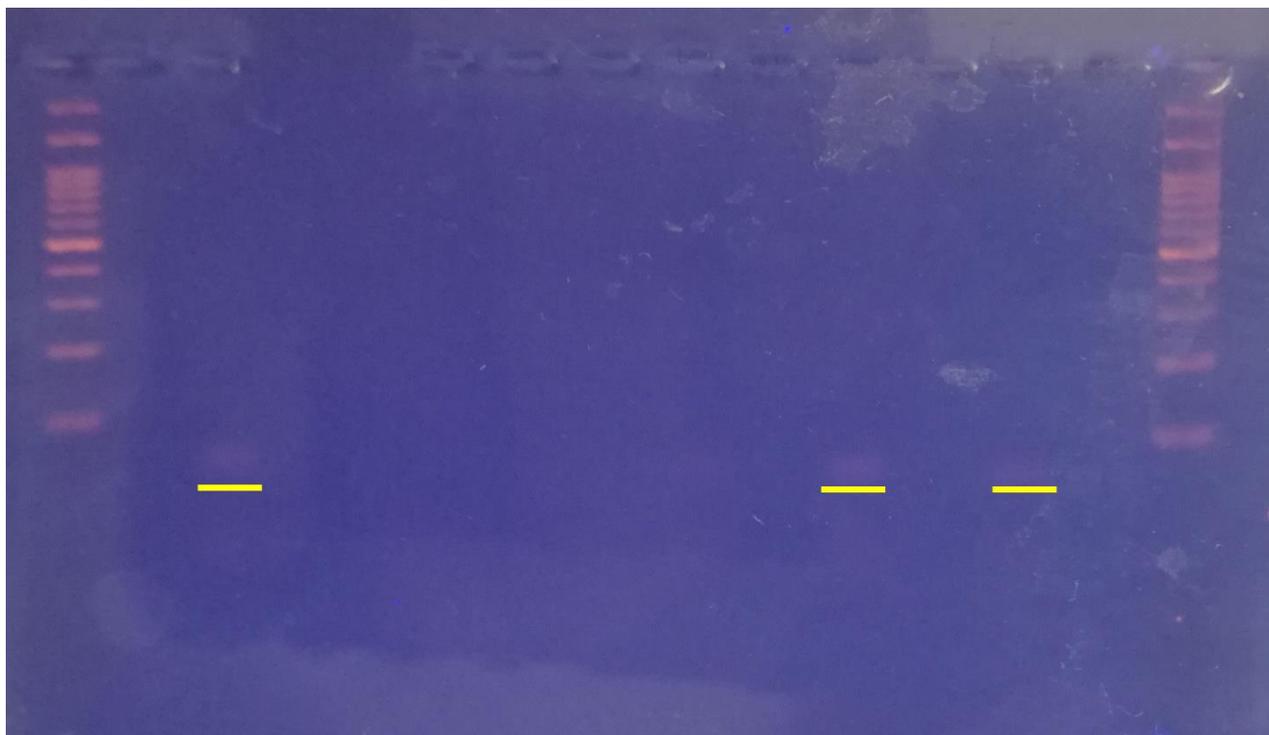


Figura 8: Bande di 90 bp su gel post-corsa elettroforetica, ottenute in seguito a clonaggio della porzione di 16s dell'rDNA di "Ca. Erwinia dacicola" in vettori di *E. coli*.

	<b>µl per pozzetto</b>
SYBR® Green (X2)	10
EdEnRev (10)	1
EdF1(10)	1
H <sub>2</sub> O	7
16S rDNA clonato	1
<b>Totale</b>	<b>20</b>

Tabella 5: composizione singolo pozzetto per analisi Real-Time qPCR della porzione 16S dell'rDNA clonato, in *E. coli* di "Ca. Erwinia dacicola".

nelle Real-Time qPCR: EdEnRev (Estes *et al.*, 2012a) e EdF1 (Estes *et al.*, 2009) che generano un amplicone di 90 paia di basi (pb = base pair, bp) (Estes *et al.*, 2012a). Per controllare se il clonaggio fosse andato a buon fine, è stata effettuata una corsa elettroforetica su gel di TBE 1x

(1%) ad 80 V a valle di un'amplificazione con PCR (Figura 8). Si è dunque effettuata la purificazione della banda del gel, ottenendo un'aliquota della porzione 16s

dell'rDNA di "Ca. Erwinia dacicola" clonato, amplificato e purificato che è stato posto nei pozzetti di una piastra per la Real-Time qPCR, in tre replicazioni, con l'aggiunta di SYBR® Green PCR Master Mix (© Applied Biosystems - Foster City, California, US), primer e acqua, (Tabella 5). La curva standard di calibrazione è stata ottenuta utilizzando diluizioni scalari della concentrazione del 16S rDNA clonato.

Tutte le Real-Time qPCR sono state completate su una StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) e prevedevano, nell'ordine: Hold stage (10:00 minuti a 95 °C), 40 cicli di PCR (15 secondi a 95 °C, poi 60 °C per 1 minuto ognuno), un Melt Curve stage ed il cooling finale.

### Elaborazione dei dati

Tutti i Cicli soglia (Threshold Cycle – CT) così ottenuti sono stati poi analizzati mediante la formula:

$$\text{numero di copie} = \frac{X_{ng} * 6,0221 * 10^{23} \text{ molecole/mole}}{(N * 660_{g/mole}) * 1 * 10^9_{ng/g}}$$

usando i CT rilevati con la curva standard per ottenere le quantità di 16s rDNA di “*Ca. Erwinia dacicola*” ancora presenti negli individui dopo i trattamenti subiti e, per estensione, i quantitativi effettivi di batterio. Come per i dati biologici, anche quelli molecolari sono stati sottoposti ad ANOVA e al test post-hoc di Student-Newman-Keuls.

## Composti Volatili

### Produzione composti

Le SWs utilizzate nelle prove sono state ottenute da 5 materiali di origine organica: cellulosa ottenuta da carta da filtro, segatura di legno di *Fagus sylvatica* L., *Zea mays* L. essiccato e tritato finemente, fieno di *Medicago sativa* L. e sansa di olive (Bonanomi *et al.*, 2021). Dalle sostanze di origine sono state ottenute 10 differenti SWs, conservate tal quale a cui si sono aggiunte due miscele, una ottenuta dalle due SWs derivanti da sansa, in parti uguali (Attr. MIX), e l'altra dalle restanti 8 (Rep. MIX). Tutte le sostanze sono state tenute a -20 °C fino al momento dell'utilizzo.

### Analisi quali-quantitative

Un pH-metro ed un conduttimetro (©CRISON, Barcellona, Spagna) sono stati utilizzati per misurare il pH e la conducibilità elettrica delle SWs, successivamente analizzate mediante cromatografia liquida-spettrometria di massa (liquid chromatography-mass spectrometry - LC-MS) (Bonanomi *et al.*, 2021) e gascromatografia-spettrometria di massa (gas chromatography-mass spectrometry - GC-MS), effettuata dal Prof Gavin Flematti della School of Molecular Sciences dell'University of Western Australia, in Crawley (Perth - WA).

Per una più completa analisi di tutte le SW, queste sono state fatte correre sia tal quali che, per evidenziare i composti non volatili, dopo una reazione con Tetrametil silano (TMS). I dati ottenuti sono stati successivamente analizzati mediante Cluster Analysis con distanza euclidea e metodo

Ward oltre ad un'analisi delle componenti principali (PCA) con standardizzazione (autoscaling) e decomposizione ai valori singolari (Singular Value Decomposition – SVD).

### Biosaggi topici

Per i biosaggi topici si sono utilizzati 1 e 0,5 µl delle miscele Rep. MIX e Att. MIX applicate sul torace di un *Mw* neosfarfallato. Gli individui così trattati, sono stati separati per sesso, divisi in gruppi di 15 e nutriti con acqua e saccarosio *ad libitum* e posti in condizioni ottimali di temperatura, umidità e fotoperiodo. Per i saggi di controllo si è proceduto con l'applicazione sul torace di gocce di 1 e 0,5 µl di acqua distillata. Per ogni saggio sono state completate 7 repliche biologiche.

### Biosaggi in Olfattometro

I saggi olfattometrici sono stati svolti utilizzando un olfattometro in vetro a Y. I flussimetri primari e secondari hanno garantito una presenza costante di aria pura che raggiungeva poi due grossi contenitori in vetro laterali, collegati ognuno ad un braccio dell'olfattometro a Y. In ognuno di questi contenitori, inoltre, era presente un bicchiere in vetro riempito con 500 ml d'acqua in cui finiva direttamente il flusso d'aria pura, ciò permetteva di mantenere costante il livello di umidità all'interno di queste due camere ermeticamente chiuse. Per le prove sono state utilizzate *Mw* neosfarfallate e le prove sono state svolte solo nelle ore del giorno per le quali è noto il bioritmo positivo della mosca (Bertolini *et al.*, 2018) in un ambiente condizionato ( $24 \pm 2$  °C;  $60 \pm 10\%$  UR). Ogni prova ha previsto un primo controllo per valutare la distribuzione delle decisioni degli insetti quando le camere laterali erano lasciate entrambe vuote ed un secondo con olive verdi fresche in solo una delle due. L'attrattività delle olive utilizzate nei saggi è stata accertata preliminarmente utilizzando l'olfattometro caricato con le sole olive. Con questa procedura è stato possibile quantificare in 12 drupe il quantitativo minimo di olive con almeno il 90% di scelta positiva. Tra le sostanze saggiate in olfattometro in questo triennio, una sola è di origine fungina, il 6-pentyl- $\alpha$ -pirone (6PP), estratto da *Trichoderma* spp., caratterizzato da un forte aroma di cocco e in commercio per usi alimentari. Le SWs sono state saggiate applicando una singola goccia di 5 µl su un quadrato 9 cm<sup>2</sup> di carta assorbente, inserito all'interno di una delle due camere laterali dell'olfattometro. I biosaggi in olfattometro sono stati effettuati offrendo le sostanze scelte in combinazione con 12 olive, per valutare se un eventuale effetto repellente riuscisse a superare quello attrattivo rappresentato dai frutti. L'impianto è stato sottoposto a flussi preliminari per 5 minuti per raggiungere il regime di efficienza. Un singolo individuo adulto è stato inserito nella Y, dal basso, e gli sono stati dati 5 minuti per scegliere e percorrere uno dei due bracci. In assenza di scelta la risposta è stata computata come "indecisione". Per limitare errori tecnici dovuti a sovraesposizioni o sottoesposizioni luminose non registrate o

variazioni di temperatura o interferenze residue con le altre prove precedenti, ad ogni prova, l'olfattometro è stato smontato e pulito, la posizione del tubo ad Y è stata capovolta e l'impianto è stato sottoposto ad un flusso di aria pura per 5 minuti. Tutte le sostanze e le combinazioni provate ed il numero complessivo di individui saggiati sono indicati nella Tabella 6. Quando sono state saggiate le due miscele Rep. MIX ed Att. MIX, si è reso necessario un tipo di controllo aggiuntivo, mai svolto per i saggi precedenti, in cui sono state offerte solo 12 olive fresche in entrambe le camere laterali dell'impianto.

## Elettroantennografia

L'elettroantennografia (EAG) è una tecnica elettrofisiologica che ha l'obiettivo di studiare le risposte olfattive degli insetti verso composti volatili. Tale tecnica si basa sulla misurazione della variazione, stimolo dipendente, del potenziale elettrico di membrana (voltage) subito dalle cellule nervose sensibili ad un determinato stimolo. Una risposta EAG, quindi, rappresenta la somma dei potenziali di depolarizzazione delle membrane dei neuroni olfattivi antennali indotta dallo stimolo saggiato (Boeckh *et al.*, 1965). Quanto maggiore risulta la depolarizzazione registrata, tanto maggiore sarà la sensibilità dell'antenna nei confronti della sostanza in esame e fino a raggiungere livelli di saturazione che può variare in funzione della natura, numero degli stimoli, nonché della temperatura, umidità, specie, sesso, e soprattutto dello stato fisiologico dell'insetto, per esempio se è vergine o accoppiato.

## Stimoli e saggi EAG

I saggi EAG sono stati svolti presso il Dipartimento di Scienze Agrarie, degli Alimenti e dell'Ambiente dell'Università di Foggia. Per tutte le 10 SWs, 5  $\mu$ l, 10  $\mu$ l e 15  $\mu$ l sono stati posti su un quadratino di 1 cm<sup>2</sup> di carta da filtro, poi introdotto in una pipetta Pasteur (lunghezza 15 cm), ed utilizzato per non più di 3 volte e, al termine di ogni prova, conservato a -20 °C. L'indagine EAG è stata condotta su maschi e femmine di OLF di 2 settimane di età (n = 10). L'insetto è stato inserito all'interno di un puntale, che aveva funzione di supporto. Il capo e l'antenna dell'insetto sono stati lasciati liberi mentre la restante parte del corpo è stata bloccata con pasta dentale al fine di ridurre al minimo i movimenti della mosca che avrebbero potuto interferire con l'analisi. L'antenna dell'insetto è stata posta all'estremità di un capillare di vetro con funzione di elettrodo differenziale e deputato alla registrazione del segnale. Un secondo capillare, l'elettrodo indifferente, è stato inserito nell'occhio dell'insetto a chiusura del circuito. Entrambi i capillari contenevano al loro interno una soluzione salina di Kaissling e un elettrodo di argento. Il segnale generato dall'antenna è stato inviato ad un amplificatore IDAC-4 (Syntech, Hilversum, Olanda) e visualizzato su un monitor utilizzando

Sostanze saggate	Codice	Concentrazione	N° individui	Ramo A	Ramo B
6-pentyl- $\alpha$ -pirone	6PP 10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-3</sup>	60♀ + 60♂	Aria pura	6PP 10 <sup>-3</sup> + olive
	6PP 10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	60♀ + 60♂	Aria pura	6PP 10 <sup>-2</sup> + olive
	6PP 10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-1</sup>	60♀ + 60♂	Aria pura	6PP 10 <sup>-1</sup> + olive
			60♀ + 60♂	Aria pura	6PP 10 <sup>-1</sup>
Smoke Water ottenuta da cellulosa a 300 °C	CELL 300	100%	30♀ + 30♂	Aria pura	CELL 300 100% + olive
		10%	30♀ + 30♂	Aria pura	CELL 300 10% + olive
Smoke Water ottenuta da cellulosa a 500 °C	CELL 500	100%	30♀ + 30♂	Aria pura	CELL 500 100% + olive
		10%	30♀ + 30♂	Aria pura	CELL 500 10% + olive
Smoke Water ottenuta da legno a 300 °C	WOOD 300	100%	30♀ + 30♂	Aria pura	WOOD 300 100% + olive
		10%	30♀ + 30♂	Aria pura	WOOD 300 10% + olive
Smoke Water ottenuta da legno a 500 °C	WOOD 500	100%	30♀ + 30♂	Aria pura	WOOD 500 100% + olive
		10%	30♀ + 30♂	Aria pura	WOOD 500 10% + olive
Smoke Water ottenuta da mais a 300 °C	MAIS 300	100%	30♀ + 30♂	Aria pura	MAIS 300 100% + olive
		10%	30♀ + 30♂	Aria pura	MAIS 300 10% + olive
Smoke Water ottenuta da mais a 500 °C	MAIS 500	100%	30♀ + 30♂	Aria pura	MAIS 500 100% + olive
		10%	30♀ + 30♂	Aria pura	MAIS 500 10% + olive
Smoke Water ottenuta da erba medica a 300 °C	$\alpha\alpha$ 300	100%	30♀ + 30♂	Aria pura	$\alpha\alpha$ 300 100% + olive
		10%	30♀ + 30♂	Aria pura	$\alpha\alpha$ 300 10% + olive
Smoke Water ottenuta da erba medica a 500 °C	$\alpha\alpha$ 500	100%	30♀ + 30♂	Aria pura	$\alpha\alpha$ 500 100% + olive
		10%	30♀ + 30♂	Aria pura	$\alpha\alpha$ 500 10% + olive
Smoke Water ottenuta da sansa a 300 °C	Olive Waste 300	100%	30♀ + 30♂	Aria pura	Olive Waste 300 100% + olive
		10%	30♀ + 30♂	Aria pura	Olive Waste 300 10% + olive
Smoke Water ottenuta da sansa a 500 °C	Olive Waste 500	100%	30♀ + 30♂	Aria pura	Olive Waste 500 100% + olive
		10%	30♀ + 30♂	Aria pura	Olive Waste 500 10% + olive
Miscela in parti uguali delle SWs ottenute da cellulosa, legno, mais e erba medica a 300 e 500 °C	Rep. MIX	100%	30♀ + 30♂	Aria pura	Rep. MIX 100% + olive
		10%	30♀ + 30♂	Aria pura	Rep. MIX 10% + olive
Miscela in parti uguali delle SWs ottenute da sansa a 300 e 500 °C	Att. MIX	100%	30♀ + 30♂	Aria pura	Att. MIX 100%
		10%	30♀ + 30♂	Aria pura	Att. MIX 10%
		100%	30♀ + 30♂	Aria pura	Att. MIX 100% + olive
		10%	30♀ + 30♂	Aria pura	Att. MIX 10% + olive
		100%	30♀ + 30♂	Olive	Att. MIX 100%
		10%	30♀ + 30♂	Olive	Att. MIX 10%
		100%	30♀ + 30♂	Olive	Att. MIX 100% + olive
		10%	30♀ + 30♂	Olive	Att. MIX 10% + olive

Tabella 6: Elenco dei trattamenti, loro codici indentificativi e concentrazioni.

il programma EAG PRO (Syntech, Hilversum, Olanda). Un flusso d'aria (500 ml/min) purificata ed umidificata è stato fatto fluire continuamente sull'antenna mediante un tubo di vetro di 8 mm  $\varnothing$  la cui estremità era posizionata ad 1 cm di distanza. L'estremità della pipetta contenente lo stimolo da saggiare è stata inserita in un foro di 4 mm  $\varnothing$  posto a 9 cm dall'uscita del tubo di vetro. La stimolazione dell'antenna è stata effettuata insufflando, in 0,5 secondi, 2,5 cm<sup>3</sup> del vapore presente nella pipetta. L'intervallo tra gli stimoli è stato di 1 min. All'inizio, alla fine e ogni tre composti saggiati, sono stati applicati uno stimolo di controllo costituita da olio minerale e filtro + acqua, per prendere in considerazione eventuali effetti del solvente e di rumori di fondo. Per correggere l'eventuale diminuzione di sensibilità dell'antenna durante l'esperimento è stato utilizzato uno stimolo di riferimento standard: 10  $\mu$ l di una soluzione 1  $\mu$ g/ $\mu$ l di Z3-esen-1-olo.

## Metodologie di Raccolta ed Elaborazione dei Dati

### Effetti sull'etologia

Per i dati relativi ai saggi topici sono stati computati, come dati qualitativi, le alterazioni comportamentali relativi alla capacità di movimento degli individui. Sono stati inoltre raccolti i dati relativi alla mortalità ogni ora per le prime 12, ogni 12 ore fino al termine del secondo giorno, quotidianamente fino al termine della prima settimana ed infine settimanalmente.

### Effetti sul comportamento in olfattometro

I dati relativi ad i saggi olfattometrici sono stati registrati secondo le tre risposte possibili: attrattività, repellenza ed indecisione. Tutti i dati raccolti sono stati poi analizzati con il test del  $\chi^2$  (p value= 0,05) in cui sono stati utilizzati i risultati ottenuti nei controlli positivi come valori attesi.

### Risposte sensoriali

La risposta EAG espressa in millivolt (mV) ad un determinato composto, è stata corretta, sottraendo il valore medio delle risposte al controllo precedente e successivo. I valori EAG corretti sono stati normalizzati in base alla risposta al primo stimolo, per tener conto della riduzione della sensibilità antennale durante l'esperimento. La formula per la normalizzazione è stata la seguente:

$$Sx (corr.) = \frac{Sx (registr.) * (Rif. (Is - 1) + Rif. (Is + 1))}{Rif. (x - 1) + Rif. (x + 1)}$$

$Sx (corr.)$  = risposta in mV allo stimolo  $x$  corretta per la diminuzione di sensibilità antennale durante l'esperimento;

$Sx (registr.)$  = risposta in mV allo stimolo  $x$  registrata durante l'esperimento;

Rif. (I s-1) = risposta in mV alla sostanza di riferimento che precede il primo stimolo;

Rif. (I s+1) = risposta in mV alla sostanza di riferimento che segue il primo stimolo;

Rif. (x-1) = risposta in mV alla sostanza di riferimento che precede lo stimolo  $x$ ;

Rif. (x+1) = risposta in mV alla sostanza di riferimento che segue lo stimolo  $x$ .

## Prove di Campo

### Organizzazione Prove di Campo

Le prove di campo sono state svolte nel 2019 e 2020 nell'azienda partner del progetto I.L.CO.A. di Luigi Lorenzano, situata poco fuori Crotone (KR), in Calabria (UTM: 681039 E; 4323690 N 33S) a 84 m sul livello del mare, con pendenza in direzione Ovest-Nord Ovest su impianto di 15 anni di *cv.* Frantoio. Il campo non presenta un profilo geometrico regolare e ricopre una collina seguendone le forme. L'areale è fortemente caratterizzato dalla produzione olivicola (Figura 9). Una seconda prova è stata allestita presso l'azienda Olio Carcillo, di Nicandro Carcillo, situata nel comune di Pozzilli (IS), in Molise (UTM: 424663 E; 4594475 N 33T) a 703 m sul livello del mare, su impianto di 30 anni di *cv.* Leccino. Il campo è di forma più rettangolare, orientato in direzione Nord-Sud, ed in piano (Figura 10).

I 2 oliveti sono stati divisi in cluster omogenei da 3 piante ognuno, simili per grandezza. Sulla chioma delle piante di ogni cluster sono state sospese 3 Falcon™ in disposizione casuale ma a distanza regolare, riempite con 15 ml della miscela da saggiare: Rep. MIX e Att. MIX non diluite. Le Falcon sono state chiuse con Parafilm® M sull'apertura della provetta, e opportunamente modificate, praticando un foro sul tappo di chiusura per minimizzare l'evaporazione delle miscele dalla Falcon™. Al centro di ogni cluster è stata posizionata una trappola cromotropica (*Dacus* Track plus – Serbios - Badia Polesine (RO), Italia). Per le prove con Rep. MIX le trappole sono state caricate con il feromone specifico e 15 gr di Bicarbonato di Ammonio (Farmalabor – Assago (MI), Italia). Le catture hanno consentito di monitorare i voli e la *sex ratio*. Le prove sono state svolte durante l'intero periodo di attività in campo dell'insetto, in presenza di drupe suscettibili di attacco: da agosto ad ottobre a Crotone e da agosto a novembre in Molise. I dati sono stati raccolti con cadenza mensile. Con l'ultimo monitoraggio si è effettuata una raccolta randomizzata di 30 olive dalle piante componenti i diversi cluster, per valutare l'infestazione sui frutti. Per le prove per i controlli negativi sono state irrorate 3 piante con una soluzione acquosa di Caolino (Surround WP -Novasource - Phoenix, Arizona, USA) preparata seguendo le indicazioni in etichetta. Il prodotto determina repellenza dovuta a interferenza tattile-visiva. Con l'Isopropyl-Miristato (PA ≥ 98% (Merck - Darmstadt, Germany), con attività di repellenza olfattiva (Rotundo *et al.*, 2001), la prova controllo è stata allestita sospendendo una Falcon utilizzando lo stesso metodo già descritto per le prove con i 2 MIX. Anche per i controlli sono state utilizzate le trappole chemio-cromotropiche gialle, caricate con feromone e Bicarbonato di Ammonio. Prove e controlli sono stati svolti con 3 replicazioni in entrambi i siti ed anni. L'organizzazione delle prove è schematizzata dalla Tabella 7.



Figura 9: disposizione cluster per prove, sul sito di Crotonone, per l'anno di prove 2020. CAO (●) = Caolino irrorato su chioma; MIRI (●) = Isopropyl-Myristato, 15 ml per dispenser; Att. MIX (●) = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da sansa a 300 e 500 °C, 15 ml per dispenser; Rep. MIX (●) = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da cellulose, legno, mais e erba medica a 300 e 500 °C, 15 ml per dispenser; YT + attr. (●) = Controllo (Yellow Trap), pannello con esche; YT (●) = Controllo (Yellow Trap), solo pannello non caricato; ✕ posizione trappole.



Figura 10: disposizione cluster per prove, sul sito di Pozzilli, per l'anno di prove 2020. CAO (●) = Caolino irrorato su chioma; MIRI (●) = Isopropyl-Myristato, 15 ml per dispenser; Att. MIX (●) = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da sansa a 300 e 500 °C, 15 ml per dispenser; Rep. MIX (●) = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da cellulose, legno, mais e erba medica a 300 e 500 °C, 15 ml per dispenser; YT + attr. (●) = Controllo (Yellow Trap), pannello con esche; YT (●) = Controllo (Yellow Trap), solo pannello non caricato; ✕ posizione trappole.

## Metodologie di Raccolta ed Elaborazione dei Dati

Sono stati monitorati i voli degli adulti delle generazioni estive ed autunnali, registrando il numero di individui maschi e femmine rinvenuti sui pannelli per ogni replica di ogni prova. Il dato di infestazione attiva, si è ottenuto con la dissezione delle drupe con presenza di punture della OLF. Durante il primo anno di prove, è stato rilevato il numero di stadi preimaginali che completavano con successo lo sviluppo e la loro successiva capacità riproduttiva. I dati relativi alla infestazione dei frutti, e quelli relativi alle catture totali e dei 2 sessi distinti, sono stati sottoposti ad ANOVA a una via e successivo test Post-Hoc di Student-Newman-Keuls. I dati meteorologici, ed in particolare quelli relativi a umidità e temperatura minima, media e massima nei due anni di prove e per entrambi i siti, si riferiscono a quelli pubblicati in [www.3bmeteo.com](http://www.3bmeteo.com).

Sito	Codice	Sostanze saggiate	Quantità	Pannello collato	Bicarbonato di ammonio	Feromone
KR	CAO	Caolino (Repellenza appurata)	Irrorato su chioma	Sì	Sì	Sì
	MIRI	Isopropyl-Myristato (Repellenza appurata)	15 ml per dispenser	Sì	Sì	Sì
	Rep. MIX	Miscela in parti uguali delle SW ottenute da cellulose, legno, mais e erba medica a 300 e 500 °C – Repellenza da saggiare	15 ml per dispenser	Sì	Sì	Sì
	Att. MIX	Miscela in parti uguali delle SW ottenute da sansa a 300 e 500 °C – Attrattività da saggiare	15 ml per dispenser	Sì	No	No
	YT	Controllo (Yellow Trap), solo pannello non caricato	//	Sì	No	No
	YT + attr.	Controllo (Yellow Trap), pannello con esche	//	Sì	Sì	Sì
IS	CAO	Caolino (Repellenza appurata)	Irrorato su chioma	Sì	Sì	Sì
	MIRI	Isopropyl-Myristato (Repellenza appurata)	15 ml per dispenser	Sì	Sì	Sì
	Rep. MIX	Miscela in parti uguali delle SW ottenute da cellulose, legno, mais e erba medica a 300 e 500 °C – Repellenza da saggiare	15 ml per dispenser	Sì	Sì	Sì
	Att. MIX	Miscela in parti uguali delle SW ottenute da sansa a 300 e 500 °C – Attrattività da saggiare	15 ml per dispenser	Sì	No	No
	YT	Controllo (Yellow Trap), solo pannello non caricato	//	Sì	No	No
	YT + attr.	Controllo (Yellow Trap), pannello con esche	//	Sì	Sì	Sì

Tabella 7: Prove di campo svolte nel biennio 2019-2020, codici identificativi per ogni prova e quantità utilizzate.

# Risultati

## Biosaggi di Ingestione

### Dati Biologici

#### *Mortalità e Consumo di dieta:*

Il numero di individui dei 2 sessi sopravvissuti al 14<sup>mo</sup> giorno di trattamento, ha indicato una maggiore sensibilità delle femmine alla somministrazione di diete contenenti le sostanze saggiate (dati non mostrati).

I trattamenti con 6PP e Cu hanno mostrato un significativo incremento della mortalità con 6PP-2, Cu-5 e Cu-1 con valori uguali se non maggiori rispetto al controllo positivo ANT. Un risultato simile è stato ottenuto con dieta addizionata con TRI-1, mentre il trattamento TRI-5 ha causato la mortalità media più elevata (89,17%), quasi il doppio rispetto ad controllo positivo (ANT - 54,71%). Il fenomeno va ascritto ad una mortalità da inedia con un bassissimo consumo della dieta stessa. La dieta addizionata con la concentrazione maggiore di MET ha causato mortalità prossime al 70%.

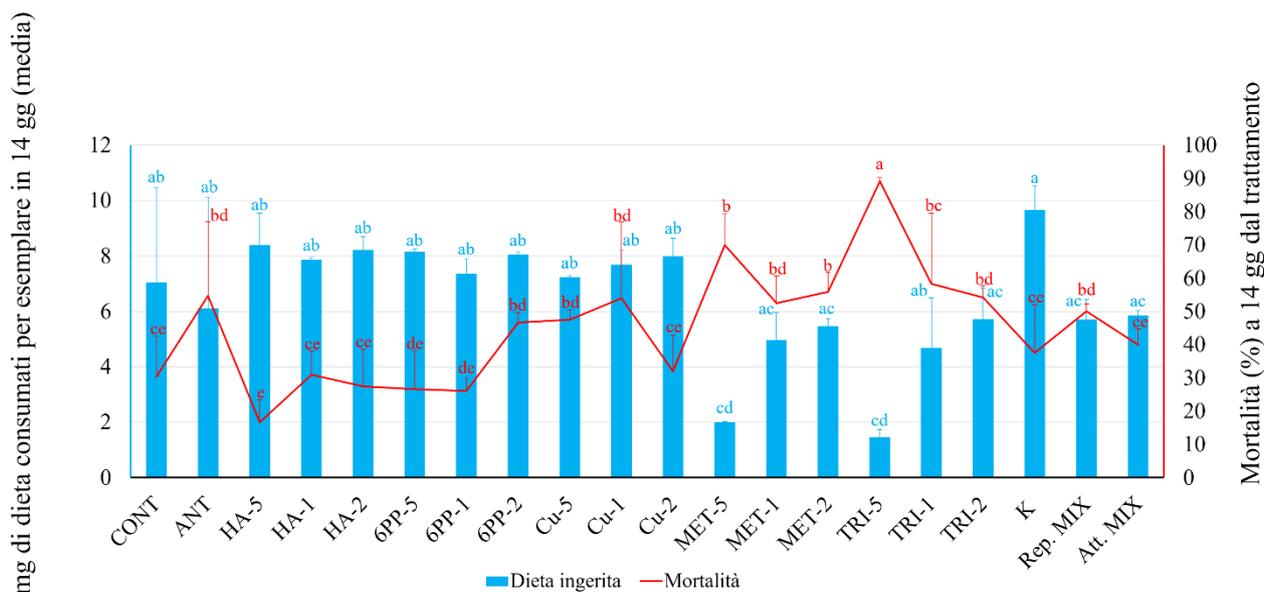


Grafico 1: Asse Y1 (●)= Consumo di dieta medio per individuo (mg/esemplare) registrato dopo 14 giorni di trattamento. Asse Y2 (●)= Mortalità % registrata dopo 14 giorni di trattamento. CONT = Controllo; ANT = Controllo negativo; HA-5 = Acido Harzianico 0,5%; HA-1 = Acido Harzianico 0,1%; HA-2 = Acido Harzianico 0,02%; 6PP-5 = 6-pentyl- $\alpha$ -pirone 0,5%; 6PP-1 = 6-pentyl- $\alpha$ -pirone 0,1%; 6PP-2 = 6-pentyl- $\alpha$ -pirone 0,02%; Cu-5 = Ossicloruro di Rame 0,5%; Cu-1 = Ossicloruro di Rame 0,1%; Cu-2 = Ossicloruro di Rame 0,02%; MET-5 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Coniothyrium aleurites* 0,5%; MET-1 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Coniothyrium aleurites* 0,1%; MET-2 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Coniothyrium aleurites* 0,02%; TRI-5 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Trichoderma saturnisporum* 0,5%; TRI-1 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Trichoderma saturnisporum* 0,1%; TRI-2 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Trichoderma saturnisporum* 0,02%; K = Karrikinolide 0,0001%; Rep. MIX = 150  $\mu$ l di miscela di Acque Affumicate ottenute da cellulosa, legno, mais ed erba medica, a 300 e 500 °C; Att. MIX = 150  $\mu$ l di miscela di Acque Affumicate ottenute da sansa di olive a 300 e 500 °C. Trattamenti con le stesse lettere non mostrano differenze significative (Test ANOVA, Post-hoc di Student-Newman-Keuls.).

Infine, la mortalità media più bassa (16,7%) si è ottenuta con diete addizionate con HA-5 che sembra avere avuto un effetto benefico per la popolazione oggetto di studio, mentre le due diluizioni inferiori non hanno evidenziato risultati significativi (Grafico 1).

Non risultano differenze significative importanti per il consumo di dieta medio registrato dopo 14 giorni di trattamento (Grafico 1) tranne nel caso di MET-5 e TRI-5. Con la dieta addizionata con Karrikinolide (K) si è registrato un consumo medio maggiore rispetto ai controlli.

#### Ovideposizioni:

I trattamenti hanno evidenziato un numero complessivo di ferite di ovideposizione maggiore nella prima esposizione rispetto alla seconda (dati non mostrati). Si evidenziano differenze sia per tipo di trattamento sia per la diluizione impiegata (Grafico 2).

In tutti i trattamenti si rileva una corrispondenza diretta tra il numero totale di ferite di ovideposizione senza uova e quelle in cui erano presenti le uova di *B. oleae*.

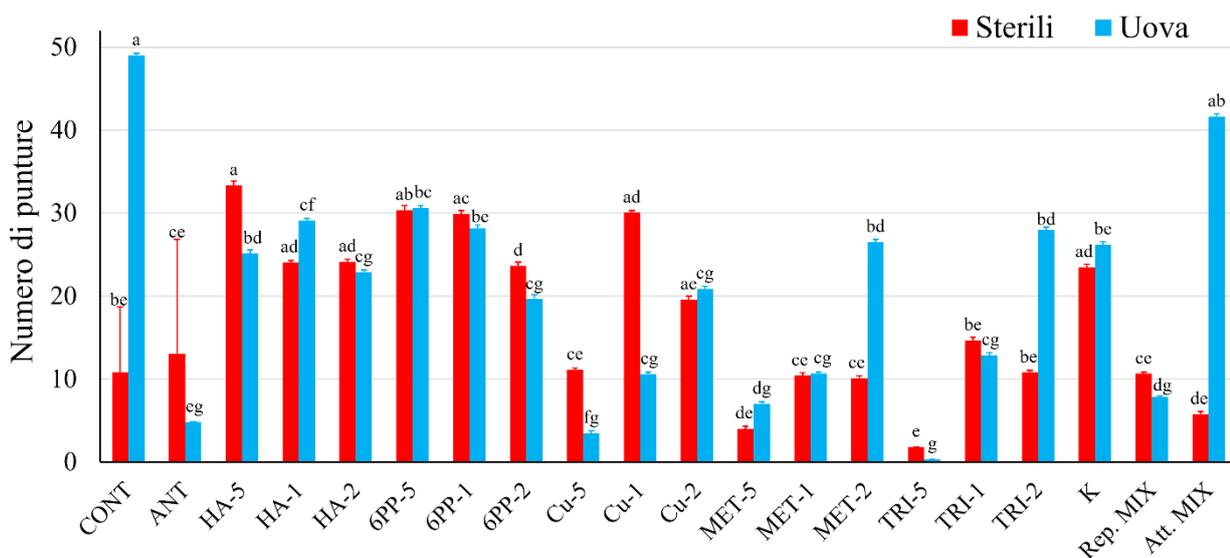


Grafico 2: Numero di punture di ovideposizione di *B. oleae* rinvenute a seguito dei biosaggi di ingestione: i) Sterili (●), senza ovideposizione; ii) Uova (●), con ovideposizione. CONT = Controllo; ANT = Controllo negativo; HA-5 = Acido Harzianico 0,5%; HA-1 = Acido Harzianico 0,1%; HA-2 = Acido Harzianico 0,02%; 6PP-5 = 6-pentyl- $\alpha$ -pirone 0,5%; 6PP-1 = 6-pentyl- $\alpha$ -pirone 0,1%; 6PP-2 = 6-pentyl- $\alpha$ -pirone 0,02%; Cu-5 = Ossicloruro di Rame 0,5%; Cu-1 = Ossicloruro di Rame 0,1%; Cu-2 = Ossicloruro di Rame 0,02%; MET-5 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Coniothyrium aleurites* 0,5%; MET-1 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Coniothyrium aleurites* 0,1%; MET-2 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Coniothyrium aleurites* 0,02%; TRI-5 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Trichoderma saturnisporum* 0,5%; TRI-1 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Trichoderma saturnisporum* 0,1%; TRI-2 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Trichoderma saturnisporum* 0,02%; K = Karrikinolide 0,0001%; Rep. MIX = 150  $\mu$ l di miscela di Acque Affumicate ottenute da cellulosa, legno, mais ed erba medica, a 300 e 500 °C; Att. MIX = 150  $\mu$ l di miscela di Acque Affumicate ottenute da sansa di olive a 300 e 500 °C. Trattamenti con le stesse lettere non mostrano differenze significative (Test ANOVA, Post-hoc di Student-Newman-Keuls all'interno dei gruppi).

L'attività riproduttiva di OLF è stata fortemente influenzata dal consumo di dieta con MET-5, Cu-5 e Rep. MIX (Grafico 2), paragonabile ai dati rilevati con il controllo positivo ANT. L'analisi

statistica che ha evidenziato i risultati più stabili nell'intervallo sperimentale temporale. Il numero di punture sterili più alto rispetto a tutti gli altri trattamenti è stato ottenuto con dieta addizionata con HA-5. Il numero complessivo di ferite di ovideposizione, in questo caso, non è significativamente diverso da quello ottenuto con il controllo CONT e 6PP-5. Con Att. MIX le quantità di punture sterili sono paragonabili al trattamento con ANT. Il numero di punture sterili minore è stato ottenuto con la dieta addizionata con TRI a diluizione minore, a fronte dell'abbassamento drastico di punture totali.

#### *Mortalità allo stadio di pupa:*

Il numero di individui che non hanno completato lo sviluppo preimaginale, morendo in fase di pupa, ed il numero di adulti sfarfallati è risultato variabile tra i trattamenti. In particolare, TRI-2 ha maggiormente determinato l'arresto dello sviluppo preimaginale allo stadio di pupa rispetto agli altri trattamenti (5,9 individui). Nelle prove con Att. MIX si rileva un dato statisticamente simile a quello ottenuto nelle prove CONT (3). In Rep. MIX, in tutti i biosaggi TRI, e K, MET-5 e -1, Cu-1, 6PP-5, HA-5 e HA-1, il numero medio di individui che non riescono a superare lo stadio di pupa è stato sempre superiore a quanti ci riescono, seppure con numeri limitati.

Le poche uova deposte da OLF a seguito delle somministrazioni di diete addizionate con Cu-5 e ANT non si sono schiuse. Gli altri trattamenti con rame hanno avuto ripercussioni sulla F1 con circa la metà degli individui complessivi osservati che non ha raggiunto l'età adulta.

Gli individui trattati con TRI-5 mostravano scarsa frequenza di accoppiamento e deposizione e spesso morte prematura, ciò ha prodotto una quasi completa assenza di una seconda generazione facendo rilevare solo pupari. Il numero medio ponderato di pupari e di adulti sfarfallati nelle prove CONT è significativamente maggiore di quanto registrato in tutte le altre prove.

#### *Sex ratio:*

La *sex ratio*, calcolata sulle medie ponderate in base alle olive esposte, rivela una preponderanza di femmine adulte sfarfallate in quasi tutte le prove, particolarmente apprezzabile a seguito del trattamento 6PP-1 (Tabella 8). Nelle due prove con maggior numero di ferite di ovideposizione sulle drupe, si rileva una differente *sex ratio*: 1,09:1 nella prova CONT e 0,85:1 in quella Att. MIX, entrambi arrotondati a 1:1 in Tabella 8. Con Rep. MIX il rapporto tra femmine e maschi sfarfallati è 1:1, ma con un numero di adulti neosfarfallati molto basso.

#### *Adulti neosfarfallati:*

Differenze significative si sono rilevate nelle prove con somministrazione di dieta addizionata con Att. MIX, con adulti sfarfallati in media di 23,2 (Grafico 3, Tabella 8 e Tabella 9).

La concentrazione minore di TRI ha dato luogo ad un numero di adulti sfarfallati inferiore ai pupari (2,8), dovuto alla elevata mortalità. K ha determinato risultati simili a Cu-2 e tutti i trattamenti con HA e 6PP hanno fatto registrare risposte simili tra loro.

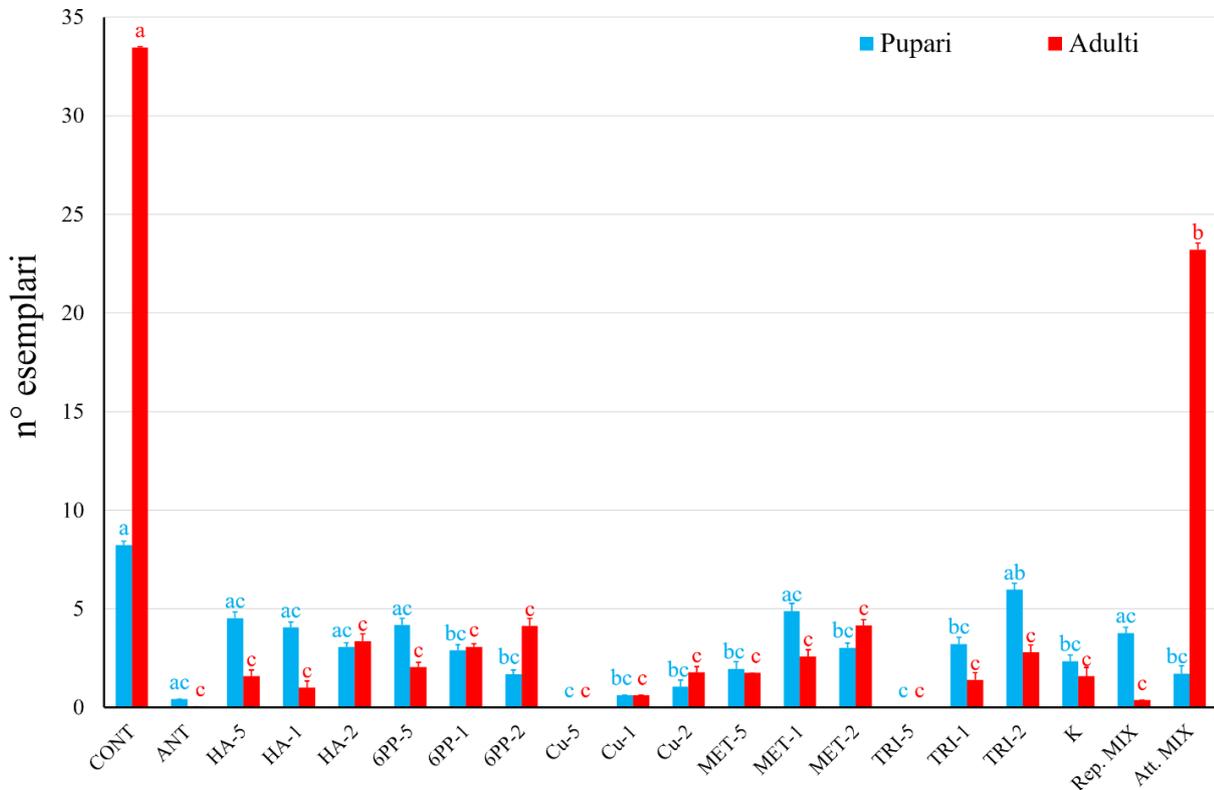


Grafico 3: Numero di esemplari rinvenuti nell’F1 di *B. oleae* a seguito dei biosaggi di ingestione: i) Adulti (●), adulti sfarfallati; ii) Pupari (●), individui morti allo stadio di pupa. CONT = Controllo; ANT = Controllo negativo; HA-5 = Acido Harzianico 0,5%; HA-1 = Acido Harzianico 0,1%; HA-2 = Acido Harzianico 0,02%; 6PP-5 = 6-pentyl- $\alpha$ -pirone 0,5%; 6PP-1 = 6-pentyl- $\alpha$ -pirone 0,1%; 6PP-2 = 6-pentyl- $\alpha$ -pirone 0,02%; Cu-5 = Ossicloruro di Rame 0,5%; Cu-1 = Ossicloruro di Rame 0,1%; Cu-2 = Ossicloruro di Rame 0,02%; MET-5 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Coniothyrium aleurites* 0,5%; MET-1 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Coniothyrium aleurites* 0,1%; MET-2 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Coniothyrium aleurites* 0,02%; TRI-5 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Trichoderma saturnisporum* 0,5%; TRI-1 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Trichoderma saturnisporum* 0,1%; TRI-2 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Trichoderma saturnisporum* 0,02%; K = Karrikinolide 0,0001%; Rep. MIX = 150  $\mu$ l di miscela di Acque Affumicate ottenute da cellulosa, legno, mais ed erba medica, a 300 e 500 °C ; Att. MIX = 150  $\mu$ l di miscela di Acque Affumicate ottenute da sansa di olive a 300 e 500 °C. Trattamenti con le stesse lettere non mostrano differenze significative (Test ANOVA, Post-hoc di Student-Newman-Keuls all’interno dei gruppi).

Sex Ratio ♀:♂			
CONT	1:1	ANT	-
HA-5	1:0	MET-5	1:1
HA-1	1:0	MET-1	1:1
HA-2	2:1	MET-2	1:1
6PP-5	1:1	TRI-5	-
6PP-1	3:1	TRI-1	1:1
6PP-2	3:2	TRI-2	1:2
Cu-5	-	K	1:1
Cu-1	-	Rep. MIX	1:1
Cu-2	1:1	Att. MIX	1:1

Tabella 8: Rapporto femmina (♀):maschio (♂) tra gli adulti dell’F1 di *B. oleae* sfarfallati a seguito delle prove di ingestione. CONT = Controllo; ANT = Controllo negativo; HA-5 = Acido Harzianico 0,5%; HA-1 = Acido Harzianico 0,1%; HA-2 = Acido Harzianico 0,02%; 6PP-5 = 6-pentyl- $\alpha$ -pirone 0,5%; 6PP-1 = 6-pentyl- $\alpha$ -pirone 0,1%; 6PP-2 = 6-pentyl- $\alpha$ -pirone 0,02%; Cu-5 = Ossicloruro di Rame 0,5%; Cu-1 = Ossicloruro di Rame 0,1%; Cu-2 = Ossicloruro di Rame 0,02%; MET-5 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Coniothyrium aleurites* 0,5%; MET-1 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Coniothyrium aleurites* 0,1%; MET-2 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Coniothyrium aleurites* 0,02%; TRI-5 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Trichoderma saturnisporum* 0,5%; TRI-1 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Trichoderma saturnisporum* 0,1%; TRI-2 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Trichoderma saturnisporum* 0,02%; K = Karrikinolide 0,0001%; Rep. MIX = 150  $\mu$ l di miscela di Acque Affumicate ottenute da cellulosa, legno, mais ed erba medica, a 300 e 500 °C ; Att. MIX = 150  $\mu$ l di miscela di Acque Affumicate ottenute da sansa di olive a 300 e 500 °C.

	Replica	Esposizione	Trattamenti																						
			CONT	ANT	HA-5	HA-1	HA-2	6PP-5	6PP-1	6PP-2	Cu-5	Cu-1	Cu-2	MET-5	MET-1	MET-2	TRI-5	TRI-1	TRI-2	K	Rep. MIX	Att. MIX			
n° olive	1	1	5	5	4	2	4	3	3	4	4	4	3	2	5	5	3	5	5	0	4	3	2	3	5
		2	5	5	4	2	4	1	3	4	3	3	2	2	5	5	3	5	5	0	4	3	2	3	5
	2	1	5	5	2	3	6	6	5	5	4	5	3	6	2	2	5	4	1	4	4	4	4	4	4
		2	5	5	2	3	5	5	3	5	3	3	2	4	2	2	5	4	1	4	4	4	4	4	4
	3	1	6	6	3	3	6	3	4	6	5	4	3	2	4	3	4	2	1	5	4	6	6	4	4
		2	6	6	3	3	5	3	2	5	5	4	3	2	4	3	4	2	1	5	4	5	6	4	4
	4	1	7	5	8	3	7	6	8	7	8	4	7	7	7	2	5	4	2	5	4	4	4	3	5
		2	6	5	8	3	6	6	5	7	6	3	7	7	7	2	5	4	2	5	4	4	4	3	5
Pupari	1	1	14	2	0	0	1	0	1	0	2	1	0	0	0	1	0	2	0	4	0	0	2	1	1
		2	14	1	0	0	5	2	2	12	2	0	0	0	0	0	0	1	0	3	1	0	0	0	1
	2	1	12	1	0	0	2	3	0	3	1	1	0	1	2	0	5	2	0	2	5	0	3	2	2
		2	12	3	0	0	1	3	2	0	0	2	0	0	2	0	6	8	0	0	10	6	7	1	1
	3	1	10	2	0	2	8	0	2	6	7	7	0	0	1	3	2	0	0	1	2	3	3	2	2
		2	15	1	0	3	3	9	0	5	3	2	0	0	3	5	7	0	0	3	6	3	6	3	3
	4	1	18	1	0	1	7	6	6	4	3	0	0	1	1	6	6	4	0	7	9	2	4	2	2
		2	18	3	0	2	7	6	6	4	3	0	0	1	1	3	9	5	0	5	12	2	3	2	2
♂	1	1	16	16	0	0	1	1	1	3	1	1	0	0	1	4	0	1	0	1	5	0	2	8	8
		2	16	16	0	0	1	1	1	2	3	4	0	0	2	0	0	2	0	1	4	0	0	7	7
	2	1	12	16	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	2	3	0	0	2	1	0	10	10	10
		2	15	15	0	0	1	1	4	0	0	1	0	0	1	0	3	3	0	1	1	1	0	9	9
	3	1	16	18	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0	0	0	2	1	0	1	0	1	0	15	15
		2	16	16	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	15	15
	4	1	16	18	0	0	0	0	1	1	0	2	0	1	1	0	4	0	1	1	0	0	18	18	18
		2	14	19	0	0	0	0	2	0	0	3	0	0	0	0	1	2	0	0	1	1	0	18	18
♀	1	1	20	18	0	0	1	0	0	3	1	1	0	1	1	4	0	2	0	1	2	0	1	7	7
		2	14	20	0	0	2	1	1	3	5	3	0	0	4	0	0	2	0	1	1	2	0	7	7
	2	1	16	18	0	0	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	1	9
		2	20	18	0	0	1	1	4	1	1	2	0	1	1	1	1	2	0	0	1	1	0	8	8
	3	1	10	20	0	0	3	2	2	0	1	3	0	0	0	0	1	2	0	1	0	1	0	13	13
		2	18	17	0	0	1	0	3	3	8	7	0	0	1	0	3	1	0	0	1	1	0	10	10
	4	1	18	19	0	0	1	0	2	1	4	2	0	1	1	0	2	3	0	1	2	1	0	15	15
		2	14	22	0	0	0	1	2	0	0	3	0	0	0	0	3	1	0	1	2	1	1	16	16
♂+♀	1	1	36	34	0	0	1	1	1	6	2	2	0	1	2	8	0	3	0	2	7	0	3	15	
		2	30	36	0	0	3	2	2	5	8	7	0	0	6	0	0	4	0	2	5	2	0	14	
	2	1	28	34	0	0	2	1	2	1	0	0	0	0	1	0	2	5	0	0	3	2	0	19	
		2	35	33	0	0	2	2	8	1	1	3	0	1	2	1	4	5	0	1	2	2	0	17	
	3	1	26	38	0	0	3	2	4	0	1	5	0	0	0	0	3	3	0	2	0	2	0	28	
		2	34	33	0	1	1	0	4	4	9	8	0	0	1	0	4	2	0	1	1	1	0	25	
	4	1	34	37	0	0	1	0	3	2	4	4	0	2	2	0	2	7	0	2	3	1	0	33	
		2	28	41	0	0	0	1	4	0	0	6	0	0	0	0	4	3	0	1	3	2	1	34	
Totali	1	1	50	0	0	2	1	2	6	4	3	0	1	2	9	0	5	0	6	7	0	5	16		
		2	44	0	0	8	4	4	17	10	7	0	0	6	0	0	5	0	5	6	2	0	15		
	2	1	40	0	0	4	4	2	4	1	1	0	1	3	0	7	7	0	2	8	2	3	21		
		2	47	0	0	3	5	10	1	1	5	0	1	4	1	10	13	0	1	12	8	7	18		
	3	1	36	0	0	11	2	6	6	8	12	0	0	1	3	5	3	0	3	2	5	3	30		
		2	49	0	0	4	9	4	9	12	10	0	0	4	5	11	2	0	4	7	4	6	28		
	4	1	52	0	0	8	6	9	6	7	4	0	3	3	6	8	11	0	9	12	3	4	35		
		2	46	0	0	7	7	10	4	3	6	0	1	1	3	13	8	0	6	15	4	4	36		
	5	1	36	0	0																				
		2	37	0	0																				
	6	1	35	0	0																				
		2	36	0	0																				
	7	1	40	2	0																				
		2	34	4	0																				
	8	1	38	1	0																				
		2	44	2	0																				

Tabella 9: Numero di olive, numero di individui che hanno raggiunto l'età adulta maschi (♂) e femmine (♀) e che sono morti allo stadio preimaginale (Pupari) e valori totali, per ogni trattamento ed esposizione. Repliche: ● prima, ● seconda, ● terza, ● quarta, ● quinta, ● sesta, ● settima ed ● ottava. CONT = Controllo; ANT = Controllo negativo; HA-5 = Acido Harzianico 0,5%; HA-1 = Acido Harzianico 0,1%; HA-2 = Acido Harzianico 0,02%; 6PP-5 = 6-pentyl- $\alpha$ -pirone 0,5%; 6PP-1 = 6-pentyl- $\alpha$ -pirone 0,1%; 6PP-2 = 6-pentyl- $\alpha$ -pirone 0,02%; Cu-5 = Ossicloruro di Rame 0,5%; Cu-1 = Ossicloruro di Rame 0,1%; Cu-2 = Ossicloruro di Rame 0,02%; MET-5 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Coniothyrium aleurites* 0,5%; MET-1 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Coniothyrium aleurites* 0,1%; MET-2 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Coniothyrium aleurites* 0,02%; TRI-5 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Trichoderma saturnisporum* 0,5%; TRI-1 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Trichoderma saturnisporum* 0,1%; TRI-2 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Trichoderma saturnisporum* 0,02%; K = Karrikinolide 0,0001%; Rep. MIX = 150  $\mu$ l di miscela di Acque Affumicate ottenute da cellulosa, legno, mais ed erba medica, a 300 e 500 °C ; Att. MIX = 150  $\mu$ l di miscela di Acque Affumicate ottenute da sansa di olive a 300 e 500 °C.

## Dati Molecolari

### *Effetti dei trattamenti sul simbiote nei bulbi esofagei (BE)*

Il trattamento MET-1 ha aumentato la carica di “*Ca. Erwinia dacicola*”, mentre MET-2 ne ha limitato la proliferazione. TRI-1 ha fortemente abbattuto la carica, anche più che TRI-5, mentre il trattamento più diluito TRI ha portato a livelli di presenza del simbiote elevati, ma non tanto quanto MET-1. L’utilizzo di Karrikinolide e della miscela Rep. MIX ha molto limitato il microrganismo, quasi quanto Cu-2, ma non quanto ANT. L’Ossicloruro di Rame ha abbattuto la carica batterica, ma con il trattamento Cu-1 si è ottenuto un incremento alla proliferazione maggiore che in tutti gli altri trattamenti del gruppo, anche maggiore che nel controllo. Pur rimanendo in quantità molto limitate, la presenza di “*Ca. Erwinia dacicola*” riscontrata nei BE è concentrazione-dipendente, in modo inverso per i trattamenti con HA e 6PP. La soluzione più concentrata ha portato ad un abbassamento (HA-5) della proliferazione rispetto al controllo che si è attestato intorno alle 1200 copie, analogamente a quanto ottenuto con 6PP-5. All’aumentare della diluizione, invece, il quantitativo registrato è stato sempre maggiore, fino a superare il controllo con 6PP-2. Att. MIX ha causato un aumento del numero di copie medie (1801) (Grafico 4).

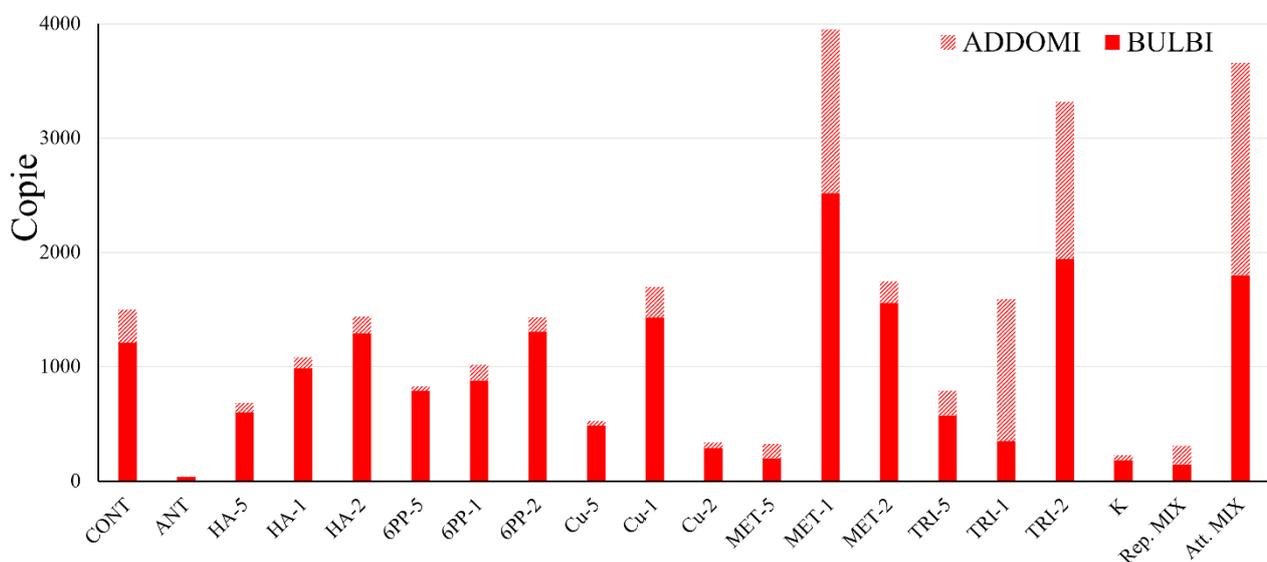


Grafico 4: Numero di copie di “*Ca. Erwinia dacicola*” rinvenute mediante Real-Time qPCR nei bulbi esofagei (BULBI, ●) e negli intestini (ADDOMI, ◐) di *B. oleae* a seguito dei biosaggi di ingestione. CONT = Controllo; ANT = Controllo negativo; HA-5 = Acido Harzianico 0,5%; HA-1 = Acido Harzianico 0,1%; HA-2 = Acido Harzianico 0,02%; 6PP-5 = 6-pentyl- $\alpha$ -pirone 0,5%; 6PP-1 = 6-pentyl- $\alpha$ -pirone 0,1%; 6PP-2 = 6-pentyl- $\alpha$ -pirone 0,02%; Cu-5 = Ossicloruro di Rame 0,5%; Cu-1 = Ossicloruro di Rame 0,1%; Cu-2 = Ossicloruro di Rame 0,02%; MET-5 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Coniothyrium aleurites* 0,5%; MET-1 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Coniothyrium aleurites* 0,1%; MET-2 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Coniothyrium aleurites* 0,02%; TRI-5 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Trichoderma saturnisporum* 0,5%; TRI-1 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Trichoderma saturnisporum* 0,1%; TRI-2 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Trichoderma saturnisporum* 0,02%; K = Karrikinolide 0,0001%; Rep. MIX = 150  $\mu$ l di miscela di Acque Affumicate ottenute da cellulosa, legno, mais ed erba medica, a 300 e 500 °C ; Att. MIX = 150  $\mu$ l di miscela di Acque Affumicate ottenute da sansa di olive a 300 e 500 °C.

### Effetti dei trattamenti sul simbionte negli Intestini (ADs)

La presenza di “*Ca. Erwinia dacicola*” riscontrata negli ADs segue la stessa variabilità registrata nei BE, complessivamente si registra una presenza molto più limitata nella zona addominale di *B. oleae* rispetto all’area designata ad accoglierlo (Tabella 10). Il trattamento K ha portato ad un abbassamento del numero di copie (45,96 in media), con valori simili a quelli ottenuti con Cu-5 (38,8), Cu-2 (50,7) e 6PP-5 (40,13). La proliferazione batterica è stata invece molto spinta con il trattamento Att. MIX (1860 molecole in media) e con MET-1, TRI-2 e TRI-1. In Rep. MIX si registrano 160 copie, un valore intermedio tra MET-5 e MET-2, ma comunque più elevato di quanto ottenuto con K, Cu-5, Cu-2, 6PP ed HA. Le diluizioni minori di HA e 6PP hanno portato ad un’importante presenza di batterio.

	COPIE	
	Bulbi	Addomi
CONT	1211,690	0,020
ANT	36,901	0,000
HA-5	600,497	0,006
HA-1	987,306	0,007
HA-2	1291,242	0,010
6PP-5	789,731	0,003
6PP-1	878,297	0,009
6PP-2	1306,116	0,009
Cu-5	488,255	0,003
Cu-1	1429,081	0,019
Cu-2	286,406	0,003
MET-5	200,064	0,009
MET-1	2518,977	0,098
MET-2	1557,483	0,013
TRI-5	573,970	0,015
TRI-1	349,887	0,085
TRI-2	1941,682	0,094
K	180,812	0,003
Rep. MIX	146,804	0,011
Att. MIX	1801,014	0,127

Tabella 10: Quantitativo di copie di “*Ca. Erwinia dacicola*” nei bulbi esofagei (BULBI, ●) e negli intestini (ADDOMI, ●) di *B. oleae* dopo i biosaggi di ingestione, rilevate mediante Real-Time qPCR. CONT = Controllo; ANT = Controllo negativo; HA-5 = Acido Harzianico 0,5%; HA-1 = Acido Harzianico 0,1%; HA-2 = Acido Harzianico 0,02%; 6PP-5 = 6-pentyl- $\alpha$ -pirone 0,5%; 6PP-1 = 6-pentyl- $\alpha$ -pirone 0,1%; 6PP-2 = 6-pentyl- $\alpha$ -pirone 0,02%; Cu-5 = Ossicloruro di Rame 0,5%; Cu-1 = Ossicloruro di Rame 0,1%; Cu-2 = Ossicloruro di Rame 0,02%; MET-5 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Coniothyrium aleurites* 0,5%; MET-1 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Coniothyrium aleurites* 0,1%; MET-2 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Coniothyrium aleurites* 0,02%; TRI-5 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Trichoderma saturnisporum* 0,5%; TRI-1 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Trichoderma saturnisporum* 0,1%; TRI-2 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Trichoderma saturnisporum* 0,02%; K = Karrikinolide 0,0001%; Rep. MIX = 150  $\mu$ l di miscela di Acque Affumicate ottenute da cellulosa, legno, mais ed erba medica, a 300 e 500 °C ; Att. MIX = 150  $\mu$ l di miscela di Acque Affumicate ottenute da sansa di olive a 300 e 500 °C.

Benché anche graficamente (Grafico 4), si noti una differenza nei risultati medi ottenuti con i vari trattamenti saggianti, questa non viene registrata dai test statistici parametrici né tantomeno da quelli non parametrici. Sulla base di questa apparente anomalia, già registrata in precedenti prove preliminari, si è quindi proceduto alla valutazione della presenza di “*Ca. Erwinia dacicola*” nei BE di esemplari di OLF selvatici lungo l’intero periodo di attività.

## Variabilità stagionale

Il quantitativo di simbionte individuato negli adulti neosfarfallati di OLF raccolti presso il Parco Gussone in Portici (NA) è stato simile per gli stessi periodi dei due anni di analisi. Per entrambi gli anni, in agosto si è registrato il quantitativo massimo, mentre a settembre il minimo. Le rilevazioni climatiche mostrano che il 2019 è risultato più caldo e meno umido dell'anno precedente. La temperatura e l'umidità relativa registrate sono risultate diverse nel mese di agosto e dicembre e, in entrambi i casi, si sono evidenziate differenze di carica batterica (Grafico 5).

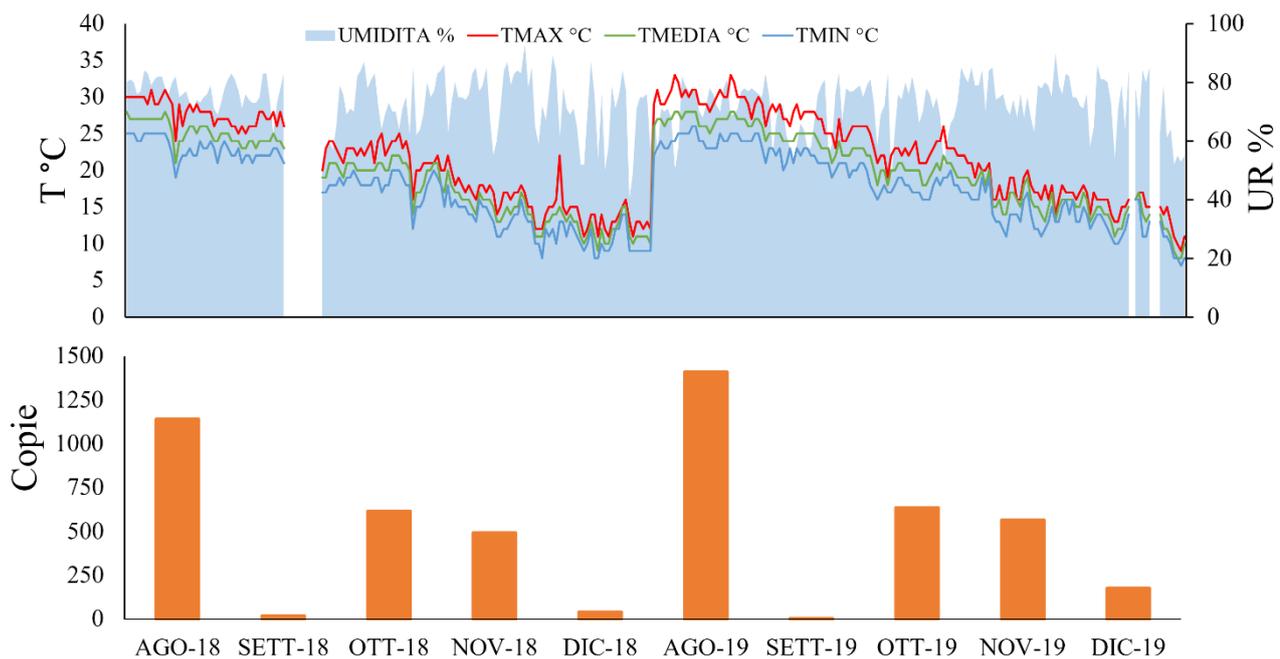


Grafico 5: Grafico in alto: Temperature massime (● = TMAX °C), medie (● = TMED °C) e minime (● = TMIN °C) ed Umidità (● = UMIDITÀ %) registrate tra agosto (AGO) e dicembre (DIC) nel biennio 2018-2019 a Portici (NA). Grafico in basso: quantitativo di "Ca. Erwinia dacicola" in bulbi esofagei di adulti selvatici di *B. oleae* neosfarfallati da agosto (AGO) a dicembre (DIC), nel biennio 2018-2019 a Portici (NA).

## Composti Volatili

### Biosaggi Topici

A seguito dell'applicazione topica di SW, non è stata riscontrata nessuna variazione qualitativa nel comportamento o nei movimenti degli individui trattati nel corso delle 3 settimane di prova (Grafico 6).

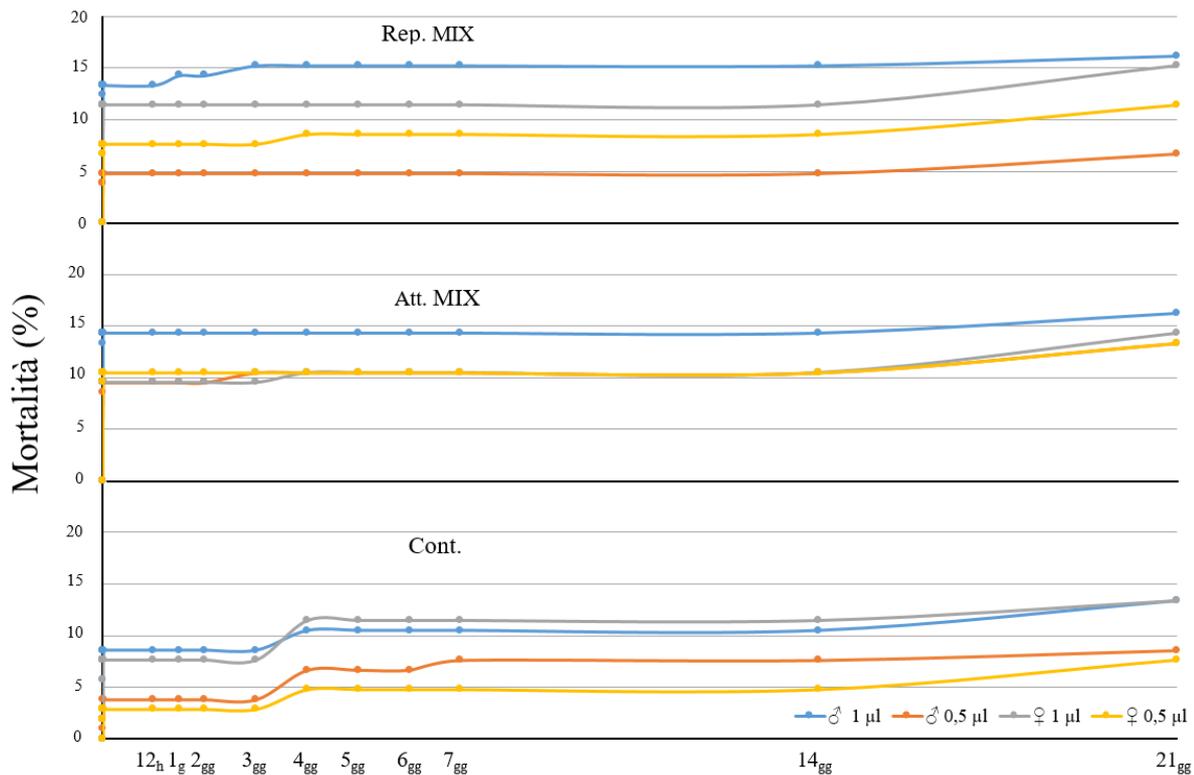


Grafico 6: Dati di mortalità (%) di adulti maschi (♂) e femmine (♀) *B. oleae* nel biosaggio con applicazioni topiche di singole gocce di 1 µl o 0,5 µl sul torace. Cont. = Goccia di acqua distillata; Rep. MIX = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da cellulose, legno, mais e erba medica a 300 e 500 °C; Att. MIX = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da sansa a 300 e 500 °C.

### Saggi Olfattometrici

La distribuzione delle risposte tra Attrattività, Repellenza ed Indecisione è risultata statisticamente differente al test del  $\chi^2$  (p value 0,005) tranne per il saggio con 6PP alla concentrazione di  $10^{-3}$  (Grafico 7).

Alla concentrazione minore, il 6PP non ha interferito con la capacità degli insetti di individuare le olive. All'aumentare della concentrazione, viceversa, l'interferenza ha determinato un aumento dell'indecisione, indipendentemente dal sesso degli insetti. Gli individui rimanevano fermi sul posto a pulirsi le antenne piuttosto che prendere una decisione di qualsiasi tipo.

Il saggio con il 6PP non associato alle olive, è stato effettuato allo scopo di verificare se la mancanza di una precisa scelta fosse dovuta alla sola sostanza o ad un effetto combinato con la presenza delle

olive. La prova ha determinato una distribuzione tra le tre possibili risposte del 33%, mentre nel controllo Aria-Aria, cui questo saggio va paragonato, la distribuzione era praticamente equa tra i due bracci con meno del 5% di indecisione.

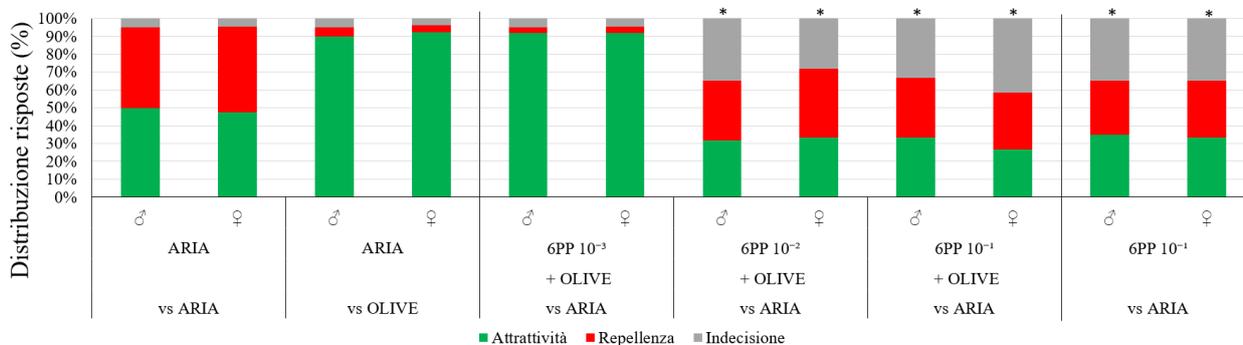
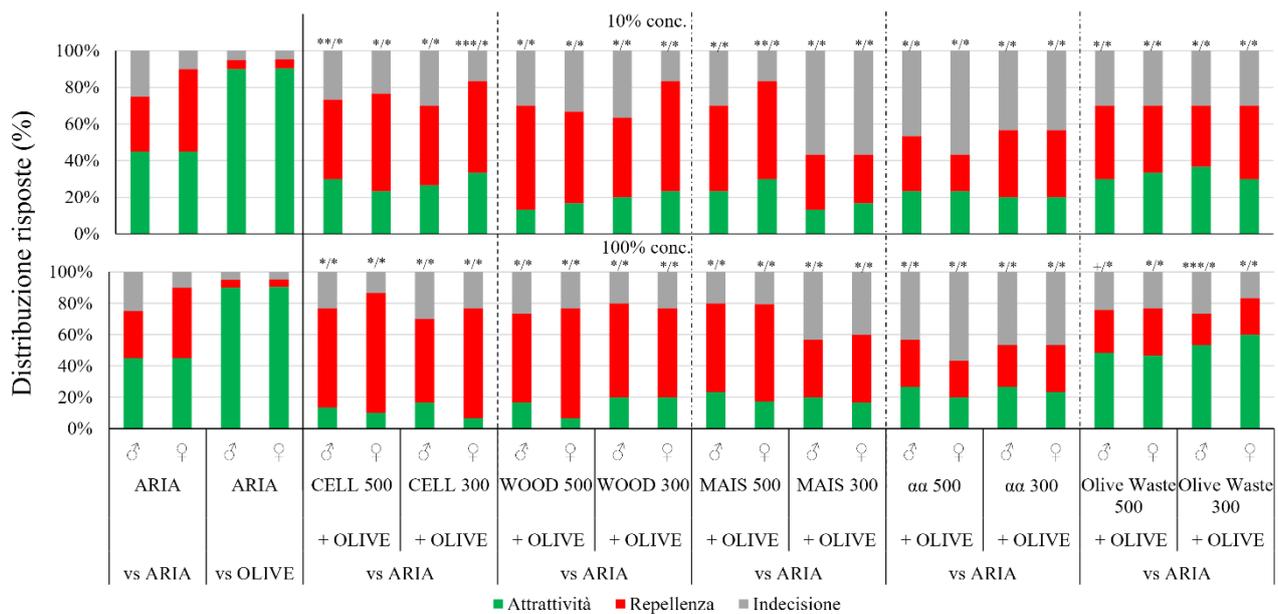


Grafico 7: Distribuzione (%) delle risposte tra Attrattività (●), Repellenza (●) e Indecisione (●) di adulti maschi (♂) e femmine (♀) di *B. oleae* in saggio olfattometrico. ARIA vs ARIA = controllo con entrambe le camere laterali vuote; ARIA vs OLIVE = controllo con 12 olive, attrattive, offerte in contrapposizione ad aria pura; 6PP 10<sup>-3</sup> + OLIVE vs ARIA = 6-pentyl- $\alpha$ -pirone a concentrazione 10<sup>-3</sup> offerto in combinazione con 12 olive, attrattive, e in contrapposizione ad aria pura; 6PP 10<sup>-2</sup> + OLIVE vs ARIA = 6-pentyl- $\alpha$ -pirone a concentrazione 10<sup>-2</sup> in combinazione con 12 olive, attrattive, e offerto in contrapposizione ad aria pura; 6PP 10<sup>-1</sup> + OLIVE vs ARIA = 6-pentyl- $\alpha$ -pirone a concentrazione 10<sup>-1</sup> offerto in combinazione con 12 olive, attrattive, e in contrapposizione ad aria pura; 6PP 10<sup>-1</sup> vs ARIA = 6-pentyl- $\alpha$ -pirone a concentrazione 10<sup>-1</sup> offerto solo e in contrapposizione ad aria pura. Test  $\chi^2$  utilizzando quanto registrato nel controllo come risultati attesi. \*= differenza significativa (p value <0,005).

I saggi olfattometrici con SWs (Grafico 8) hanno evidenziato elevata indecisione con quelle derivate da *M. sativa*, indipendentemente dalla temperatura di pirolisi e da *Z. mais*, quando prodotta a 300 °C. MAIS 500 ha invece un effetto maggiormente repellente. Nelle restanti SWs la repellenza è stata registrata in almeno il 50% degli individui. Gli effetti maggiori sono stati ottenuti con la concentrazione massima di CELL 500, che ha provocato repellenza nel 76% delle femmine e nel 63% dei maschi, e WOOD 500, repellente per il 70% delle femmine.

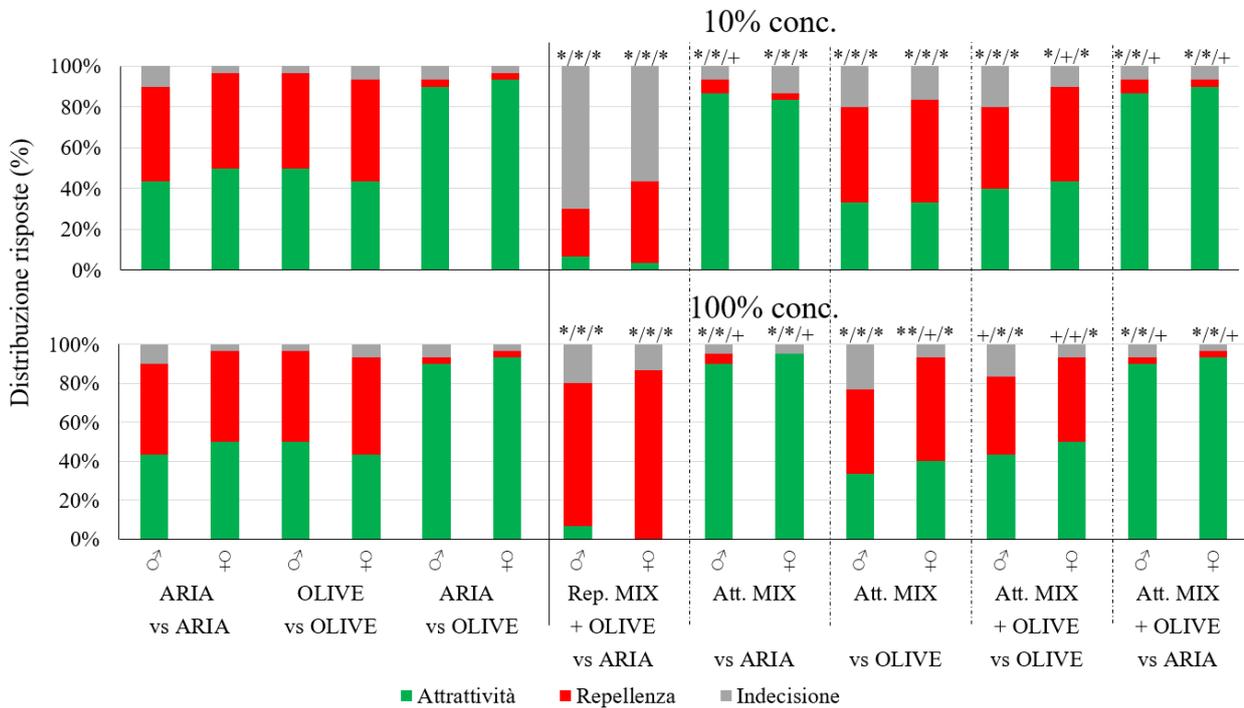
Anche per le SWs ottenute da sansa l'effetto registrato è funzione diretta della concentrazione, ma la risposta prevalente è stata di tipo attrattivo. La concentrazione minore provata di Olive waste 500 e Olive waste 300 è risultata attrattiva per il 40% dei maschi e delle femmine esposte, rispettivamente. A questa concentrazione, almeno il 30% degli individui saggiati ha scelto il braccio in cui era presente la sostanza in combinazione con le olive. Quando non diluite, il loro effetto attrattivo è aumentato ulteriormente. Olive waste 300 è risultata attrattiva per il 60% delle femmine ed il 53% dei maschi, mentre Olive waste 500 lo è stata in maniera minore, attraendo poco meno della metà degli insetti saggiati, indipendentemente dal sesso. L'attrattività registrata non è paragonabile con il 90% di preferenze registrato con l'esposizione delle sole olive. Tutti i dati ottenuti sono risultati statisticamente differenti rispetto al controllo Aria-Olive, con effetti di repellenza o di attrattività.



**Grafico 8:** Distribuzione (%) delle risposte tra Attrattività (●), Repellenza (●) e Indecisione (●) di adulti maschi (♂) e femmine (♀) di *B. oleae* in saggio olfattometrico con differenti SWs a concentrazione 10% (grafico in alto) e 100% (grafico in basso). ARIA vs ARIA = controllo con entrambe le camere laterali vuote; ARIA vs OLIVE = controllo con 12 olive, attrattive, offerte in contrapposizione ad aria pura; CELL 500 + OLIVE vs ARIA= Smoke Water ottenuta da cellulosa a 500 °C offerta in combinazione con 12 olive, attrattive, e in contrapposizione ad aria pura; CELL 300 + OLIVE vs ARIA= Smoke Water ottenuta da cellulosa a 300 °C offerta in combinazione con 12 olive, attrattive, e in contrapposizione ad aria pura; WOOD 500 + OLIVE vs ARIA = Smoke Water ottenuta da legno a 500 °C offerta in combinazione con 12 olive, attrattive, e in contrapposizione ad aria pura; WOOD 300 + OLIVE vs ARIA = Smoke Water ottenuta da legno a 300 °C offerta in combinazione con 12 olive, attrattive, e in contrapposizione ad aria pura; MAIS 500 + OLIVE vs ARIA = Smoke Water ottenuta da mais a 500 °C offerta in combinazione con 12 olive, attrattive, e in contrapposizione ad aria pura; MAIS 300 + OLIVE vs ARIA = Smoke Water ottenuta da mais a 300 °C offerta in combinazione con 12 olive, attrattive, e in contrapposizione ad aria pura; αα 500 + OLIVE vs ARIA = Smoke Water ottenuta da erba medica a 500 °C offerta in combinazione con 12 olive, attrattive, e in contrapposizione ad aria pura; αα 300 + OLIVE vs ARIA = Smoke Water ottenuta da erba medica a 300 °C offerta in combinazione con 12 olive, attrattive, e in contrapposizione ad aria pura; Olive Waste 500 + OLIVE vs ARIA = Smoke Water ottenuta da sansa a 500 °C offerta in combinazione con 12 olive, attrattive, e in contrapposizione ad aria pura; Olive Waste 300 + OLIVE vs ARIA = Smoke Water ottenuta da sansa a 300 °C offerta in combinazione con 12 olive, attrattive, e in contrapposizione ad aria pura. Test  $\chi^2$  utilizzando quanto registrato nel controllo come risultati attesi ed indicato in funzione del controllo ARIA vs ARIA e ARIA vs OLIVE. \* = differenza significativa (p value < 0,005); \*\* = differenza significativa (p value < 0,01); \*\*\* = differenza significativa (p value < 0,05); + = differenza non significativa.

Per valutare gli effetti delle miscele Rep. MIX e Att. Mix, è stato necessario, per entrambi i sessi, tarare il sistema sia con entrambe le camere laterali vuote, che con il numero minimo di 12 olive, in aggiunta al controllo Aria pura vs Olive (Grafico 9). La miscela di SW Rep. MIX non diluita è risultata repellente e la sua presenza ha coperto l'attrattività delle olive con cui è stata offerta in combinazione al punto tale che le femmine non hanno mai scelto quella direzione, determinando differenze significative rispetto a tutti e tre i controlli (p value < 0,005). Al 10% di diluizione, la miscela ha aumentato l'indecisione (70% e 56% delle risposte rispettivamente per maschi e femmine), che è risultato così l'effetto preponderante. La miscela Att. MIX per entrambe le concentrazioni è risultata fortemente attrattiva quando offerta da sola rispetto al flusso di Aria pura, con una distribuzione delle risposte statisticamente paragonabile a quella ottenuta con il controllo Aria-Olive, con un'indecisione di solo il 13% delle femmine con Att. MIX 10%. Risposta simile è stata

registrata quando la stessa miscela è stata esposta assieme alle olive, con risultati sempre paragonabili al controllo Aria-Olive.



**Grafico 9:** Distribuzione (%) delle risposte tra Attrattività (●), Repellenza (●) e Indecisione (●) di adulti maschi (♂) e femmine (♀) di *B. oleae* in saggio olfattometrico con due SWs a concentrazione 10% (grafico in alto) e 100% (grafico in basso). ARIA vs ARIA = controllo con entrambe le camere laterali vuote; OLIVE vs OLIVE = controllo con entrambe le camere riempite con 12 olive, attrattive; ARIA vs OLIVE = controllo con 12 olive, attrattive, offerte in contrapposizione ad aria pura; Rep. MIX + OLIVE vs ARIA = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da cellulose, legno, mais e erba medica a 300 e 500 °C offerta in combinazione con 12 olive, attrattive, e in contrapposizione ad aria pura; Att. MIX vs ARIA = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da sansa a 300 e 500 °C offerta sola ed in contrapposizione ad aria pura; Att. MIX vs OLIVE = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da sansa a 300 e 500 °C offerta sola ed in contrapposizione a 12 olive, attrattive; Att. MIX + OLIVE vs OLIVE = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da sansa a 300 e 500 °C offerta in combinazione con 12 olive, attrattive, e in contrapposizione a 12 olive, attrattive; Att. MIX + OLIVE vs ARIA = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da sansa a 300 e 500 °C offerta in combinazione con 12 olive, attrattive, e in contrapposizione ad aria pura. Test  $\chi^2$  utilizzando quanto registrato nel controllo come risultati attesi ed indicato in funzione del controllo ARIA vs ARIA, OLIVE vs OLIVE e ARIA vs OLIVE. \* = differenza significativa (p value < 0,005); \*\* = differenza significativa (p value < 0,05); + = differenza non significativa.

Quando Att. MIX è stata offerta in contrapposizione ad altre olive la distribuzione registrata tra le risposte è stata più equilibrata. Se saggiata da sola e diluita al 10% ha fatto registrare indecisione nel 16% degli individui maschi e nel 20% delle femmine. Alla concentrazione massima ha causato indecisione nel 23% dei maschi ma solo del 6% nelle femmine, infatti in questo caso la distribuzione risulta statisticamente meno differente rispetto al controllo Aria-Aria (p value < 0,05) e simile a quello Olive-Olive.

Att. Mix offerta in combinazione con le olive e verso altre olive ha provocato ancora indecisione, portandola fino al 20% nei maschi con la diluizione al 10% e causando una differenza significativa (p value > 0,005) rispetto a tutti i controlli. Nelle stesse condizioni l'indecisione è stata dimezzata

nelle femmine e ciò ha reso la distribuzione simile al controllo Olive-Olive. Portando la concentrazione della SW al 100% la distribuzione risulta statisticamente simile al controllo Aria-Aria per entrambi i sessi ed anche al controllo Olive-Olive per le femmine.

### Saggi Elettroantennografici

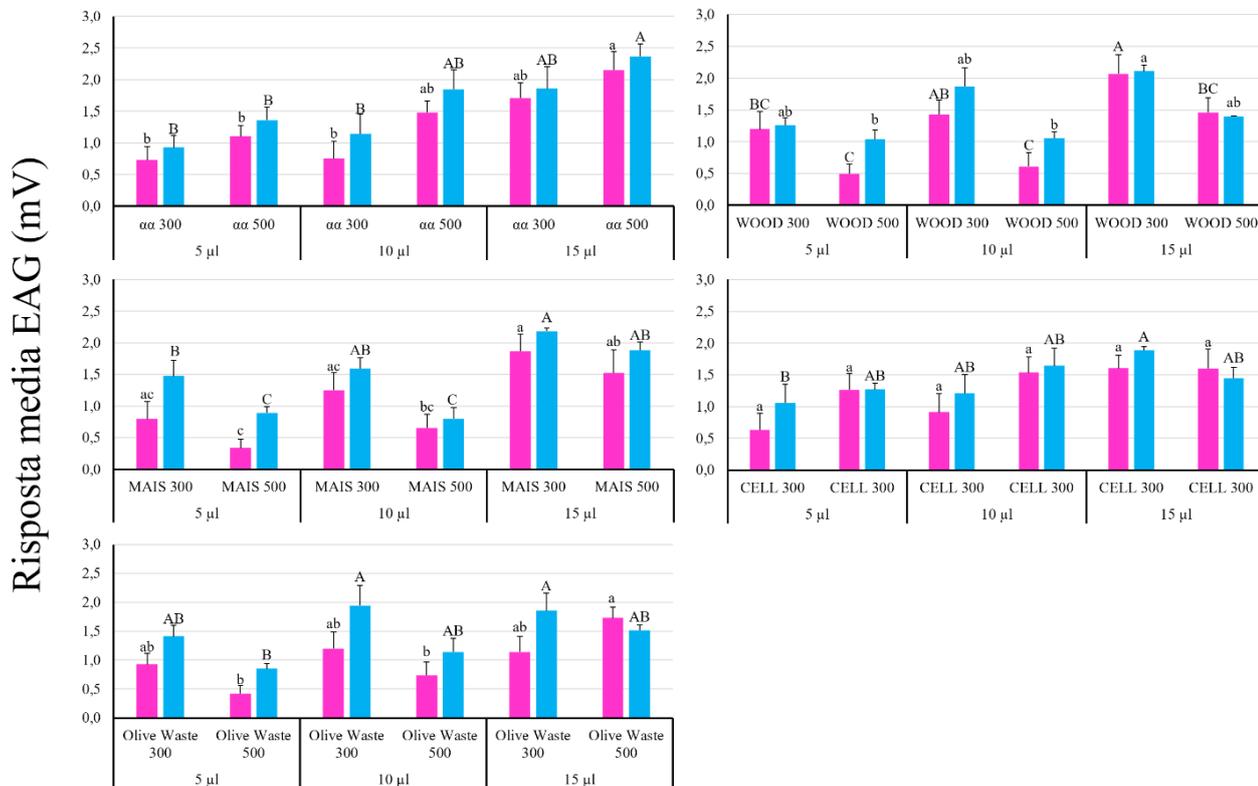


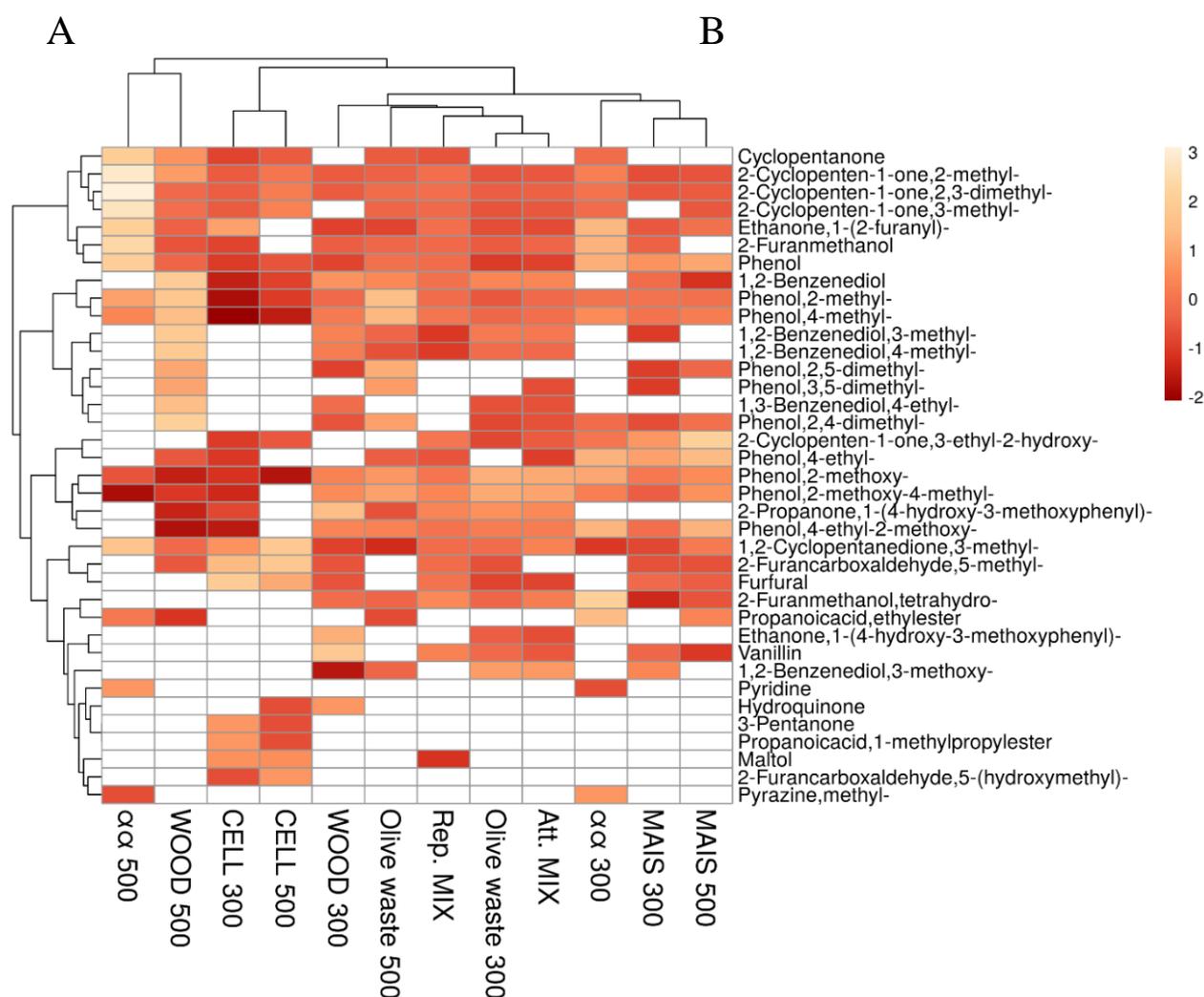
Grafico 10: Risposta media EAG (mV) registrata su adulti femmine (●) e maschi (●) di *B. oleae* di due settimane a stimoli di 5 µl, 10 µl e 15 µl. αα 300 = Smoke Water ottenuta da erba medica a 300 °C; αα 500 = Smoke Water ottenuta da erba medica a 500 °C; WOOD 300 = Smoke Water ottenuta da legno a 300 °C; WOOD 500 = Smoke Water ottenuta da legno a 500 °C; MAIS 300 = Smoke Water ottenuta da mais a 300 °C; MAIS 500 = Smoke Water ottenuta da mais a 500 °C; CELL 300 = Smoke Water ottenuta da cellulosa a 300 °C; CELL 500 = Smoke Water ottenuta da cellulosa a 500 °C; Olive Waste 300 = Smoke Water ottenuta da sansa a 300 °C; Olive Waste 500 = Smoke Water ottenuta da sansa a 500 °C. Trattamenti con le stesse lettere non mostrano differenze significative (Test ANOVA, Post-hoc di Student-Newman-Keuls all'interno dei gruppi).

Come mostrato in Grafico 10, l'intensità della risposta delle antenne dei soggetti è quasi sempre dose-dipendente. All'aumentare del volume insufflato, la risposta dei soggetti aumenta, indipendentemente dal sesso e dal tipo di SW saggiata. La risposta media maggiore è ottenuta con 15 µl di SW αα 500 per entrambi i sessi. Nel saggio MAIS 500, 5 µl si è registrata una maggiore reattività dell'antenna maschile rispetto a quelle registrate con dosi di 10 µl: 0,892 e 0,802 mV rispettivamente. La minore risposta è stata registrata con 5 µl di MAIS 500 per le femmine (0,338 mV) e con 10 µl della stessa sostanza per i maschi (0,802 mV). Per le femmine le maggiori differenze sono state registrate tra MAIS 300 (15 µl) e MAIS 500 (5 µl). Nei saggi elettroantennografici con le SWs CELL, nessuna differenza statistica è stata rilevata per le femmine, con i valori minimo e massimo registrati di 0,632 e 1,605 mV, mentre per i maschi la maggior differenza registrata ha riguardato i

saggi CELL 300 (15  $\mu$ l) e CELL 300 (5  $\mu$ l). La risposta maggiore è stata registrata, per entrambi i sessi, con 15  $\mu$ l di  $\alpha$  500.

### Caratterizzazione GC-MS delle Acque Affumicate

Le caratterizzazioni gascromatografiche hanno evidenziato differenze tra i profili dei composti presenti nelle SWs. In Figura 11 sono riportati i cromatogrammi risultati dall'analisi GC-MS delle miscele Att. MIX e Rep. MIX in cui sono indicati i tempi di ritenzione dei principali composti separati dal cromatografo. Le differenze tra i profili delle varie SWs risultano meno evidenti a seguito della reazione con tetrametil silano (TMS) (Grafico 12 e Grafico 14) e sono state individuate 37 molecole volatili e 16 non volatili (Grafico 11 e Grafico 13).



*Grafico 11:* A: Heatmap e dendrogramma del clustering con distanza euclidea e metodo Ward delle principali molecole identificate (SI>90%) in GC-MS nelle SWs e in due miscele. Cluster raggruppati in base alla prossimità. Le caselle bianche indicano l'assenza della molecola.  $\alpha$  300 = Smoke Water ottenuta da erba medica a 300 °C;  $\alpha$  500 = Smoke Water ottenuta da erba medica a 500 °C; WOOD 300 = Smoke Water ottenuta da legno a 300 °C; WOOD 500 = Smoke Water ottenuta da legno a 500 °C; MAIS 300 = Smoke Water ottenuta da mais a 300 °C; MAIS 500 = Smoke Water ottenuta da mais a 500 °C; CELL 300 = Smoke Water ottenuta da cellulosa a 300 °C; CELL 500 = Smoke Water ottenuta da cellulosa a 500 °C; Olive Waste 300 = Smoke Water ottenuta da sansa a 300 °C; Olive Waste 500 = Smoke Water ottenuta da sansa a 500 °C; Rep. MIX = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da cellulose, legno, mais e erba medica a 300 e 500 °C; Att. MIX = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da sansa a 300 e 500 °C. B: molecole differenziali.

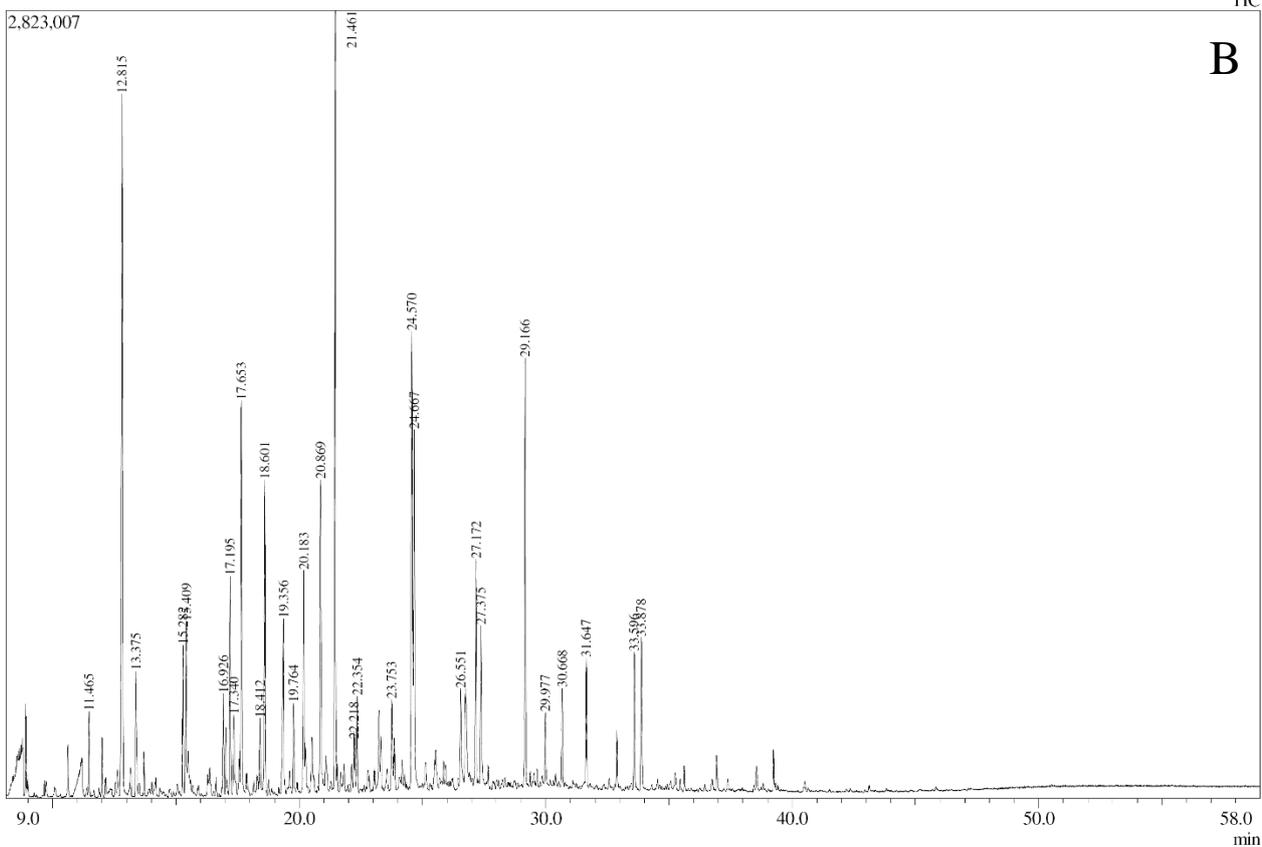
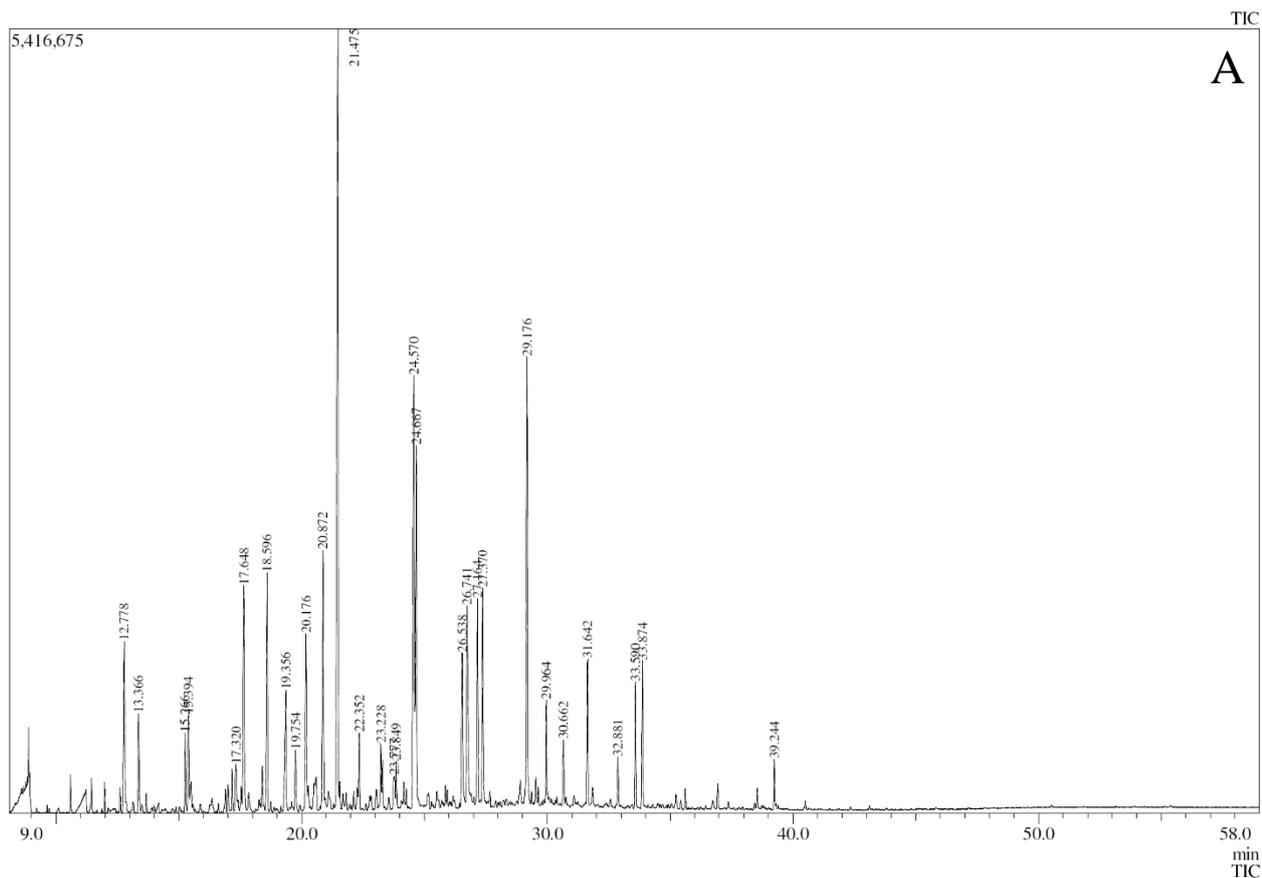


Figura 11: Cromatogrammi delle analisi GC-MS delle miscele di SWs Att. MIX (A) e Rep. MIX (B) svolte presso la School of Molecular Sciences dell'University of Western Australia, in Crawley (Perth – WA) dal Prof Gavin Flematti.

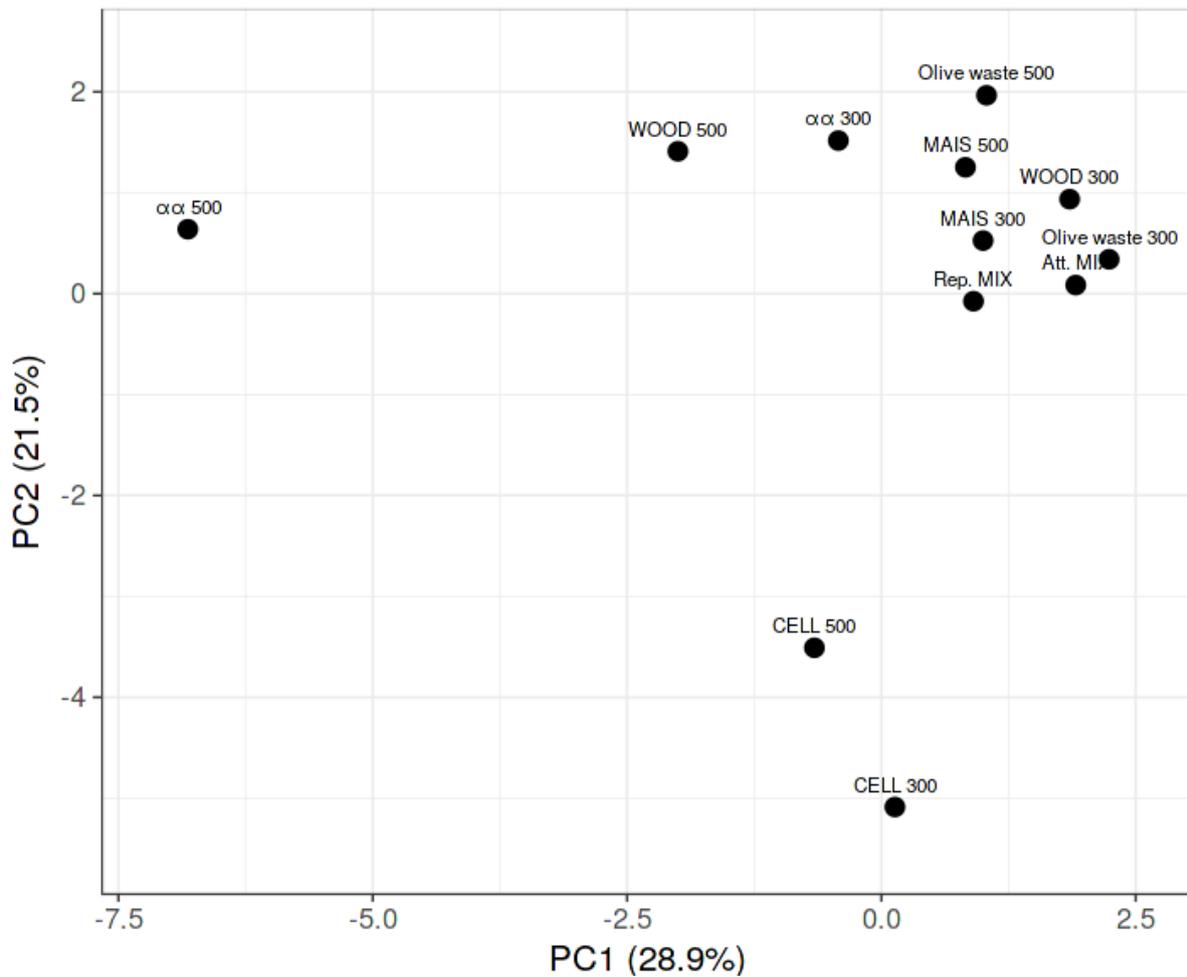


Grafico 12: Analisi PCA delle SW e nelle due miscele analizzate in GC-MS.  $\alpha\alpha$  300 = Smoke Water ottenuta da erba medica a 300 °C;  $\alpha\alpha$  500 = Smoke Water ottenuta da erba medica a 500 °C; WOOD 300 = Smoke Water ottenuta da legno a 300 °C; WOOD 500 = Smoke Water ottenuta da legno a 500 °C; MAIS 300 = Smoke Water ottenuta da mais a 300 °C; MAIS 500 = Smoke Water ottenuta da mais a 500 °C; CELL 300 = Smoke Water ottenuta da cellulosa a 300 °C; CELL 500 = Smoke Water ottenuta da cellulosa a 500 °C; Olive Waste 300 = Smoke Water ottenuta da sansa a 300 °C; Olive Waste 500 = Smoke Water ottenuta da sansa a 500 °C; Rep. MIX = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da cellulose, legno, mais e erba medica a 300 e 500 °C; Att. MIX = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da sansa a 300 e 500 °C.

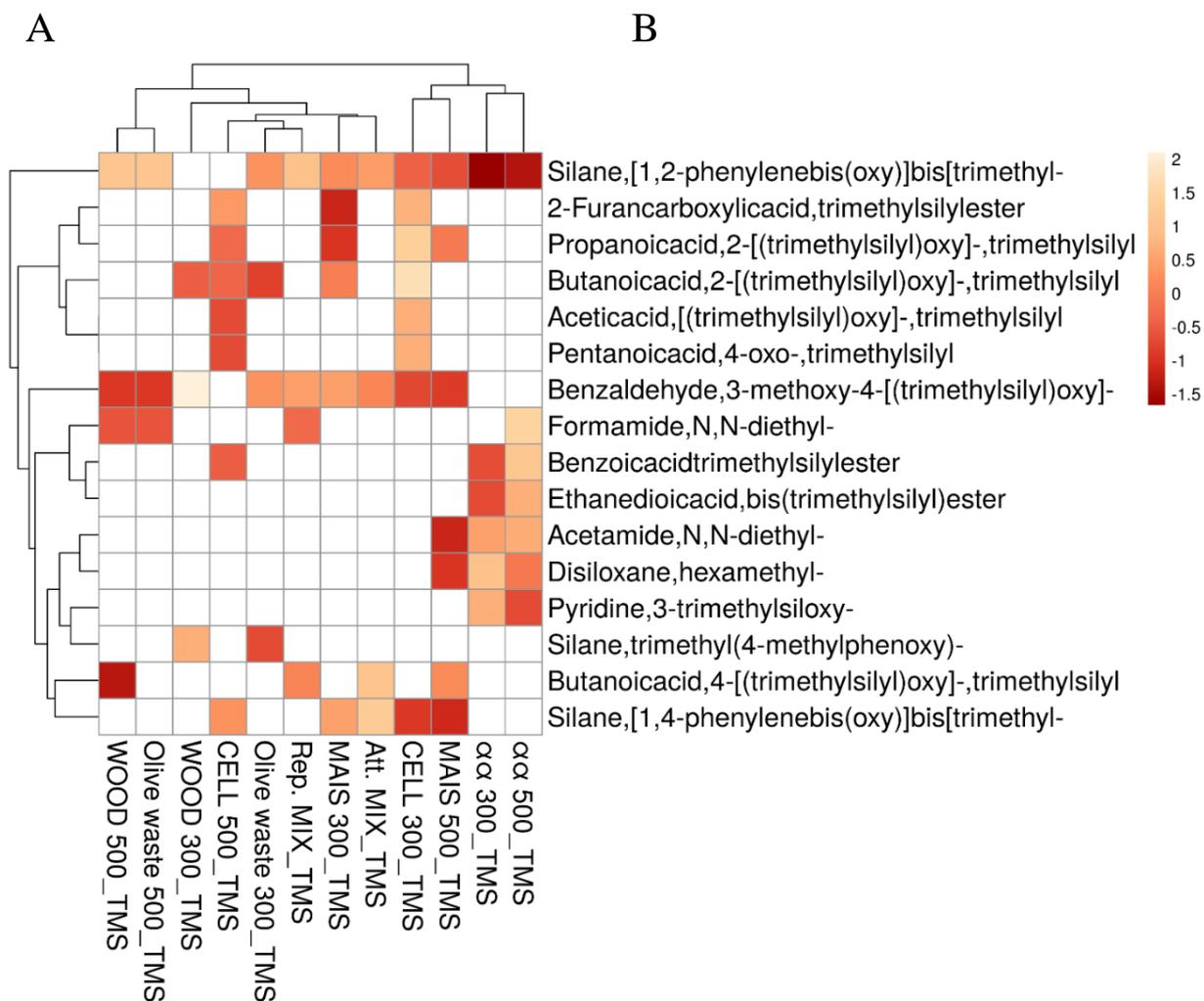


Grafico 13: A: Heatmap e dendrogramma del clustering con distanza euclidea e metodo Ward delle principali molecole identificate (SI>90%) in GC-MS nelle SW e in due miscele, dopo reazione con Tetrametil silano (TMS). Cluster raggruppati in base alla prossimità. Le caselle bianche indicano l'assenza della molecola. αα 300\_TMS = Smoke Water ottenuta da erba medica a 300 °C dopo reazione con TMS; αα 500\_TMS = Smoke Water ottenuta da erba medica a 500 °C dopo reazione con TMS; WOOD 300\_TMS = Smoke Water ottenuta da legno a 300 °C dopo reazione con TMS; WOOD 500\_TMS = Smoke Water ottenuta da legno a 500 °C dopo reazione con TMS; MAIS 300\_TMS = Smoke Water ottenuta da mais a 300 °C dopo reazione con TMS; MAIS 500\_TMS = Smoke Water ottenuta da mais a 500 °C dopo reazione con TMS; CELL 300\_TMS = Smoke Water ottenuta da cellulosa a 300 °C dopo reazione con TMS; CELL 500\_TMS = Smoke Water ottenuta da cellulosa a 500 °C dopo reazione con TMS; Olive Waste 300\_TMS = Smoke Water ottenuta da sansa a 300 °C dopo reazione con TMS; Olive Waste 500\_TMS = Smoke Water ottenuta da sansa a 500 °C dopo reazione con TMS; Rep. MIX\_TMS = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da cellulose, legno, mais e erba medica a 300 e 500 °C dopo reazione con TMS; Att. MIX\_TMS = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da sansa a 300 e 500 °C dopo reazione con TMS. B: molecole differenziali.

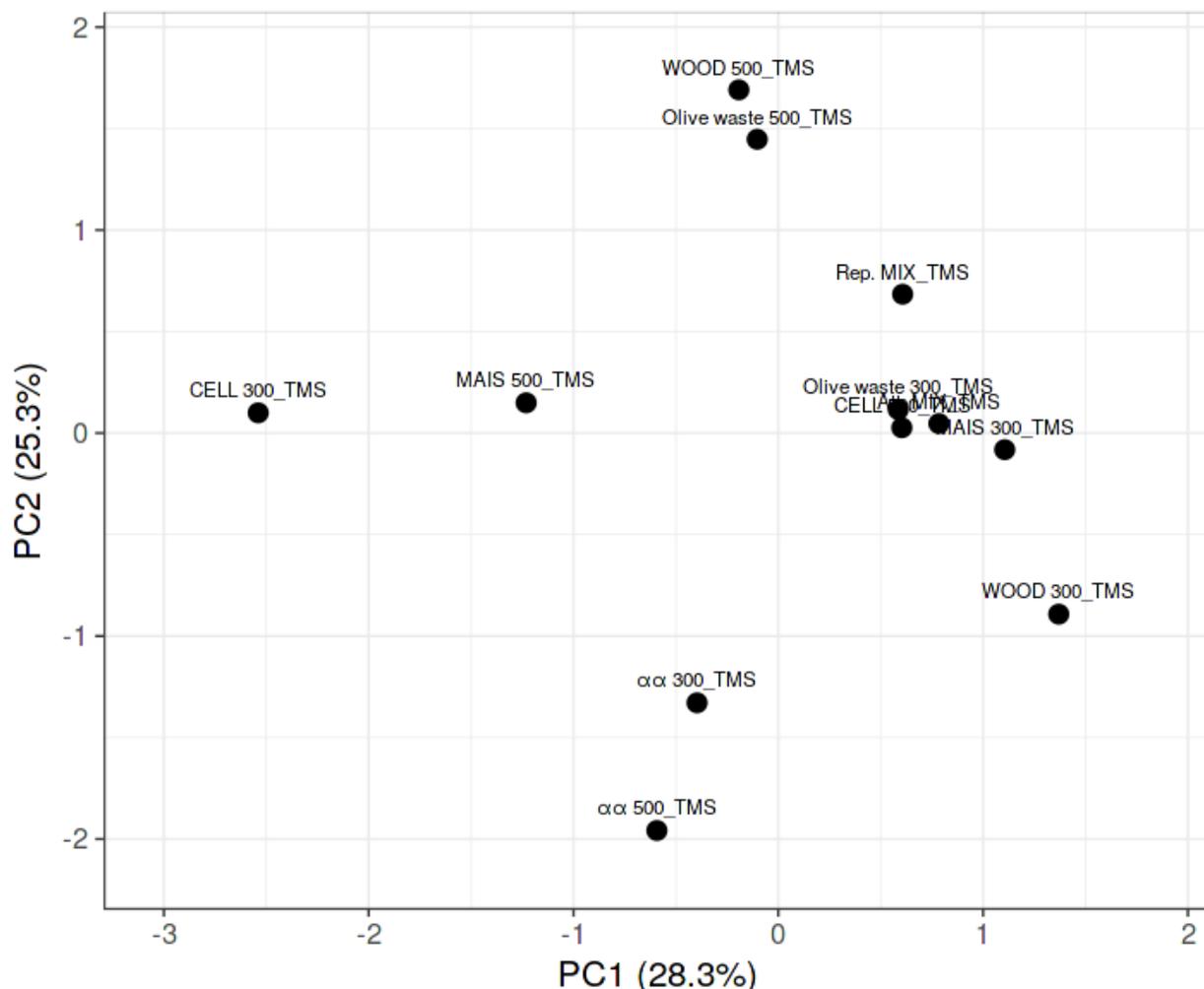


Grafico 14: Analisi PCA delle SW e nelle due miscele analizzate in GC-MS dopo reazione con Tetrametil silano (TMS). αα 300\_TMS = Smoke Water ottenuta da erba medica a 300 °C dopo reazione con TMS; αα 500\_TMS = Smoke Water ottenuta da erba medica a 500 °C dopo reazione con TMS; WOOD 300\_TMS = Smoke Water ottenuta da legno a 300 °C dopo reazione con TMS; WOOD 500\_TMS = Smoke Water ottenuta da legno a 500 °C dopo reazione con TMS; MAIS 300\_TMS = Smoke Water ottenuta da mais a 300 °C dopo reazione con TMS; MAIS 500\_TMS = Smoke Water ottenuta da mais a 500 °C dopo reazione con TMS; CELL 300\_TMS = Smoke Water ottenuta da cellulosa a 300 °C dopo reazione con TMS; CELL 500\_TMS = Smoke Water ottenuta da cellulosa a 500 °C dopo reazione con TMS; Olive Waste 300\_TMS = Smoke Water ottenuta da sansa a 300 °C dopo reazione con TMS; Olive Waste 500\_TMS = Smoke Water ottenuta da sansa a 500 °C dopo reazione con TMS; Rep. MIX\_TMS = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da cellulose, legno, mais e erba medica a 300 e 500 °C dopo reazione con TMS; Att. MIX\_TMS = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da sansa a 300 e 500 °C dopo reazione con TMS.

La distanza minima registrata nei dendogrammi ottenuti utilizzando la cluster analysis, si evidenzia tra Olive Waste 300 e la miscela Att. MIX e Olive Waste 300\_TMS e Rep. MIX. La PCA mostra comunque Olive Waste 300 e Att. MIX molto simili tra loro sia pre- che post-reazione con TMS (Grafico 12 e Grafico 14). Tra le molecole presenti in tutte le SWs, quella maggiormente presente è il phenol,2-methoxy- conosciuta anche con il nome guaiacol e responsabile del forte odore di affumicato che caratterizza tutti questi prodotti. Un altro composto molto presente e caratteristico è il furfurale, un'aldeide che ha una DL50 di 4-500 mg/kg per i topi e può risultare irritante al contatto (Hoydonckx *et al.*, 2007). Altre due SWs vicine tra loro nel clustering ma lontane dalle altre sono

le due CELL, con una prossimità maggiore rispetto a quella riscontrata tra  $\alpha$  500 e Wood 500. CELL 300 è risultata essere più ricca in VOCs ma, tra i due, CELL 500 è l'unica ad avere l'idrochinone, noto anche per essere uno dei due componenti principali delle espulsioni esplosive utilizzate dai coleotteri bombardieri per la difesa (Attygalle *et al.*, 2020). Nel profilo gascromatografico di CELL 500 non sono presenti il 1-(2-furanil)-etanone ed il 2-metossi-4-metil-fenolo, presenti invece nelle SWs risultate attrattive e nella miscela Att. MIX. I due CELL sono le uniche SWs saggiate a contenere maltolo, conservato anche in Rep. MIX, in cui si presenta in ancora maggiore concentrazione. La maggior distanza tra i cluster dei composti volatili rilevati nell'analisi GC/MS è registrata tra ciclopentanone e metilpirazina, presente solo in  $\alpha$  300 e  $\alpha$  500.

A seguito della reazione con TMS, la sola sostanza non volatile individuata in Olive Waste 500\_TMS è stata la dietilformamide, N,N-. Benché  $\alpha$  500 risulti essere complessivamente la SW con meno composti volatili, come confermato anche dalla distanza registrata nella PCA, è contemporaneamente anche tra le quattro con più composti non volatili, assieme a CELL 500\_TMS, MAIS 500\_TMS e CELL 300\_TMS. La distanza maggiore nella PCA in questo caso è stata registrata tra  $\alpha$  500\_TMS e WOOD 500\_TMS.

## Prove di Campo

I dati inerenti le catture rilevate per ogni cluster nel biennio di prove di campo 2019-2020 sono stati espressi come valori medi e per numero totale di adulti catturati con le trappole cromo-chemiotropiche. Non è stato necessario analizzare i dati in funzione del sesso poiché le catture erano del tutto simili.

Le catture medie nelle prove Rep. MIX sono rimaste sempre basse in Calabria (Grafico 15), con un valore massimo di 9,6 individui in media registrato in corrispondenza del periodo della raccolta aziendale delle olive. Le catture ottenute con Att. MIX sono risultate sempre molto elevate rispetto agli altri cluster, lungo l'intero periodo di prove, con valori medi maggiori rispetto anche al controllo con pannelli collati attivati con bicarbonato di ammonio e feromoni (YT+attr.), risultando statisticamente differenti da tutti gli altri (Tabella 11).

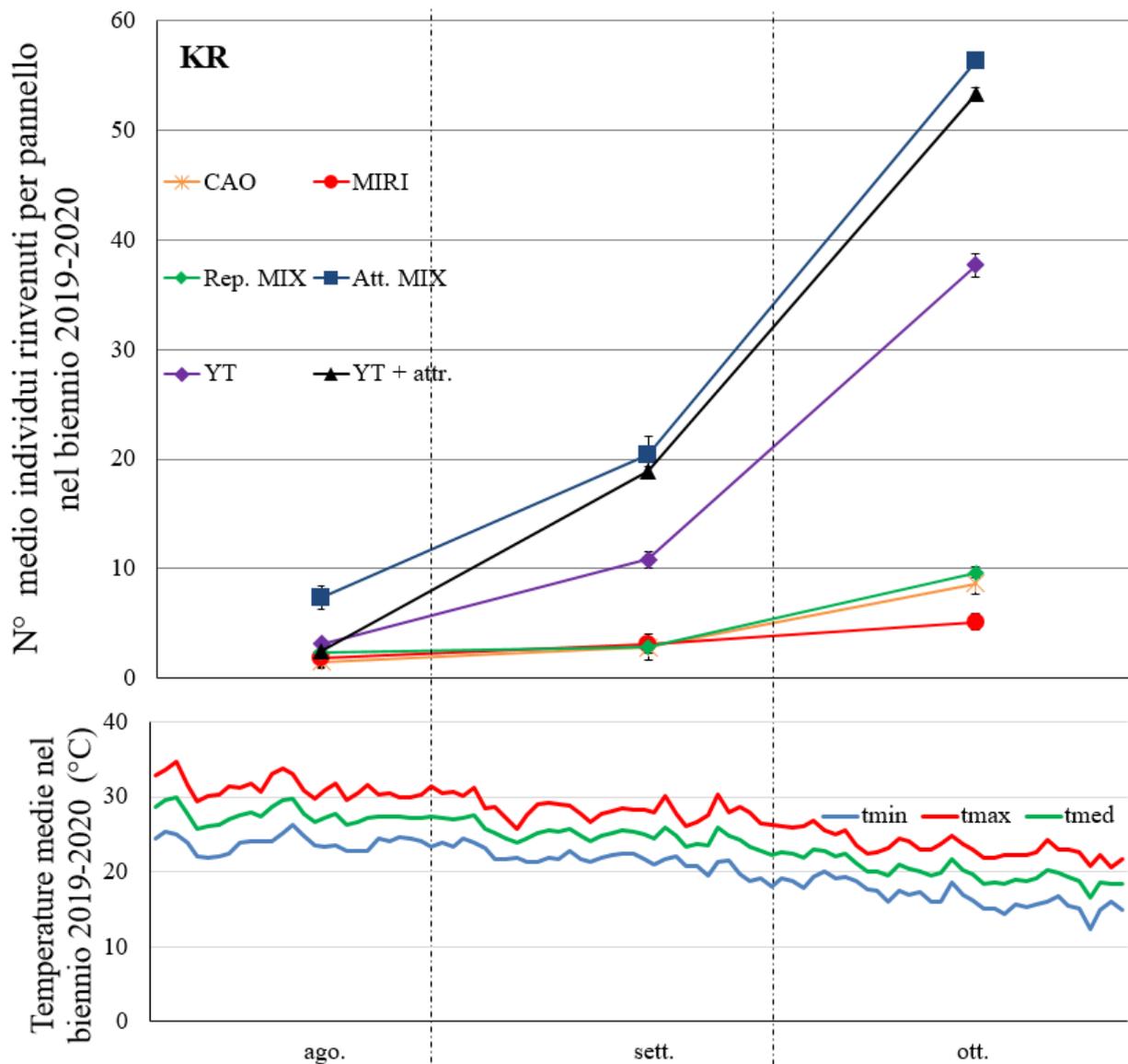


Grafico 15: Cature medie e deviazione standard di *B. oleae* rilevate nel sito di Crotona (**KR**) nel biennio 2019-2020 e andamento medio delle temperature minime (● = tmin), medie (● = tmed) e massime (● = tmax) nello stesso periodo. CAO (●) = Caolino irrorato su chioma; MIRI (●) = Isopropyl-Myristato, 15 ml per dispenser; Rep. MIX (●) = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da cellulose, legno, mais e erba medica a 300 e 500 °C, 15 ml per dispenser; Att. MIX (●) = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da sansa a 300 e 500 °C, 15 ml per dispenser; YT (●) = Controllo (Yellow Trap), solo pannello non caricato; YT + attr. (●) = Controllo (Yellow Trap), pannello con esche.

		S-N-K			
Prova		ago.	sett.	ott.	nov.
<b>KR</b>	CAO	d	d	d	
	MIRI	d	d	d	
	Rep. MIX	d	d	d	
	Att. MIX	d	c	a	
	YT	d	d	b	
	YT + attr.	d	c	a	
<b>IS</b>	CAO	h	fh	fh	f
	MIRI	h	h	fh	fg
	Rep. MIX	h	gh	fh	fh
	Att. MIX	fh	fh	d	b
	YT	fh	fh	e	c
	YT + attr.	fh	fh	c	a

Tabella 11: Differenze significative per le cature medie di *B. oleae* rilevate a Crotona (**KR**) e a Pozzilli (**IS**) durante il biennio 2019-2020. CAO (●) = Caolino irrorato su chioma; MIRI (●) = Isopropyl-Myristato, 15 ml per dispenser; Rep. MIX (●) = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da cellulose, legno, mais e erba medica a 300 e 500 °C, 15 ml per dispenser; Att. MIX (●) = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da sansa a 300 e 500 °C, 15 ml per dispenser; YT (●) = Controllo (Yellow Trap), solo pannello non caricato; YT + attr. (●) = Controllo (Yellow Trap), pannello con esche. Trattamenti con le stesse lettere non mostrano differenze significative (Test ANOVA, Post-hoc di Student-Newman-Keuls all'interno dei gruppi).

Nell'azienda collocata in Molise (Grafico 16), le catture sono state molto basse e in tutte le prove, fino ad ottobre. Le catture ottenute con Att. MIX non sono state superiori al controllo YT+attr, ma il test S-N-K indica che sono prossime ai valori registrati nel controllo in ogni periodo. I dati raccolti nelle prove con Rep. MIX hanno mostrato, anche in quest'area, un effetto repellente, statisticamente paragonabile a quello rilevato nelle prove con CAO e MIRI. Il valore massimo di catture per Rep. MIX è stato registrato in corrispondenza del periodo della raccolta aziendale delle olive e pari a 4,6, ci sono comunque più basso che con gli altri due trattamenti con i repellenti CAO e MIRI, dove i dati medi di cattura massima sono stati rispettivamente di 8 e 7,8.

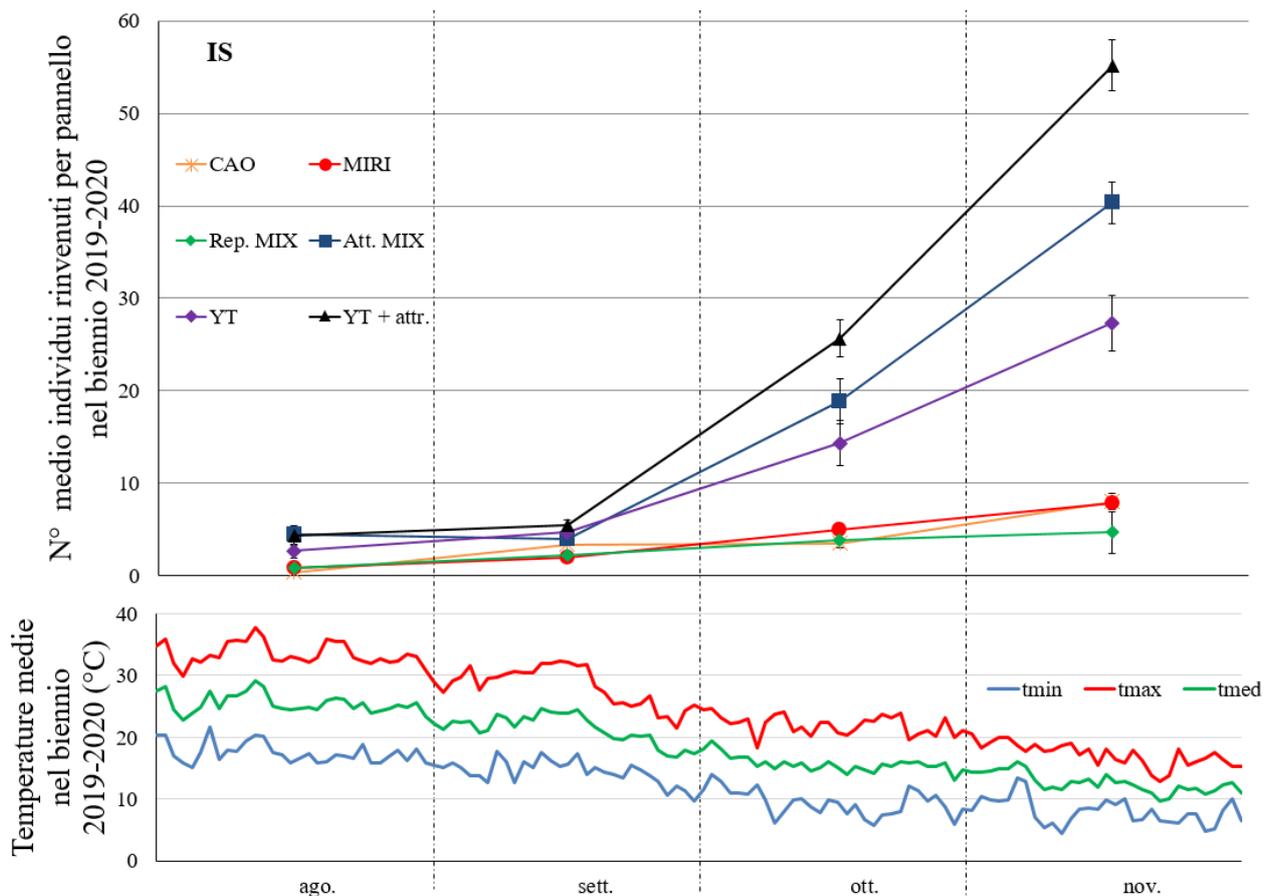


Grafico 16: Catture medie e deviazione standard di *B. oleae* rilevate nel sito di Pozzilli (IS) nel biennio 2019-2020 e andamento medio delle temperature minime (● = tmin), medie (● = tmed) e massime (● = tmax) nello stesso periodo. CAO (●) = Caolino irrorato su chioma; MIRI (●) = Isopropyl-Myristato, 15 ml per dispenser; Rep. MIX (●) = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da cellulose, legno, mais e erba medica a 300 e 500 °C, 15 ml per dispenser; Att. MIX (●) = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da sansa a 300 e 500 °C, 15 ml per dispenser; YT (●) = Controllo (Yellow Trap), solo pannello non caricato; YT + attr. (●) = Controllo (Yellow Trap), pannello con esche.

Il numero medio di ferite di ovideposizione/drupa, registrato al momento della raccolta sui campioni in entrambi i siti, si attesta su valori simili per gli stessi trattamenti (Grafico 17). Il danno riscontrato sulle olive dei cluster trattati con Att. MIX è paragonabile a quello di entrambi i controlli. Per le prove con Rep. MIX c'è stato un numero di ferite più limitato, e statisticamente simile a quello rilevato nelle prove CAO e MIRI. La percentuale di ferite di ovideposizione per le diverse prove è

indicata in Tabella 12. Il numero minimo è stato rinvenuto con MIRI (KR) e con CAO (IS). Nei cluster Att. MIX, YT e YT + attr. la totalità della produzione è stata vistata da OLF, mentre con Rep. MIX si raggiungono valori del 73,3 e 90%, rispettivamente sui siti KR e IS. Statisticamente, il numero medio di uova deposte è nettamente superiore per Att. MIX, YT e YT + attr. in entrambi i siti. Si rileva differenza statistica anche rispetto al numero medio di punture sterili negli stessi cluster. Nelle prove con Rep. MIX, il nonostante una percentuale comunque alta di frutti visitati, il numero medio di punture rimane basso. Il rapporto tra punture sterili e fertili raggiunge infatti i valori di 1,38:1 a Crotona, unico caso in cui il numero di punture sterili è risultato maggiore delle uova deposte, e 0,9:1 a Pozzilli, similmente a quanto accaduto nelle prove con CAO e MIRI. Tali valori sono risultati sempre molto distanti rispetto a quanto ottenuto negli altri 3 tipi di cluster.

	% attacco su 30 olive (punture)	Prove	S-N-K Punture sterili/attive	
<b>KR</b>	53,33	CAO	f	f
	36,67	MIRI	f	f
	73,33	Rep. MIX	df	ef
	100,00	Att. MIX	ce	b
	100,00	YT	c	a
	100,00	YT + attr.	cd	a
<b>IS</b>	36,67	CAO	e	e
	66,67	MIRI	e	e
	90,00	Rep. MIX	e	e
	100,00	Att. MIX	c	b
	100,00	YT	c	a
	100,00	YT + attr.	d	ab

Tabella 12: Percentuali di ferite di ovideposizione (%) e differenze significative tra punture sterili ed attive a Crotona (KR) e a Pozzilli (IS). CAO (●) = Caolino irrorato su chioma; MIRI (●) = Isopropyl-Myristato, 15 ml per dispenser; Rep. MIX (●) = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da cellulose, legno, mais e erba medica a 300 e 500 °C, 15 ml per dispenser; Att. MIX (●) = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da sansa a 300 e 500 °C, 15 ml per dispenser; YT (●) = Controllo (Yellow Trap), solo pannello non caricato; YT + attr. (●) = Controllo (Yellow Trap), pannello con esche. Trattamenti con le stesse lettere non mostrano differenze significative (Test ANOVA, Post-hoc di Student-Newman-Keuls all'interno dei gruppi).

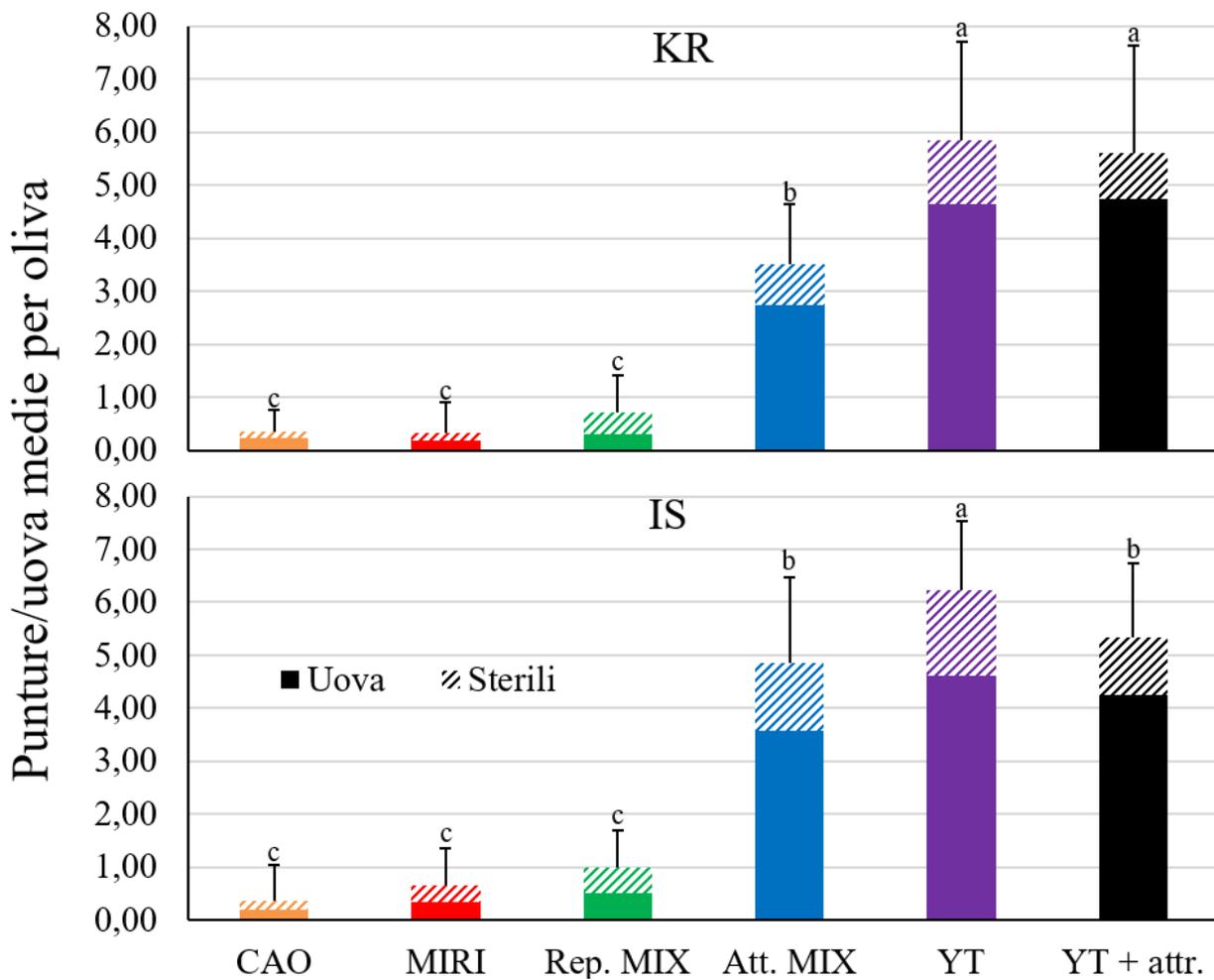


Grafico 17: Numero medio di ferite di ovideposizione senza (◌) e con (●) deposizione di uova di *B. oleae* rilevato sulle drupe al momento della raccolta nei vari cluster, a Crotone (KR) e a Pozzilli (IS). CAO (●) = Caolino irrorato su chioma; MIRI (●) = Isopropyl-Myristato, 15 ml per dispenser; Rep. MIX (●) = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da cellulose, legno, mais e erba medica a 300 e 500 °C, 15 ml per dispenser; Att. MIX (●) = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da sansa a 300 e 500 °C, 15 ml per dispenser; YT (●) = Controllo (Yellow Trap), solo pannello non caricato; YT + attr. (●) = Controllo (Yellow Trap), pannello con esche. Trattamenti con le stesse lettere non mostrano differenze significative (Test ANOVA, Post-hoc di Student-Newman-Keuls all'interno dei gruppi).

## Discussioni e Conclusioni

I trattamenti effettuati hanno mostrato una significativa influenza sulla fenologia e biologia di *B. oleae* e limitato lo sviluppo delle nuove generazioni, similmente a quanto rilevato in bibliografia anche con altre sostanze (oli essenziali di *Pimpinella anisum* L., *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague, *Thymbra spicata* L. e *Ocimum gratissimum* L.) ed a concentrazioni simili (Rizzo *et al.*, 2020). I dati relativi all'attività dei metaboliti secondari estratti da *T. harzianum*, *T. saturnisporum* e *C. aleurites*, dell'ossicloruro di rame e delle acque affumicate indicano un'ampia variabilità. In particolare, i dati di mortalità hanno evidenziato una maggiore sensibilità delle femmine alla somministrazione di diete addizionate con le sostanze saggiate. Tra queste, le diete a concentrazione minima di 6PP e media di rame hanno determinato una mortalità simile a quella ottenuta con il controllo con antibiotico (ANT). L'alta mortalità registrata nel controllo negativo ANT conferma una relazione diretta tra la sopravvivenza di OLF e la consistenza delle popolazioni del simbionte, in accordo con quanto già descritto in letteratura da numerosi autori (Capuzzo *et al.*, 2005; Ghanim & Kontsedalov, 2009; Jurkevitch, 2011; Ben-Yosef *et al.*, 2014, 2015; Estes *et al.*, 2018). Ciò suggerisce inoltre una possibile attività antimicrobica di 6PP e di Cu che, confermando i risultati di precedenti lavori (Sinno *et al.*, 2020), altera anche i restanti parametri valutati, fornendo ulteriori conferme all'importante deterioramento della fitness larvale e degli adulti di *B. oleae* (Tzanakakis, 1985; Belcari & Bobbio, 1999; Sacchetti *et al.*, 2004; Belcari *et al.*, 2005a; 2005b; Rosi *et al.*, 2007; Caleca *et al.*, 2010; Tsolakis *et al.*, 2011; Gonçalves & Torres, 2012). Un'interpretazione diversa è necessaria per la elevatissima mortalità ottenuta con la dieta addizionata con metaboliti secondari di *T. saturnisporum* e *C. aleurites* dovuta al nullo o scarso consumo della dieta stessa. Questo effetto è opposto a quello rilevato in bibliografia per molecole di origine vegetale (oli essenziali di due Apiaceae e due Lamiaceae) che hanno portato a risultati complessivi simili ma senza alterazione dell'ingestione (Rizzo *et al.*, 2020).

I dati relativi al numero di ferite da ovideposizione per drupa hanno evidenziato estrema variabilità, seppure sempre in numero complessivo maggiore nella prima esposizione, con femmine neosfarfalte. Questa differenza non può essere correlata solo alla produzione di feromoni come lo (Z)-9-tricosene da parte dei maschi giovani (Carpita *et al.*, 2012) che decresce con l'invecchiamento senza alterare la fisiologia dell'insetto (Benelli *et al.*, 2013; Canale *et al.*, 2013), quanto piuttosto ad un possibile effetto di saturazione dovuto all'ambiente chiuso utilizzato per i saggi (Navarro-Llopis *et al.*, 2011) o al fisiologico aumento percentuale di punture sterili da parte di femmine meno giovani (Rizzo & Caleca, 2006).

L'attività riproduttiva di OLF viene fortemente alterata dall'ingestione di rame (Bigiotti *et al.*, 2019b; Sinno *et al.*, 2020), come confermato dai saggi svolti con dieta addizionata con Cu-5. Tale attività è stata influenzata anche dall'ingestione di diete con estratti ottenuti da *C. aleurites* a 0,5% (MET-5) e miscela di acque affumicate Rep. MIX, quest'ultima risultata anche repellente in olfattometro e in pieno campo.

Il numero maggiore di punture sterili è stato ottenuto con dieta addizionata con l'acido harzianico allo 0,5%, con effetto dose dipendente. Anche i trattamenti con tutte le diluizioni di 6PP, Cu-1 e karrikinolide hanno determinato un significativo aumento delle punture sterili. Soluzioni come questa mostrano dati simili a quelli ottenuti con le catture massali che interferiscono però su aspetti differenti (Petacchi *et al.*, 2003).

Il Karrikinolide è il trattamento che ha limitato maggiormente il simbionte batterico, sia nel bulbo esofageo sia nell'intestino (analisi molecolari). Inoltre, è stata rilevata un'attività batteriostatica dose dipendente di HA e 6PP.

La comunità scientifica ha iniziato ad investigare per identificare molecole e metaboliti secondari efficaci sugli insetti dannosi e i loro simbionti, andando oltre il classico *Bacillus thuringiensis* ed i suoi derivati, individuando complessi di tossine di origine animale, vegetale e sintetica (Naganawa *et al.*, 1976; Kanaoka *et al.*, 1979; Burnell & Stock, 2000; French-Constant & Bowen, 2000; Rajagopal & Bhatnagar, 2002; Chattopadhyay *et al.*, 2004; Fitches *et al.*, 2008; Rohlf & Churchill, 2011; Salvadori *et al.*, 2012; Chang *et al.*, 2013; Sieber *et al.*, 2015; Arora & Douglas, 2017; Luna-Ramirez *et al.*, 2017; Martinez *et al.*, 2017; Vinale *et al.*, 2017a; 2017b; Saleem *et al.*, 2018; Su *et al.*, 2018; Mathivanan *et al.*, 2019; Pietri & Liang, 2020; Matloub *et al.*, 2021) da utilizzare in strategie di controllo innovative.

Dalle analisi molecolari, stagionali e annuali, del batterio simbionte di individui selvatici e del controllo sono emersi valori medi di numerosità molto variabili. In particolare, la consistenza di "*Ca. Erwinia dacicola*" è risultata maggiore nel 2019, soprattutto nei mesi di agosto, con temperature più elevate e minore umidità relativa, e dicembre. È stato rilevato un andamento stagionale della numerosità della popolazione del simbionte, suggerendo un'influenza ambientale diretta su di esso, importante quanto quella rilevata sull'insetto ospite (Kounatidis *et al.*, 2008; Castrignanò *et al.*, 2012; Ordano *et al.*, 2015). Tale influenza ambientale si è riflessa sui risultati dei bioassaggi svolti, evidenziando come questi fattori esterni possano alterare l'efficacia batteriostatica dei trattamenti in maniera poco prevedibile.

È interessante notare come le SWs e gli estratti fungini non abbiano mostrato alcun effetto topico, neanche quando saggiati tal quali in specifiche prove, mentre è riportato che sostanze simili, quando risultano letali, lo sono già a basse concentrazioni (Yousef *et al.*, 2013; Salima *et al.*, 2016).

L'effetto repellente delle acque affumicate ottenute in diverse condizioni è correlato alla presenza di specifici composti dotati di una attività simile a quella rilevabile in *cultivar* naturalmente poco soggette all'attacco della mosca (Bononi & Tateo, 2017). I saggi hanno mostrato differenze tra i vari tipi di prodotti, con un effetto concentrazione dipendente del tutto in linea con quanto ottenuto in precedenti prove con le stesse sostanze (Bonanomi *et al.*, 2021).

Le SWs ottenute per pirolisi dalla cellulosa, CELL 300 e CELL 500 causano una forte repellenza, ma se diluite al 10% aumentano indecisione ed attrattività. Un simile sensibile andamento dose dipendente è stato rilevato anche con le SWs WOOD 500 e MAIS 500, in questo caso con effetto solo sulle femmine. Una differenza tra le risposte registrate in base al sesso, all'età ed allo stato di accoppiamento degli insetti è coerente con quanto noto riguardo il comportamento dei Tefritidi in generale e di *B. oleae* in particolare (De Cristofaro *et al.*, 2007; Martín Aluja *et al.*, 2009), che si distingue comunque per l'inversione di attrazione tra femmine e maschi rispetto agli altri Tefritidi (Benelli *et al.*, 2013).

Nella gran parte delle prove la diminuzione della concentrazione aumenta le risposte di indecisione. Quest'ultima è caratterizzata da individui fortemente indecisi che modificano continuamente la propria scelta, spostandosi da un braccio all'altro della Y, o che non operano alcuna scelta, restando ferme intente a pulirsi le diverse parti del corpo (in particolare le antenne). Nel caso delle SWs  $\alpha$  500 e  $\alpha$  300 le diluizioni incrementano la repellenza, riducendo la confusione. L'effetto fortemente repellente verso le femmine mostrato alla concentrazione 100% di Rep. MIX. è sostituito da un effetto di indecisione quando la miscela è diluita al 10%. Risulta interessante notare come la distribuzione risulti ancora simile tra i due test con Att. MIX, abbinata e non con olive nella stessa camera e quando è offerta in alternativa ad olive poste nella seconda camera.

Le SWs di sansa e la miscela Att. MIX, sono le uniche ad aver mostrato un effetto attrattivo per entrambi i sessi, anch'esso con regolazione dose dipendente diretta. L'attrattività di Att. MIX, in combinazione o meno con le olive è netta ad entrambe le concentrazioni saggiate e per entrambi i sessi, quando nell'altro ramo dell'olfattometro non viene offerto nulla di alternativo. Il 6PP dà luogo ad un importante effetto di confusione per entrambi i sessi di OLF similmente a quanto registrato con altri estratti naturali (Vitanović *et al.*, 2020). Detto comportamento è stato indotto sia con presenza contemporanea delle olive nella camera sia con il solo 6PP.

L'elettroantennogramma ha consentito di verificare le alterazioni elettrofisiologiche che descrivono le risposte ottenute con i test olfattometrici (Canale *et al.*, 2013, 2015; Sacchetti *et al.*, 2016; Giunti *et al.*, 2020). In particolare, si sono evidenziate risposte agli stimoli concentrazioni dipendenti e con risposte diverse per i due sessi di OLF, nonostante il numero di sensilli disposti su antenne e palpi mascellari siano simili, confermando quanto riscontrato in bibliografia (Liscia *et al.*, 2013b; Canale *et al.*, 2013, 2015; Sacchetti *et al.*, 2016). Risultati simili, sempre dose dipendenti, ma con olii essenziali estratti delle foglie di olivo di differenti *cultivar*, sono stati ottenuti anche a concentrazioni minori, dimostrando come le emissioni delle piante stesse si modifichino in funzione dell'intensità di attacco, risultando più o meno attrattive (Malheiro *et al.*, 2015).

L'analisi GC-MS delle acque affumicate risultano coerenti con i test olfattometrici. In particolare, la differenza minima tra le composizioni in VOCs è risultata essere quella tra l'acqua affumicata ottenuta per pirolisi a 300 °C da sansa e la miscela Att. MIX, che hanno dato luogo a risposte attrattive comparabili in olfattometro. Il 5-metil-2-furancarbossaldeide è spesso stato individuato come VOC di varie specie vegetali, dei loro estratti e dei fumi derivati dalla loro combustione (Pons *et al.*, 1991; Anastasakis *et al.*, 2011; Sung, 2013; Balasubramanian *et al.*, 2014; Oramahi *et al.*, 2020; Yin *et al.*, 2020). Questo composto è caratterizzato da un odore di arrostito-bruciato (Mahadevan & Farmer, 2006) ed è presente in alcuni estratti che hanno mostrato attività larvicida (Ramamurthy & Krishnaveni, 2014).

L'acqua affumicata ottenuta da legno a 500 °C (Wood 500), provoca la maggior repellenza, soprattutto nei confronti delle femmine, mentre quella ottenuta da erba medica a 500 °C ( $\alpha$  500) causa la maggior confusione. In particolare,  $\alpha$  500 è caratterizzata da un profilo cromatografico semplice e con pochi picchi significativi e la sua differenza dagli altri estratti è confermata anche dalla distanza mostrata nella PCA.

La presenza dell'idrochinone e del maltolo, componente della difesa chimica passiva delle *Abies balsamea* (L.) Mill. (Pinaceae) nei confronti di *Choristoneura fumiferana* (Clemens) (Lepidoptera: Tortricidae) (Williams *et al.*, 2019), potrebbe essere correlata alla più alta repellenza mostrata da CELL 300, CELL 500 e Rep. MIX.

Nel biennio di prove in pieno campo, sono state confermate le attività attrattive/repellenti di Att. MIX e Rep. MIX già mostrate nei biosaggi di laboratorio in ambiente controllato, con risultati significativamente differenti rispetto al controllo, raggiungendo valori simili a quelli ottenuti con prodotti già presenti sul mercato (Mass Trapping con pannelli collati e non, trappole McPhail, caolino, organofosfati, tecniche Attract & Kill) e ben noti per le loro attività (Broumas, 1985; Broumas *et al.*, 2002; Mazomenos *et al.*, 2002; Petacchi *et al.*, 2003; Saour & Makee, 2004; Iannotta *et al.*,

2006; Perri *et al.*, 2006; Margaritopoulos *et al.*, 2008; Noce *et al.*, 2009). La scelta delle due aziende ha permesso di comparare i risultati evidenziando eventuali effetti legati alle differenti condizioni pedoclimatiche. Le temperature ed il grado di UR hanno determinato una differente velocità di sviluppo delle popolazioni (Spanedda & Terrosi, 2004; Castrignanò *et al.*, 2012; Caleca *et al.*, 2016). Le catture di OLF nei due anni di prova presentano una variabilità limitata. Le due stagioni estivo/autunnali consecutive sono risultate molto simili in entrambi i luoghi individuati per le prove. Le temperature massime più alte sono state registrate in Molise, dove la stagione calda si è protratta fino alla seconda metà di settembre. I due siti si sono maggiormente differenziati per i dati relativi alle temperature minime notturne, sempre più basse nel sito di Pozzilli, dove si è registrata anche più frequente piovosità e conseguente umidità relativa elevata. L'efficacia dei trattamenti è più evidente con livelli alti di popolazione di OLF (Broumas *et al.*, 2002). L'effetto repellente della miscela Rep. MIX è risultato del tutto simile a quello dovuto ai trattamenti sopra chioma con caolino (Caleca & Rizzo, 2007) e con miristato, già identificato come VOC di origine vegetale fortemente attivo sulla mosca (Rotundo *et al.*, 2001). Anche la capacità attrattiva della miscela Att. MIX è paragonabile all'attrattività delle trappole cromotropiche e YT + attr. (Montiel Bueno & Jones, 2002b; Tan *et al.*, 2014), con catture addirittura maggiori per entrambi i siti. Risulta interessante notare come l'attrattività delle SW sia però causata esclusivamente da molecole derivate dalla pianta ospite, quindi di origine vegetale, e non presenti nelle interazioni sessuali tra maschi e femmine (Canale *et al.*, 2015, 2016). La donnosità effettiva causata alla produzione ha visto, nelle prove con Rep. MIX, un basso numero di punture in media per drupa. La distribuzione delle punture/ drupe indica una riduzione drastica e significativa dell'attività di *B. oleae* in pieno campo, paragonabile a quella ottenuta con caolino e rame in altri lavori (Pascual *et al.*, 2010; Reza Abbasi Mojdehi *et al.*, 2021).

La benefica attività di “*Ca. Erwinia dacicola*” è esercitata con il recupero di fonti proteiche e aminoacidiche a seguito della neutralizzazione dei composti vegetali difensivi presenti nella drupa (Boush & Matsumura, 1967; Lauzon *et al.*, 2003). Il simbionte inoltre è in grado di scindere i complessi oleuropeina-proteine, con rilascio di polimeri che si legano ai polifenoli, e di produrre enzimi che li degradano (Dowd, 1992; Smith *et al.*, 2005). La prossimità filogenetica di “*Ca. Erwinia dacicola*” con *Erwinia* non obbligate, potrebbe suggerire una capacità del batterio di utilizzare enzimi extracellulari (Barras *et al.*, 1984; Mazzon *et al.*, 2008), e supportare l'ipotesi che anche “*Ca. Erwinia dacicola*” utilizzi enzimi specifici (Ben-Yosef *et al.*, 2015). Rimane comunque valida l'ipotesi secondo cui la larva potrebbe usare il simbionte stesso come fonte di cibo bilanciata e soprattutto stabilmente disponibile (Petri, 1909; Lemos & Terra, 1991; Prokopy *et al.*, 2000; Ben-Yosef *et al.*, 2015). Con prove di proteomica proteomica e trascrittomica è stato possibile osservare che, quando allevate su olive non mature, le larve di OLF e gli endosimbionti sovraesprimono i geni coinvolti

nella detossificazione degli enzimi e nella secrezione di un inibitore dell'oleuropeina (Pavlidis *et al.*, 2017). Inoltre, *B. oleae* assume diete diverse negli stadi preimaginali, monofagi con alimentazione esclusiva a carico del mesocarpo delle drupe, e da adulti, glicifagi e saprofagi su deiezioni principalmente di uccelli (Bateman, 1972; Fletcher, 1987; Drew & Yuval, 1999). In particolare, la dieta degli adulti è ricca di carboidrati, con limitate quantità di aminoacidi essenziali (Wäckers, 2005; Douglas, 2006; Lundgren, 2009). Questi ultimi sono necessari per la maturazione delle gonadi e per la produzione delle uova (Tsiropoulos, 1980, 1983, 1984). La presenza di *Ca. Erwinia dacicola* nel bulbo esofageo e la presenza del biofilm batterico all'interno dell'intestino sopperiscono alle carenze nutritive (Drew & Lloyd, 1991; Lemos & Terra, 1991; Drew & Yuval, 1999; Davey & O'toole, 2000; Estes *et al.*, 2009; Ben-Yosef *et al.*, 2015). In studi recenti, è stato definito il ruolo del microbiota presente nell'intestino di OLF. Le mosche non riescono di fatto a sfruttare gli aminoacidi non essenziali a meno che non sia presente una consistente popolazione di simbionte. In diversi studi, sono stati isolati batteri simbiotici in diverse specie di Tefritidi con attività enzimatiche a carico dell'acido urico e dell'urea presente nell'intestino degli ospiti (Hellmuth, 1956; Lauzon *et al.*, 2000; Robacker & Lauzon, 2002). In *B. oleae*, l'attività del batterio è sostanzialmente simile determinando la sintesi proteica per azione di ureasi di origine batterica (Ben-Yosef *et al.*, 2010, 2014).

Si può concludere che i dati ottenuti in laboratorio e in pieno campo, relativi all'utilizzo di sostanze naturali di varia origine, quali metaboliti fungini e acque affumicate, suggeriscono la possibilità di un loro impiego per il controllo diretto e indiretto di *B. oleae*. Ulteriori studi possono essere utili per consentire lo sviluppo tecnologico ed applicativo di questi principi attivi e delle loro strategie e tecniche d'uso, in conformità con le indicazioni e i suggerimenti di *Integrated Pest Management* (Noce *et al.*, 2014; Sergeeva, 2014).

### Ringraziamento partner

Si ringrazia l'azienda collaboratrice Olio Carcillo di Nicandro Carcillo, sita in Pozzilli IS e l'azienda I.L.CO.A. di Luigi Lorenzano, sita in Crotone, e partner del progetto MIUR nell'ambito della borsa di dottorato aggiuntiva del Programma Operativo Nazionale Ricerca e Innovazione 2014-2020 (CCI 2014IT16M2OP005), Fondo Sociale Europeo, Azione I.1 "Dottorati Innovativi con caratterizzazione Industriale", Codice Borsa: DOT178289 – Borsa 3.

## Indice delle figure

<i>Figura 1:</i> Struttura dell'acido harzianico (HA).	19
<i>Figura 2:</i> Manicotti protettivi su branche di olivo per preservare per il maggior tempo possibile le olive da attacchi di <i>B. oleae</i> e manicotto aperto con olive ancora verdi e fresche (a dicembre 2019).	23
<i>Figura 3:</i> colonie di <i>Trichoderma harzianum</i> in fase di sviluppo su medium solido e liquido.	24
<i>Figura 4:</i> Distillazione al Rotavapor durante il processo di estrazione di metaboliti secondari da colonie fungine.	25
<i>Figura 5:</i> Ultimi passaggi dell'estrazione di acido harzianico da colture fungine e materiale puro ottenuto (cristalli).	25
<i>Figura 6:</i> Cromatografia su Strato Sottile (Thin Layer Chromatography - TLC) a fase inversa delle sostanze estratte con lamina sottile (Alluminio + C18) ed un eluente composto da Metanolo (CH <sub>3</sub> OH), Acetonitrile (CH <sub>3</sub> CN) ed acqua sterile in rapporto 3:4:3 in una camera cilindrica di vetro chiusa.	26
<i>Figura 7:</i> Primo passaggio del biosaggio di ingestione con i sessi separati (A), olive verdi esposte per il secondo passaggio (B) e femmina di <i>B. oleae</i> ovideponente durante quest'ultimo (C).	27
<i>Figura 8:</i> Bande di 90 bp su gel post-corsa elettroforetica, ottenute in seguito a clonaggio della pozione di 16s dell'rDNA di " <i>Ca. Erwinia dacicola</i> " in vettori di <i>E. coli</i> .	30
<i>Figura 9:</i> disposizione cluster per prove, sul sito di Crotone, per l'anno di prove 2020. CAO (●) = Caolino irrorato su chioma; MIRI (●) = Isopropyl-Myristato, 15 ml per dispenser; Att. MIX (●) = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da sansa a 300 e 500 °C, 15 ml per dispenser; Rep. MIX (●) = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da cellulose, legno, mais e erba medica a 300 e 500 °C, 15 ml per dispenser; YT + attr. (●) = Controllo (Yellow Trap), pannello con esche; YT (●) = Controllo (Yellow Trap), solo pannello non caricato; ✱posizione trappole.	37
<i>Figura 10:</i> disposizione cluster per prove, sul sito di Pozzilli, per l'anno di prove 2020. CAO (●) = Caolino irrorato su chioma; MIRI (●) = Isopropyl-Myristato, 15 ml per dispenser; Att. MIX (●) = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da sansa a 300 e 500 °C, 15 ml per dispenser; Rep. MIX (●) = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da cellulose, legno, mais e erba medica a 300 e 500 °C, 15 ml per dispenser; YT + attr. (●) = Controllo (Yellow Trap), pannello con esche; YT (●) = Controllo (Yellow Trap), solo pannello non caricato; ✱posizione trappole.	37
<i>Figura 11:</i> Cromatogrammi delle analisi GC-MS delle miscele di SWs Att. MIX (A) e Rep. MIX (B) svolte presso la School of Molecular Sciences dell'University of Western Australia, in Crawley (Perth – WA) dal Prof Gavin Flematti.	53

## Indice delle tabelle

Tabella 1: Tassonomia di <i>Bactrocera oleae</i> .	2
Tabella 2: Batteri associati ai Tefritidi di importanza economica (Sacchetti, 2003).	10
Tabella 3: Classificazione dei Bulbi Esofagei (BE) nei Tefritidi proposta da Girolami (1973).	10
Tabella 4: Elenco dei trattamenti utilizzati durante i biosaggi, loro codici identificativi e quantità per unità di dieta.	27
Tabella 5: composizione singolo pozzetto per analisi Real-Time qPCR della porzione 16S dell'rDNA clonato. in <i>E. coli</i> di " <i>Ca. Erwinia dacicola</i> ".	30
Tabella 6: Elenco dei trattamenti, loro codici indentificativi e concentrazioni.	34
Tabella 7: Prove di campo svolte nel biennio 2019-2020, codici identificativi per ogni prova e quantità utilizzate	38
Tabella 8: Rapporto femmina (♀):maschio (♂) tra gli adulti dell'F1 di <i>B. oleae</i> sfarfallati a seguito delle prove di ingestione. CONT = Controllo; ANT = Controllo negativo; HA-5 = Acido Harzianico 0,5%; HA-1 = Acido Harzianico 0,1%; HA-2 = Acido Harzianico 0,02%; 6PP-5 = 6-pentyl- $\alpha$ -pirone 0,5%; 6PP-1 = 6-pentyl- $\alpha$ -pirone 0,1%; 6PP-2 = 6-pentyl- $\alpha$ -pirone 0,02%; Cu-5 = Ossicloruro di Rame 0,5%; Cu-1 = Ossicloruro di Rame 0,1%; Cu-2 = Ossicloruro di Rame 0,02%; MET-5 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di <i>Coniothyrium aleurites</i> 0,5%; MET-1 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di <i>Coniothyrium aleurites</i> 0,1%; MET-2 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di <i>Coniothyrium aleurites</i> 0,02%; TRI-5 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di <i>Trichoderma saturnisporum</i> 0,5%; TRI-1 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di <i>Trichoderma saturnisporum</i> 0,1%; TRI-2 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di <i>Trichoderma saturnisporum</i> 0,02%; K = Karrikinolide 0,0001%; Rep. MIX = 150 $\mu$ l di miscela di Acque Affumicate ottenute da cellulosa, legno, mais ed erba medica, a 300 e 500 °C ; Att. MIX = 150 $\mu$ l di miscela di Acque Affumicate ottenute da sansa di olive a 300 e 500 °C.	42
Tabella 9: Numero di olive, numero di individui che hanno raggiunto l'età adulta maschi (♂) e femmine (♀) e che sono morti allo stadio preimaginale (Pupari) e valori totali, per ogni trattamento ed esposizione. Repliche: ● prima, ● seconda, ● terza, ● quarta, ● quinta, ● sesta, ● settima ed ● ottava. CONT = Controllo; ANT = Controllo negativo; HA-5 = Acido Harzianico 0,5%; HA-1 = Acido Harzianico 0,1%; HA-2 = Acido Harzianico 0,02%; 6PP-5 = 6-pentyl- $\alpha$ -pirone 0,5%; 6PP-1 = 6-pentyl- $\alpha$ -pirone 0,1%; 6PP-2 = 6-pentyl- $\alpha$ -pirone 0,02%; Cu-5 = Ossicloruro di Rame 0,5%; Cu-1 = Ossicloruro di Rame 0,1%; Cu-2 = Ossicloruro di Rame 0,02%; MET-5 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di <i>Coniothyrium aleurites</i> 0,5%; MET-1 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di <i>Coniothyrium aleurites</i> 0,1%; MET-2 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di <i>Coniothyrium aleurites</i> 0,02%; TRI-5 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di <i>Trichoderma saturnisporum</i> 0,5%; TRI-1 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di <i>Trichoderma saturnisporum</i> 0,1%; TRI-2 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di <i>Trichoderma saturnisporum</i> 0,02%; K = Karrikinolide 0,0001%; Rep. MIX = 150 $\mu$ l di miscela di Acque Affumicate ottenute da cellulosa, legno, mais ed erba medica, a 300 e 500 °C ; Att. MIX = 150 $\mu$ l di miscela di Acque Affumicate ottenute da sansa di olive a 300 e 500 °C.	43
Tabella 10: Quantitativo di copie di " <i>Ca. Erwinia dacicola</i> " nei bulbi esofagei (BULBI, ●) e negli intestini (ADDOMI, ●) di <i>B. oleae</i> dopo i biosaggi di ingestione, rilevate mediante Real-Time qPCR. CONT = Controllo; ANT = Controllo negativo; HA-5 = Acido Harzianico 0,5%; HA-1 = Acido Harzianico 0,1%; HA-2 = Acido Harzianico 0,02%; 6PP-5 = 6-pentyl- $\alpha$ -pirone 0,5%; 6PP-1 = 6-pentyl- $\alpha$ -pirone 0,1%; 6PP-2 = 6-pentyl- $\alpha$ -pirone 0,02%; Cu-5 = Ossicloruro di Rame 0,5%; Cu-1 = Ossicloruro di Rame 0,1%; Cu-2 = Ossicloruro di Rame 0,02%; MET-5 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di <i>Coniothyrium aleurites</i> 0,5%; MET-1 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di <i>Coniothyrium aleurites</i> 0,1%; MET-2 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di <i>Coniothyrium aleurites</i> 0,02%; TRI-5 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di <i>Trichoderma saturnisporum</i> 0,5%; TRI-1 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di <i>Trichoderma saturnisporum</i> 0,1%; TRI-2 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di <i>Trichoderma saturnisporum</i> 0,02%; K = Karrikinolide 0,0001%; Rep. MIX = 150 $\mu$ l di miscela di Acque Affumicate ottenute da cellulosa, legno, mais ed erba medica, a 300 e 500 °C ; Att. MIX = 150 $\mu$ l di miscela di Acque Affumicate ottenute da sansa di olive a 300 e 500 °C.	45
Tabella 11: Differenze significative per le catture medie di <i>B. oleae</i> rilevate a Crotone (KR) e a Pozzilli (IS) durante il biennio 2019-2020. CAO (●) = Caolino irrorato su chioma; MIRI (●) = Isopropyl-Myristato, 15 ml per dispenser; Rep. MIX (●) = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da cellulose, legno, mais e erba medica a 300 e 500 °C, 15 ml per dispenser; Att. MIX (●) = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da sansa a 300 e 500 °C, 15 ml per dispenser; YT (●) = Controllo (Yellow Trap), solo pannello non caricato; YT + attr. (●) = Controllo (Yellow Trap), pannello con esche. Trattamenti con le stesse lettere non mostrano differenze significative (Test ANOVA, Post-hoc di Student-Newman-Keuls all'interno dei gruppi).	58

*Tabella 12:* Percentuali di ferite di ovideposizione (%) e differenze significative tra punture sterili ed attive a Crotone (**KR**) e a Pozzilli (**IS**). CAO (●) = Caolino irrorato su chioma; MIRI (●) = Isopropyl-Myristato, 15 ml per dispenser; Rep. MIX (●) = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da cellulose, legno, mais e erba medica a 300 e 500 °C, 15 ml per dispenser; Att. MIX (●) = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da sansa a 300 e 500 °C, 15 ml per dispenser; YT (●) = Controllo (Yellow Trap), solo pannello non caricato; YT + attr. (●) = Controllo (Yellow Trap), pannello con esche. Trattamenti con le stesse lettere non mostrano differenze significative (Test ANOVA, Post-hoc di Student-Newman-Keuls all'interno dei gruppi). \_\_\_\_\_ **60**

## Indice dei grafici

**Grafico 1:** Asse Y1 (●) = Consumo di dieta medio per individuo (mg/esemplare) registrato dopo 14 giorni di trattamento. Asse Y2 (●) = Mortalità % registrata dopo 14 giorni di trattamento. CONT = Controllo; ANT = Controllo negativo; HA-5 = Acido Harzianico 0,5%; HA-1 = Acido Harzianico 0,1%; HA-2 = Acido Harzianico 0,02%; 6PP-5 = 6-pentyl- $\alpha$ -pirone 0,5%; 6PP-1 = 6-pentyl- $\alpha$ -pirone 0,1%; 6PP-2 = 6-pentyl- $\alpha$ -pirone 0,02%; Cu-5 = Ossicloruro di Rame 0,5%; Cu-1 = Ossicloruro di Rame 0,1%; Cu-2 = Ossicloruro di Rame 0,02%; MET-5 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Coniothyrium aleurites* 0,5%; MET-1 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Coniothyrium aleurites* 0,1%; MET-2 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Coniothyrium aleurites* 0,02%; TRI-5 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Trichoderma saturnisporum* 0,5%; TRI-1 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Trichoderma saturnisporum* 0,1%; TRI-2 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Trichoderma saturnisporum* 0,02%; K = Karrikinolide 0,0001%; Rep. MIX = 150  $\mu$ l di miscela di Acque Affumicate ottenute da cellulosa, legno, mais ed erba medica, a 300 e 500 °C ; Att. MIX = 150  $\mu$ l di miscela di Acque Affumicate ottenute da sansa di olive a 300 e 500 °C. Trattamenti con le stesse lettere non mostrano differenze significative (Test ANOVA, Post-hoc di Student-Newman-Keuls). \_\_\_\_\_ **39**

**Grafico 2:** Numero di punture di ovideposizione di *B. oleae* rinvenute a seguito dei biosaggi di ingestione: i) Sterili (●), senza ovideposizione; ii) Uova (●), con ovideposizione. CONT = Controllo; ANT = Controllo negativo; HA-5 = Acido Harzianico 0,5%; HA-1 = Acido Harzianico 0,1%; HA-2 = Acido Harzianico 0,02%; 6PP-5 = 6-pentyl- $\alpha$ -pirone 0,5%; 6PP-1 = 6-pentyl- $\alpha$ -pirone 0,1%; 6PP-2 = 6-pentyl- $\alpha$ -pirone 0,02%; Cu-5 = Ossicloruro di Rame 0,5%; Cu-1 = Ossicloruro di Rame 0,1%; Cu-2 = Ossicloruro di Rame 0,02%; MET-5 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Coniothyrium aleurites* 0,5%; MET-1 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Coniothyrium aleurites* 0,1%; MET-2 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Coniothyrium aleurites* 0,02%; TRI-5 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Trichoderma saturnisporum* 0,5%; TRI-1 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Trichoderma saturnisporum* 0,1%; TRI-2 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Trichoderma saturnisporum* 0,02%; K = Karrikinolide 0,0001%; Rep. MIX = 150  $\mu$ l di miscela di Acque Affumicate ottenute da cellulosa, legno, mais ed erba medica, a 300 e 500 °C ; Att. MIX = 150  $\mu$ l di miscela di Acque Affumicate ottenute da sansa di olive a 300 e 500 °C. Trattamenti con le stesse lettere non mostrano differenze significative (Test ANOVA, Post-hoc di Student-Newman-Keuls all'interno dei gruppi). \_\_\_\_\_ **40**

**Grafico 3:** Numero di esemplari rinvenuti nell'F1 di *B. oleae* a seguito dei biosaggi di ingestione: i) Adulti (●), adulti sfarfallati; ii) Pupari (●), individui morti allo stadio di pupa. CONT = Controllo; ANT = Controllo negativo; HA-5 = Acido Harzianico 0,5%; HA-1 = Acido Harzianico 0,1%; HA-2 = Acido Harzianico 0,02%; 6PP-5 = 6-pentyl- $\alpha$ -pirone 0,5%; 6PP-1 = 6-pentyl- $\alpha$ -pirone 0,1%; 6PP-2 = 6-pentyl- $\alpha$ -pirone 0,02%; Cu-5 = Ossicloruro di Rame 0,5%; Cu-1 = Ossicloruro di Rame 0,1%; Cu-2 = Ossicloruro di Rame 0,02%; MET-5 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Coniothyrium aleurites* 0,5%; MET-1 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Coniothyrium aleurites* 0,1%; MET-2 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Coniothyrium aleurites* 0,02%; TRI-5 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Trichoderma saturnisporum* 0,5%; TRI-1 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Trichoderma saturnisporum* 0,1%; TRI-2 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Trichoderma saturnisporum* 0,02%; K = Karrikinolide 0,0001%; Rep. MIX = 150  $\mu$ l di miscela di Acque Affumicate ottenute da cellulosa, legno, mais ed erba medica, a 300 e 500 °C ; Att. MIX = 150  $\mu$ l di miscela di Acque Affumicate ottenute da sansa di olive a 300 e 500 °C. Trattamenti con le stesse lettere non mostrano differenze significative (Test ANOVA, Post-hoc di Student-Newman-Keuls all'interno dei gruppi). \_\_\_\_\_ **42**

**Grafico 4:** Numero di copie di "*Ca. Erwinia dacicola*" rinvenute mediante Real-Time qPCR nei bulbi esofagei (BULBI, ●) e negli intestini (ADDOMI, ●) di *B. oleae* a seguito dei biosaggi di ingestione. CONT = Controllo; ANT = Controllo negativo; HA-5 = Acido Harzianico 0,5%; HA-1 = Acido Harzianico 0,1%; HA-2 = Acido Harzianico 0,02%; 6PP-5 = 6-pentyl- $\alpha$ -pirone 0,5%; 6PP-1 = 6-pentyl- $\alpha$ -pirone 0,1%; 6PP-2 = 6-pentyl- $\alpha$ -pirone 0,02%; Cu-5 = Ossicloruro di Rame 0,5%; Cu-1 = Ossicloruro di Rame 0,1%; Cu-2 = Ossicloruro di Rame 0,02%; MET-5 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Coniothyrium aleurites* 0,5%; MET-1 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Coniothyrium aleurites* 0,1%; MET-2 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Coniothyrium aleurites* 0,02%; TRI-5 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Trichoderma saturnisporum* 0,5%; TRI-1 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Trichoderma saturnisporum* 0,1%; TRI-2 = Blend di metaboliti secondari estratti da colonie di *Trichoderma saturnisporum* 0,02%; K = Karrikinolide 0,0001%; Rep. MIX = 150  $\mu$ l di miscela di Acque Affumicate ottenute da cellulosa, legno, mais ed erba medica, a 300 e 500 °C ; Att. MIX = 150  $\mu$ l di miscela di Acque Affumicate ottenute da sansa di olive a 300 e 500 °C. \_\_\_\_\_ **44**

- Grafico 5:** Grafico in alto: Temperature massime (● = TMAX °C), medie (● = TMED °C) e minime (● = TMIN °C) ed Umidità (● = UMIDITÀ %) registrate tra agosto (AGO) e dicembre (DIC) nel biennio 2018-2019 a Portici (NA). Grafico in basso: quantitativo di “*Ca. Erwinia dacicola*” in bulbi esofagei di adulti selvatici di *B. oleae* neosfarfallati da agosto (AGO) a dicembre (DIC), nel biennio 2018-2019 a Portici (NA). \_\_\_\_\_ **46**
- Grafico 6:** Dati di mortalità (%) di adulti maschi (♂) e femmine (♀) *B. oleae* nel biosaggio con applicazioni topiche di singole gocce di 1 µl o 0,5 µl sul torace. Cont. = Goccia di acqua distillata; Rep. MIX = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da cellulose, legno, mais e erba medica a 300 e 500 °C; Att. MIX = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da sansa a 300 e 500 °C. \_\_\_\_\_ **47**
- Grafico 7:** Distribuzione (%) delle risposte tra Attrattività (●), Repellenza (●) e Indecisione (●) di adulti maschi (♂) e femmine (♀) di *B. oleae* in saggio olfattometrico. ARIA vs ARIA = controllo con entrambe le camere laterali vuote; ARIA vs OLIVE = controllo con 12 olive, attrattive, offerte in contrapposizione ad aria pura; 6PP 10<sup>-3</sup> + OLIVE vs ARIA = 6-pentyl- $\alpha$ -pirone a concentrazione 10<sup>-3</sup> offerto in combinazione con 12 olive, attrattive, e in contrapposizione ad aria pura; 6PP 10<sup>-2</sup> + OLIVE vs ARIA = 6-pentyl- $\alpha$ -pirone a concentrazione 10<sup>-2</sup> in combinazione con 12 olive, attrattive, e offerto in contrapposizione ad aria pura; 6PP 10<sup>-1</sup> + OLIVE vs ARIA = 6-pentyl- $\alpha$ -pirone a concentrazione 10<sup>-1</sup> offerto in combinazione con 12 olive, attrattive, e in contrapposizione ad aria pura; 6PP 10<sup>-1</sup> vs ARIA = 6-pentyl- $\alpha$ -pirone a concentrazione 10<sup>-1</sup> offerto solo e in contrapposizione ad aria pura. Test  $\chi^2$  utilizzando quanto registrato nel controllo come risultati attesi. \* = differenza significativa (p value <0,005). \_\_\_\_\_ **48**
- Grafico 8:** Distribuzione (%) delle risposte tra Attrattività (●), Repellenza (●) e Indecisione (●) di adulti maschi (♂) e femmine (♀) di *B. oleae* in saggio olfattometrico con differenti SWs a concentrazione 10% (grafico in alto) e 100% (grafico in basso). ARIA vs ARIA = controllo con entrambe le camere laterali vuote; ARIA vs OLIVE = controllo con 12 olive, attrattive, offerte in contrapposizione ad aria pura; CELL 500 + OLIVE vs ARIA = Smoke Water ottenuta da cellulosa a 500 °C offerta in combinazione con 12 olive, attrattive, e in contrapposizione ad aria pura; CELL 300 + OLIVE vs ARIA = Smoke Water ottenuta da cellulosa a 300 °C offerta in combinazione con 12 olive, attrattive, e in contrapposizione ad aria pura; WOOD 500 + OLIVE vs ARIA = Smoke Water ottenuta da legno a 500 °C offerta in combinazione con 12 olive, attrattive, e in contrapposizione ad aria pura; WOOD 300 + OLIVE vs ARIA = Smoke Water ottenuta da legno a 300 °C offerta in combinazione con 12 olive, attrattive, e in contrapposizione ad aria pura; MAIS 500 + OLIVE vs ARIA = Smoke Water ottenuta da mais a 500 °C offerta in combinazione con 12 olive, attrattive, e in contrapposizione ad aria pura; MAIS 300 + OLIVE vs ARIA = Smoke Water ottenuta da mais a 300 °C offerta in combinazione con 12 olive, attrattive, e in contrapposizione ad aria pura;  $\alpha\alpha$  500 + OLIVE vs ARIA = Smoke Water ottenuta da erba medica a 500 °C offerta in combinazione con 12 olive, attrattive, e in contrapposizione ad aria pura;  $\alpha\alpha$  300 + OLIVE vs ARIA = Smoke Water ottenuta da erba medica a 300 °C offerta in combinazione con 12 olive, attrattive, e in contrapposizione ad aria pura; Olive Waste 500 + OLIVE vs ARIA = Smoke Water ottenuta da sansa a 500 °C offerta in combinazione con 12 olive, attrattive, e in contrapposizione ad aria pura; Olive Waste 300 + OLIVE vs ARIA = Smoke Water ottenuta da sansa a 300 °C offerta in combinazione con 12 olive, attrattive, e in contrapposizione ad aria pura. Test  $\chi^2$  utilizzando quanto registrato nel controllo come risultati attesi ed indicato in funzione del controllo ARIA vs ARIA e ARIA vs OLIVE. \* = differenza significativa (p value < 0,005); \*\* = differenza significativa (p value <0,01); \*\*\* = differenza significativa (p value <0,05); + = differenza non significativa. \_\_\_\_\_ **49**
- Grafico 9:** Distribuzione (%) delle risposte tra Attrattività (●), Repellenza (●) e Indecisione (●) di adulti maschi (♂) e femmine (♀) di *B. oleae* in saggio olfattometrico con due SWs a concentrazione 10% (grafico in alto) e 100% (grafico in basso). ARIA vs ARIA = controllo con entrambe le camere laterali vuote; OLIVE vs OLIVE = controllo con entrambe le camere riempite con 12 olive, attrattive; ARIA vs OLIVE = controllo con 12 olive, attrattive, offerte in contrapposizione ad aria pura; Rep. MIX + OLIVE vs ARIA = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da cellulose, legno, mais e erba medica a 300 e 500 °C offerta in combinazione con 12 olive, attrattive, e in contrapposizione ad aria pura; Att. MIX vs ARIA = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da sansa a 300 e 500 °C offerta sola ed in contrapposizione ad aria pura; Att. MIX vs OLIVE = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da sansa a 300 e 500 °C offerta sola ed in contrapposizione a 12 olive, attrattive; Att. MIX + OLIVE vs OLIVE = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da sansa a 300 e 500 °C offerta in combinazione con 12 olive, attrattive, e in contrapposizione a 12 olive, attrattive; Att. MIX + OLIVE vs ARIA = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da sansa a 300 e 500 °C offerta in combinazione con 12 olive, attrattive, e in contrapposizione ad aria pura. Test  $\chi^2$  utilizzando quanto registrato nel controllo come risultati attesi ed indicato in funzione del controllo ARIA vs ARIA, OLIVE vs OLIVE e ARIA vs OLIVE. \* = differenza significativa (p value < 0,005); \*\* = differenza significativa (p value <0,05); + = differenza non significativa. \_\_\_\_\_ **50**
- Grafico 10:** Risposta media EAG (mV) registrata su adulti femmine (●) e maschi (●) di *B. oleae* di due settimane a stimoli di 5 µl, 10 µl e 15 µl.  $\alpha\alpha$  300 = Smoke Water ottenuta da erba medica a 300 °C;  $\alpha\alpha$  500 = Smoke Water ottenuta da erba medica a 500 °C; WOOD 300 = Smoke Water ottenuta da legno a 300 °C; WOOD 500 = Smoke

Water ottenuta da legno a 500 °C; MAIS 300 = Smoke Water ottenuta da mais a 300 °C; MAIS 500 = Smoke Water ottenuta da mais a 500 °C; CELL 300 = Smoke Water ottenuta da cellulosa a 300 °C; CELL 500 = Smoke Water ottenuta da cellulosa a 500 °C; Olive Waste 300 = Smoke Water ottenuta da sansa a 300 °C; Olive Waste 500 = Smoke Water ottenuta da sansa a 500 °C. Trattamenti con le stesse lettere non mostrano differenze significative (Test ANOVA, Post-hoc di Student-Newman-Keuls all'interno dei gruppi). \_\_\_\_\_ **51**

*Grafico 11:* A: Heatmap e dendogramma del clustering con distanza euclidea e metodo Ward delle principali molecole identificate (SI>90%) in GC-MS nelle SWs e in due miscele. Cluster raggruppati in base alla prossimità. Le caselle bianche indicano l'assenza della molecola.  $\alpha\alpha$  300 = Smoke Water ottenuta da erba medica a 300 °C;  $\alpha\alpha$  500 = Smoke Water ottenuta da erba medica a 500 °C; WOOD 300 = Smoke Water ottenuta da legno a 300 °C; WOOD 500 = Smoke Water ottenuta da legno a 500 °C; MAIS 300 = Smoke Water ottenuta da mais a 300 °C; MAIS 500 = Smoke Water ottenuta da mais a 500 °C; CELL 300 = Smoke Water ottenuta da cellulosa a 300 °C; CELL 500 = Smoke Water ottenuta da cellulosa a 500 °C; Olive Waste 300 = Smoke Water ottenuta da sansa a 300 °C; Olive Waste 500 = Smoke Water ottenuta da sansa a 500 °C; Rep. MIX = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da cellulose, legno, mais e erba medica a 300 e 500 °C; Att. MIX = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da sansa a 300 e 500 °C. B: molecole differenziali. \_\_\_\_\_ **522**

*Grafico 12:* Analisi PCA delle SW e nelle due miscele analizzate in GC-MS.  $\alpha\alpha$  300 = Smoke Water ottenuta da erba medica a 300 °C;  $\alpha\alpha$  500 = Smoke Water ottenuta da erba medica a 500 °C; WOOD 300 = Smoke Water ottenuta da legno a 300 °C; WOOD 500 = Smoke Water ottenuta da legno a 500 °C; MAIS 300 = Smoke Water ottenuta da mais a 300 °C; MAIS 500 = Smoke Water ottenuta da mais a 500 °C; CELL 300 = Smoke Water ottenuta da cellulosa a 300 °C; CELL 500 = Smoke Water ottenuta da cellulosa a 500 °C; Olive Waste 300 = Smoke Water ottenuta da sansa a 300 °C; Olive Waste 500 = Smoke Water ottenuta da sansa a 500 °C; Rep. MIX = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da cellulose, legno, mais e erba medica a 300 e 500 °C; Att. MIX = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da sansa a 300 e 500 °C. \_\_\_\_\_ **54**

*Grafico 13:* A: Heatmap e dendogramma del clustering con distanza euclidea e metodo Ward delle principali molecole identificate (SI>90%) in GC-MS nelle SWs e in due miscele, dopo reazione con Tetrametil silano (TMS). Cluster raggruppati in base alla prossimità. Le caselle bianche indicano l'assenza della molecola.  $\alpha\alpha$  300\_TMS = Smoke Water ottenuta da erba medica a 300 °C dopo reazione con TMS;  $\alpha\alpha$  500\_TMS = Smoke Water ottenuta da erba medica a 500 °C dopo reazione con TMS; WOOD 300\_TMS = Smoke Water ottenuta da legno a 300 °C dopo reazione con TMS; WOOD 500\_TMS = Smoke Water ottenuta da legno a 500 °C dopo reazione con TMS; MAIS 300\_TMS = Smoke Water ottenuta da mais a 300 °C dopo reazione con TMS; MAIS 500\_TMS = Smoke Water ottenuta da mais a 500 °C dopo reazione con TMS; CELL 300\_TMS = Smoke Water ottenuta da cellulosa a 300 °C dopo reazione con TMS; CELL 500\_TMS = Smoke Water ottenuta da cellulosa a 500 °C dopo reazione con TMS; Olive Waste 300\_TMS = Smoke Water ottenuta da sansa a 300 °C dopo reazione con TMS; Olive Waste 500\_TMS = Smoke Water ottenuta da sansa a 500 °C dopo reazione con TMS; Rep. MIX\_TMS = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da cellulose, legno, mais e erba medica a 300 e 500 °C dopo reazione con TMS; Att. MIX\_TMS = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da sansa a 300 e 500 °C dopo reazione con TMS. B: molecole differenziali. \_\_\_\_\_ **55**

*Grafico 14:* Analisi PCA delle SW e nelle due miscele analizzate in GC-MS dopo reazione con Tetrametil silano (TMS).  $\alpha\alpha$  300\_TMS = Smoke Water ottenuta da erba medica a 300 °C dopo reazione con TMS;  $\alpha\alpha$  500\_TMS = Smoke Water ottenuta da erba medica a 500 °C dopo reazione con TMS; WOOD 300\_TMS = Smoke Water ottenuta da legno a 300 °C dopo reazione con TMS; WOOD 500\_TMS = Smoke Water ottenuta da legno a 500 °C dopo reazione con TMS; MAIS 300\_TMS = Smoke Water ottenuta da mais a 300 °C dopo reazione con TMS; MAIS 500\_TMS = Smoke Water ottenuta da mais a 500 °C dopo reazione con TMS; CELL 300\_TMS = Smoke Water ottenuta da cellulosa a 300 °C dopo reazione con TMS; CELL 500\_TMS = Smoke Water ottenuta da cellulosa a 500 °C dopo reazione con TMS; Olive Waste 300\_TMS = Smoke Water ottenuta da sansa a 300 °C dopo reazione con TMS; Olive Waste 500\_TMS = Smoke Water ottenuta da sansa a 500 °C dopo reazione con TMS; Rep. MIX\_TMS = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da cellulose, legno, mais e erba medica a 300 e 500 °C dopo reazione con TMS; Att. MIX\_TMS = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da sansa a 300 e 500 °C dopo reazione con TMS. \_\_\_\_\_ **56**

*Grafico 15:* Catture medie e deviazione standard di *B. oleae* rilevate nel sito di Crotone (KR) nel biennio 2019-2020 e andamento medio delle temperature minime (● = tmin), medie (● = tmed) e massime (● = tmax) nello stesso periodo. CAO (●) = Caolino irrorato su chioma; MIRI (●) = Isopropyl-Myristato, 15 ml per dispenser; Rep. MIX (●) = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da cellulose, legno, mais e erba medica a 300 e 500 °C, 15 ml per dispenser; Att. MIX (●) = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da sansa a 300 e 500 °C, 15 ml per dispenser; YT (●) = Controllo (Yellow Trap), pannello con esche. \_\_\_\_\_ **58**

*Grafico 16:* Catture medie e deviazione standard di *B. oleae* rilevate nel sito di Pozzilli (IS) nel biennio 2019-2020 e andamento medio delle temperature minime (● = tmin), medie (● = tmed) e massime (● = tmax) nello stesso

periodo. CAO (●) = Caolino irrorato su chioma; MIRI (●) = Isopropyl-Myristato, 15 ml per dispenser; Rep. MIX (●) = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da cellulose, legno, mais e erba medica a 300 e 500 °C, 15 ml per dispenser; Att. MIX (●) = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da sansa a 300 e 500 °C, 15 ml per dispenser; YT (●) = Controllo (Yellow Trap), pannello con esche. \_\_\_\_\_ **59**

*Grafico 17:* Numero medio di ferite di ovideposizione senza (◐) e con (●) deposizione di uova di *B. oleae* rilevato sulle drupe al momento della raccolta nei vari cluster, a Crotone (**KR**) e a Pozzilli (**IS**). CAO (●) = Caolino irrorato su chioma; MIRI (●) = Isopropyl-Myristato, 15 ml per dispenser; Rep. MIX (●) = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da cellulose, legno, mais e erba medica a 300 e 500 °C, 15 ml per dispenser; Att. MIX (●) = Miscela in parti uguali delle SW ottenute da sansa a 300 e 500 °C, 15 ml per dispenser; YT (●) = Controllo (Yellow Trap), pannello con esche. Trattamenti con le stesse lettere non mostrano differenze significative (Test ANOVA, Post-hoc di Student-Newman-Keuls all'interno dei gruppi). \_\_\_\_\_ **61**

## Bibliografia

- Ahluwalia, V., Walia, S., Sati, O. P., Kumar, J., Kundu, A., Shankar, J., & Paul, Y. S. (2014). Isolation, characterisation of major secondary metabolites of the Himalayan *Trichoderma koningii* and their antifungal activity. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 47(9), 1063–1071. <https://doi.org/10.1080/03235408.2013.829715>
- Ahluwalia, V., Kumar, J., Rana, V. S., Sati, O. P., & Walia, S. (2015). Comparative evaluation of two *Trichoderma harzianum* strains for major secondary metabolite production and antifungal activity. *Natural Product Research*, 29(10), 914–920. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.958739>
- Ahmadi, M., Salehi, B., Abd-Alla, A. M. M., & Babaie, M. (2018). Feasibility of using the radiation-based sterile insect technique (SIT) to control the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* Gmelin (Diptera: Tephritidae) in Iran. *Applied Radiation and Isotopes*, 139, 279–284. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2018.05.032>
- Ahmed, E., & Holmström, S. J. M. (2014). Siderophores in environmental research: Roles and applications. *Microbial Biotechnology*, 7(3), 196–208. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12117>
- Akman Gündüz, E., & Douglas, A. E. (2009). Symbiotic bacteria enable insect to use a nutritionally inadequate diet. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1658), 987–991. <https://doi.org/10.1098/rspb.2008.1476>
- Al-Zaghal, K. H., & Mustafa, T. M. (1987). Studies on the pupation of the olive fruit fly, *Dacus oleae* Gmel (Diptera, Tephritidae) in Jordan. *Journal of Applied Entomology*, 103(1–5), 452–456. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1987.tb01007.x>
- Alagna, F., Mariotti, R., Panara, F., Caporali, S., Urbani, S., Veneziani, G., Esposto, S., Taticchi, A., Rosati, A., Rao, R., Perrotta, G., Servili, M., & Baldoni, L. (2012). Olive phenolic compounds: metabolic and transcriptional profiling during fruit development. *BMC Plant Biology*, 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-162>
- Almassi, F., Ghisalberti, E. L., Narbey, M. J., & Sivasithamparam, K. (1991). New antibiotics from strains of *Trichoderma harzianum*. *Journal of Natural Products*, 54(2), 396–402. <https://doi.org/10.1021/np50074a008>
- Aluja, Martín, Rull, J., Sivinski, J., Trujillo, G., & Pérez-Staples, D. (2009). Male and female condition influence mating performance and sexual receptivity in two tropical fruit flies (Diptera: Tephritidae) with contrasting life histories. *Journal of Insect Physiology*, 55(12), 1091–1098. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2009.07.012>
- Amiot, M.-J., Fleuriet, A., & Macheix, J.-J. (1986). Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34(5), 823–826. <https://doi.org/10.1021/jf00071a014>
- Anastasakis, K., Ross, A. B., & Jones, J. M. (2011). Pyrolysis behaviour of the main carbohydrates of brown macro-algae. *Fuel*, 90(2), 598–607. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2010.09.023>
- Angerosa, F., Di Giacinto, L., & Solinas, M. (1992). Influence of *Dacus oleae* infestation on flavor of oils, extracted from attacked olive fruits, by HPLC and HRGC analyses of volatile compounds. *Grasas y Aceites*, 43(3), 134–142. <https://doi.org/10.3989/gya.1992.v43.i3.1165>
- Angiolillo, A., Mencuccini, M., & Baldoni, L. (1999). Olive genetic diversity assessed using amplified fragment length polymorphisms. *Theoretical and Applied Genetics*, 98(3–4), 411–421. <https://doi.org/10.1007/s001220051087>
- Anke, H., Kinn, J., Bergquist, K. E., & Sterner, O. (1991). Production of siderophores by strains of the genus *Trichoderma* - Isolation and characterization of the new lipophilic coprogen derivative, palmitoylcoprogen. *Biology of Metals*, 4(3), 176–180. <https://doi.org/10.1007/BF01141311>
- Apostolaki, A., Livadaras, I., Saridaki, A., Chrysargyris, A., Savakis, C., & Bourtzis, K. (2011).

Transinfection of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* with *Wolbachia*: Towards a symbiont-based population control strategy. *Journal of Applied Entomology*, 135(7), 546–553. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2011.01614.x>

- Arjona-Girona, I., Vinale, F., Ruano-Rosa, D., Lorito, M., & López-Herrera, C. J. (2014). Effect of metabolites from different *Trichoderma* strains on the growth of *Rosellinia necatrix*, the causal agent of avocado white root rot. *European Journal of Plant Pathology*, 140(2), 385–397. <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0472-z>
- Arora, A. K., & Douglas, A. E. (2017). Hype or opportunity? Using microbial symbionts in novel strategies for insect pest control. *Journal of Insect Physiology*, 103, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2017.09.011>
- Arthofer, W., Riegler, M., Schneider, D., Krammer, M., Miller, W. J., & Stauffer, C. (2009). Hidden *Wolbachia* diversity in field populations of the European cherry fruit fly, *Rhagoletis cerasi* (Diptera, Tephritidae). *Molecular Ecology*, 18(18), 3816–3830. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04321.x>
- Attygalle, A. B., Xu, S., Moore, W., McManus, R., Gill, A., & Will, K. (2020). Biosynthetic origin of benzoquinones in the explosive discharge of the bombardier beetle *Brachinus elongatulus*. *Science of Nature*, 107(4). <https://doi.org/10.1007/s00114-020-01683-0>
- Baechrecke, E. H. (2000). Steroid regulation of programmed cell death during *Drosophila* development. *Cell Death and Differentiation*, 7(11), 1057–1062. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400753>
- Balasubramanian, S., Ganesh, D., Panchal, P., Teimouri, M., & Surya Narayana, V. V. S. (2014). GC-MS analysis of phytocomponents in the methanolic extract of *Emblica officinalis* Gaertn (Indian Gooseberry). *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6(6), 843–845.
- Baldoni, L., Guerrero, C., Sossey-Aloui, K., Abbott, A. G., Angiolillo, A., & Lumaret, R. (2002). Phylogenetic relationships among *Olea* species, based on nucleotide variation at a non-coding chloroplast DNA region. *Plant Biology*, 4(3), 346–351. <https://doi.org/10.1055/s-2002-32338>
- Baquero, F., & Asensio, C. (1979). Microcins as ecological effectors in human intestinal flora: preliminary findings. In D. van der Waaij & J. Verhoef (Eds.), *New Criteria for Antimicrobial Therapy: Maintenance of Digestive Tract Colonization Resistance. Proceedings of a Symposium. Utrecht. January 1979.* (pp. 90–94). Excerpta Medica.
- Barras, F., van Gijsegem, F., & Chatterjee, A. K. (1984). Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *Erwinia*. *Annual Review of Phytopathology*, 32, 201–234.
- Bateman, M. A. (1972). The ecology of fruit flies. *Annual Review of Entomology*, 17, 493–518. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.17.010172.002425>
- Baumann, P., & Moran, N. A. (1997). Non-cultivable microorganisms from symbiotic associations of insects and other hosts. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 72(1), 39–48. <https://doi.org/10.1023/A:1000239108771>
- Baumann, P. (2005). Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. *Annual Review of Microbiology*, 59, 155–189. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.59.030804.121041>
- Behar, A., Yuval, B., & Jurkevitch, E. (2005). *Enterobacteria*-mediated nitrogen fixation in natural populations of the fruit fly *Ceratitis capitata*. *Molecular Ecology*, 14(9), 2637–2643. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02615.x>
- Behar, A., Jurkevitch, E., & Yuval, B. (2008). Bringing back the fruit into fruit fly-bacteria interactions. *Molecular Ecology*, 17(5), 1375–1386. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03674.x>
- Behar, A., Ben-Yosef, M., Lauzon, C. R., Yuval, B., & Jurkevitch, E. (2009). Structure and function of the bacterial community associated with the Mediterranean fruit fly. In: Bourtzis K, Miller TA, editors. In K Bourtzis & T. A. Miller (Eds.), *Insect symbiosis* (pp. 251–272). CRC press Boca Raton.

- Belcari, A. (1989). Contributi alla conoscenza dei Ditteri Tefritidi. IV. Descrizione della larva di terza età di *Acanthiophilus helianthi* (Rossi), *Dacus oleae* (Gmel.), *Ceratitis capitata* (Wied.) , *Acidia cognata* Wied. e considerazioni preliminari sulle differenziazioni morf. *Frustula Entomologica*, 10(23), 83–125. <https://flore.unifi.it/handle/2158/655948>
- Belcari, A., & Bobbio, E. (1999). L'impiego del rame nel controllo della mosca delle olive, *Bactrocera oleae*. *Informatore Fitopatologico*, 12, 52–55.
- Belcari, A., Sacchetti, P., Marchi, G., & Surico, G. (2003). La mosca delle olive e la simbiosi batterica. *Informatore Fitopatologico*, 53, 55–59.
- Belcari, A., Sacchetti, P., Rosi, M. C., & Del Pianta, R. (2005a). Control of the olive fly (*Bactrocera oleae*) through the use of copper products in Central Italy. *IOBC/WPRS Bulletin*, 28, 45–48.
- Belcari, A., Sacchetti, P., Rosi, M. C., & Del Pianta, R. (2005b). The use of copper products to control the olive fly (*Bactrocera oleae*) in Central Italy. *IOBC/WPRS Bulletin*, 28(9), 45–48.
- Ben-Yosef, M., Aharon, Y., Jurkevitch, E., & Yuval, B. (2010). Give us the tools and we will do the job: symbiotic bacteria affect olive fly fitness in a diet-dependent fashion. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277, 1545–1552. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.2102>
- Ben-Yosef, M., Pasternak, Z., Jurkevitch, E., & Yuval, B. (2014). Symbiotic bacteria enable olive flies (*Bactrocera oleae*) to exploit intractable sources of nitrogen. *Journal of Evolutionary Biology*. <https://doi.org/10.1111/jeb.12527>
- Ben-Yosef, M., Pasternak, Z., Jurkevitch, E., & Yuval, B. (2015). Symbiotic bacteria enable olive fly larvae to overcome host defences. *Royal Society Open Science*, 2(7). <https://doi.org/10.1098/rsos.150170>
- Benelli, G., Bonsignori, G., Stefanini, C., Raspi, A., & Canale, A. (2013). The production of female sex pheromone in *Bactrocera oleae* (Rossi) young males does not influence their mating chances. *Entomological Science*, 16(1), 47–53. <https://doi.org/10.1111/j.1479-8298.2012.00538.x>
- Bennett, R. N., & Wallsgrave, R. M. (1994). Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist*, 127(4), 617–633. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1994.tb02968.x>
- Berasategui, A., Shukla, S., Salem, H., & Kaltenpoth, M. (2016). Potential applications of insect symbionts in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(4), 1567–1577. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7186-9>
- Bertolini, E., Kistenpennig, C., Menegazzi, P., Keller, A., Koukidou, M., & Helfrich-Förster, C. (2018). The characterization of the circadian clock in the olive fly *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) reveals a *Drosophila*-like organization. *Scientific Reports*, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19255-8>
- Besnard, G., Rubio De Casas, R., & Vargas, P. (2007). Plastid and nuclear DNA polymorphism reveals historical processes of isolation and reticulation in the olive tree complex (*Olea europaea*). *Journal of Biogeography*, 34(4), 736–752. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2006.01653.x>
- Besnard, G., Rubio De Casas, R., Christin, P. A., & Vargas, P. (2009). Phylogenetics of *Olea* (*Oleaceae*) based on plastid and nuclear ribosomal DNA sequences: Tertiary climatic shifts and lineage differentiation times. *Annals of Botany*, 104(1), 143–160. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp105>
- Bigiotti, G., Pastorelli, R., Guidi, R., Belcari, A., & Sacchetti, P. (2019a). Horizontal transfer and finalization of a reliable detection method for the olive fruit fly endosymbiont, *Candidatus Erwinia dacicola*. *BMC Biotechnology*, 19(2), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12896-019-0583-x>
- Bigiotti, G., Pastorelli, R., Belcari, A., & Sacchetti, P. (2019b). Symbiosis interruption in the olive fly: Effect of copper and propolis on *Candidatus Erwinia dacicola*. *Journal of Applied Entomology*, 143(4), 357–364. <https://doi.org/10.1111/jen.12614>
- Boardman, J. (1976). The olive in the Mediterranean: its culture and use. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 275(936), 187–196.

<https://doi.org/10.1098/rstb.1976.0080>

- Boeckh, J., Kaissling, K. E., & Schneider, D. (1965). Insect olfactory receptors. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 30, 263–280. <https://doi.org/10.1101/SQB.1965.030.01.028>
- Bon, M.-C., Hoelmer, K. A., Pickett, C. H., Kirk, A. A., He, Y., Mahmood, R., & Daane, K. M. (2016). Populations of *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) and Its Parasitoids in Himalayan Asia. *Annals of the Entomological Society of America*, 109(1), 81–91. <https://doi.org/10.1093/aesa/sav114>
- Bonanomi, G., Ippolito, F., & Scala, F. (2015). A “black” future for plant pathology? Biochar as a new soil amendment for controlling plant diseases. *Journal of Plant Pathology*, 97(2), 223–234. <https://doi.org/10.4454/jpp.v97i2.3381>
- Bonanomi, G., Jesu, G., Zotti, M., Idbella, M., D’Errico, G., Laudonia, S., Vinale, F., & Abd-elgawad, A. (2021). Biochar-derived smoke-water exerts biological effects on nematodes, insects, and higher plants but not fungi. *Science of the Total Environment*, 750, 142307. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142307>
- Bononi, M., & Tateo, F. (2017). Preliminary data on volatile composition of olive fruits of cv. “Simona” and possible relationship to resistance to fly oviposition. *Italian Journal of Food Science*, 29(4), 582–590.
- Boush, M. G., & Matsumura, F. (1967). Insecticidal Degradation by *Pseudomonas melophthora*, the Bacterial Symbiote of the Apple Maggot. *Journal of Economic Entomology*, 60(4), 918–920. <https://doi.org/10.1093/jee/60.4.918>
- Bowie, M. H., Gurr, G. M., Hossain, Z., Baggen, L. R., & Frampton, C. M. (1999). Effects of distance from field edge on aphidophagous insects in a wheat crop and observations on trap design and placement. *International Journal of Pest Management*, 45(1), 69–73. <https://doi.org/10.1080/096708799228076>
- Braendle, C., Miura, T., Bickel, R., Shingleton, A. W., Kambhampati, S., & Stern, D. L. (2003). Developmental Origin and Evolution of Bacteriocytes in the Aphid–*Buchnera* Symbiosis. *PLoS Biology*, 1(1), e21. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0000021>
- Brakhage, A. A. (2013). Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature Reviews Microbiology*, 11(1), 21–32. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2916>
- Brenes, M., García, A., de los Santos, B., Medina, E., Romero, C., de Castro, A., & Romero, F. (2011). Olive glutaraldehyde-like compounds against plant pathogenic bacteria and fungi. *Food Chemistry*, 125(4), 1262–1266. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.10.055>
- Briante, R., Patumi, M., Limongelli, S., Febbraio, F., Vaccaro, C., Di Salle, A., La Cara, F., & Nucci, R. (2002). Changes in phenolic and enzymatic activities content during fruit ripening in two Italian cultivars of *Olea europaea* L. *Plant Science*, 162(5), 791–798. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00022-5](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00022-5)
- Broumas, T. (1985). Application trials of trapping systems for control of *Dacus oleae*. *Ann. Inst. Phytopathol. Benaki (N.S.)*, 14, 157–66.
- Broumas, T., Haniotakis, G. E., Liaropoulos, C., Tomazou, T., & Ragoussis, N. (2002). The efficacy of an improved form of the mass-trapping method, for the control of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Gmelin) (Dipt., Tephritidae): Pilot-scale feasibility studies. *Journal of Applied Entomology*, 126(5), 217–223. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0418.2002.00637.x>
- Brune, A., & Dietrich, C. (2015). The Gut Microbiota of Termites: Digesting the Diversity in the Light of Ecology and Evolution. *Annual Review of Microbiology*, 69(1), 145–166. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155715>
- Burnell, A. M., & Stock, S. P. (2000). *Heterorhabditis*, *Steinernema* and their bacterial symbionts - Lethal pathogens of insects. *Nematology*, 2(1), 31–42. <https://doi.org/10.1163/156854100508872>
- Burrack, H. J., & Zalom, F. G. (2008). Olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Gmel.) ovipositional preference and larval performance in several commercially important olive varieties in California. *Journal of Economic*

*Entomology*, 101(3), 750–758. [https://doi.org/10.1603/0022-0493\(2008\)101\[750:OFFDTP\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0022-0493(2008)101[750:OFFDTP]2.0.CO;2)

- Caleca, V., & Rizzo, R. (2007). Effectiveness of clays and copper products in the control of *Bactrocera oleae* (Gmelin). *IOBC Wprs Bulletin*, 39(9), 111–117.
- Caleca, V., Lo Verde, G., Lo Verde, V., Palumbo Piccionello, M., & Rizzo, R. (2010). Control of *Bactrocera oleae* and *Ceratitidis capitata* in organic orchards: Use of clays and copper products. *Acta Horticulturae*, 873(June 2014), 227–234. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.873.24>
- Caleca, V., Giacalone, C., Maltese, M., & Tortorici, F. (2016). Contenimento naturale di *Bactrocera oleae* (Rossi): clima o parassitoidi? Confronto tra Western Cape (Sud Africa) e Sicilia. *Atti Accademia Nazionale Italiana Di Entomologia*, Anno LXIV, April, 99–105.
- Caleca, V., Antista, G., Campisi, G., Caruso, T., Lo Verde, G., Maltese, M., Rizzo, R., & Planeta, D. (2017). High quality extra virgin olive oil from olives attacked by the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera: Tephritidae): Which is the tolerable limit? Data from experimental “*Nocellara Del Belice*” and “*Cerasuola*” olive groves in sicily. *Chemical Engineering Transactions*, 58, 451–456. <https://doi.org/10.3303/CET1758076>
- Campbell, C. T., & Stoloff, L. (1974). Implication of mycotoxins for human health. *Journal of A*, 22(6), 1006–1014.
- Canale, A., Carpita, A., Conti, B., Canovai, R., & Raspi, A. (2012). Effect of age on 1,7-dioxaspiro-[5.5]-undecane production in both sexes of olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera: Tephritidae). *IOBC Bull*, 72, 219–225.
- Canale, A., Germinara, G. S., Carpita, A., Benelli, G., Bonsignori, G., Stefanini, C., Raspi, A., & Rotundo, G. (2013). Behavioural and electrophysiological responses of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera: Tephritidae), to male- and female-borne sex attractants. *Chemoecology*, 23(3), 155–164. <https://doi.org/10.1007/s00049-013-0131-4>
- Canale, A., Benelli, G., Germinara, G. S., Fusini, G., Romano, D., Rapalini, F., Desneux, N., Rotundo, G., Raspi, A., & Carpita, A. (2015). Behavioural and electrophysiological responses to overlooked female pheromone components in the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae). *Chemoecology*, 25(3), 147–157. <https://doi.org/10.1007/s00049-014-0183-0>
- Canale, A., Benelli, G., Germinara, G. S., Carpita, A., Raspi, A., & Rotundo, G. (2016). Shedding light on the Sexual Chemoecology of Olive Fruit Fly, *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera: Tephritidae). *Atti Accademia Nazionale Italiana Di Entomologia*, Anno LXIV, 63–66.
- Capuzzo, C., Firrao, G., Mazzon, L., Squartini, A., & Girolami, V. (2005). “*Candidatus Erwinia dacicola*”, a coevolved symbiotic bacterium of the olive fly *Bactrocera oleae* (Gmelin). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(4), 1641–1647. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63653-0>
- Carpita, A., Canale, A., Raffaelli, A., Saba, A., Benelli, G., & Raspi, A. (2012). (Z)-9-tricosene identified in rectal gland extracts of *Bactrocera oleae* males: First evidence of a male-produced female attractant in olive fruit fly. *Naturwissenschaften*, 99(1), 77–81. <https://doi.org/10.1007/s00114-011-0868-y>
- Castrignanò, A., Boccaccio, L., Cohen, Y., Nestel, D., Kounatidis, I., Papadopoulos, N. T., de Benedetto, D., & Mavragani-Tsipidou, P. (2012). Spatio-temporal population dynamics and area-wide delineation of *Bactrocera oleae* monitoring zones using multi-variate geostatistics. *Precision Agriculture*, 13(4), 421–441. <https://doi.org/10.1007/s11119-012-9259-4>
- Ceja-Navarro, J. A., Vega, F. E., Karaoz, U., Hao, Z., Jenkins, S., Lim, H. C., Kosina, P., Infante, F., Northen, T. R., & Brodie, E. L. (2015). Gut microbiota mediate caffeine detoxification in the primary insect pest of coffee. *Nature Communications*, 6(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/ncomms8618>
- Chang, Y. T., Hsieh, C., Wu, L. C., Chang, H. C., Kao, S. S., Meng, M., & Hsieh, F. C. (2013). Purification and properties of an insecticidal metalloprotease produced by *Photorhabdus Luminescens* strain 0805-P5G, the entomopathogenic nematode symbiont. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(1), 308–321. <https://doi.org/10.3390/ijms14010308>

- Chattopadhyay, A., Bhatnagar, N. B., & Bhatnagar, R. (2004). Bacterial insecticidal toxins. *Critical Reviews in Microbiology*, 30(1), 33–54. <https://doi.org/10.1080/10408410490270712>
- Chen, F., D’Auria, J. C., Tholl, D., Ross, J. R., Gershenzon, J., Noel, J. P., & Pichersky, E. (2003). An *Arabidopsis thaliana* gene for methylsalicylate biosynthesis, identified by a biochemical genomics approach, has a role in defense. *Plant Journal*, 36(5), 577–588. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01902.x>
- Chen, J., Liu, K., Miao, C.-P., Guan, H.-L., Zhao, L.-X., & Sun, S.-Z. (2015). Chemical Constituents with Siderophores Activities from *Trichoderma koningiopsis* YIM PH30002. *Natural Product Research and Development*, 27, 1878–1883. <https://doi.org/10.16333/j.1001-6880.2015.11.008>
- Chen, L. H., Cui, Y. Q., Yang, X. M., Zhao, D. K., & Shen, Q. R. (2012). An antifungal compound from *Trichoderma harzianum* SQR-T037 effectively controls *Fusarium* wilt of cucumber in continuously cropped soil. *Australasian Plant Pathology*, 41(3), 239–245. <https://doi.org/10.1007/s13313-012-0119-5>
- Cheng, D., Guo, Z., Riegler, M., Xi, Z., Liang, G., & Xu, Y. (2017). Gut symbiont enhances insecticide resistance in a significant pest, the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *Microbiome*, 5(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0236-z>
- Cheng, Q., & Aksoy, S. (1999). Tissue tropism, transmission and expression of foreign genes in vivo in midgut symbionts of *tsetse* flies. *Insect Molecular Biology*, 8(1), 125–132. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2583.1999.810125.x>
- Chiang, Y.-M., Lee, K.-H., Sanchez, J. F., Keller, N. P., & Wang, C. C. C. (2009). Unlocking Fungal Cryptic Natural Products. *Natural Product Communications*, 4(11), 1505–1510. <https://doi.org/doi:10.1177/1934578X0900401113>
- Chiwocha, S. D. S., Dixon, K. W., Flematti, G. R., Ghisalberti, E. L., Merritt, D. J., Nelson, D. C., Riseborough, J. A. M., Smith, S. M., & Stevens, J. C. (2009). Karrikins: A new family of plant growth regulators in smoke. *Plant Science*, 177(4), 252–256. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.06.007>
- Cirio, U. (1971). Reperti sul meccanismo stimolo-risposta nell’ovideposizione del *Dacus oleae* Gmelin (Diptera, Trypetidae). *Redia*, 52, 577–599.
- Claydon, N., Allan, M., Hanson, J. R., & Avent, A. G. (1987). Antifungal alkyl pyrones of *Trichoderma harzianum*. *Transactions of the British Mycological Society*, 88(4), 503–513. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(87\)80034-7](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(87)80034-7)
- Claydon, N., Hanson, J. R., Truneh, A., & Avent, A. G. (1991). Harzianolide, a butenolide metabolite from cultures of *Trichoderma harzianum*. *Phytochemistry*, 30(11), 3802–3803. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)80115-H](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)80115-H)
- Colegate, S. M., & Molyneux, R. J. (Eds.). (2008). *Bioactive Natural Products: Detection, Isolation, and Structural Determination* (2nd ed.). CRC press, Taylor and Francis Group. <https://doi.org/10.1201/9781420006889>
- Collins, R. P., & Halim, A. F. . (1972). Characterization of the major aroma constituent of the fungus *Trichoderma viride*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 20(2), 437–438. <https://doi.org/10.1021/jf60180a010>
- Cornelissen, G., Pandit, N. R., Taylor, P., Pandit, B. H., Sparrevik, M., & Schmidt, H. P. (2016). Emissions and char quality of flame-curtain “Kon Tiki” kilns for farmer-scale charcoal/biochar production. *PLoS ONE*, 11(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154617>
- Corrado, G., Garonna, A. Pietro, Gómez-Lama Cabanás, C., Gregoriou, M., Martelli, G. P., & Mathiopoulos, K. D. (2016). Host Response to Biotic Stresses. In E. Rugini, L. Baldoni, R. Muleo, & L. Sebastiani (Eds.), *The live tree Genome* (pp. 75–98). Springer International Publishing.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., & Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial

biofilms. *Annual Review of Microbiology*, 49, 711–745. <https://doi.org/10.1201/9780203500224>

- Cruz-Magalhães, V., Nieto-Jacobo, M. F., Van Zijll De Jong, E., Rostás, M., Padilla-Arizmendi, F., Kandula, D., Kandula, J., Hampton, J., Herrera-Estrella, A., Steyaert, J. M., Stewart, A., Lopes Loguercio, L., & Mendoza-Mendoza, A. (2019). The NADPH oxidases nox1 and Nox2 differentially regulate volatile organic compounds, fungistatic activity, plant growth promotion and nutrient assimilation in *Trichoderma atroviride*. *Frontiers in Microbiology*, 9:3271(JAN), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03271>
- Currie, C. R., Wong, B., Stuart, A. E., Schultz, T. R., Rehner, S. A., Mueller, U. G., Sung, G. H., Spatafora, J. W., & Straus, N. A. (2003). Ancient tripartite coevolution in the attine ant-microbe symbiosis. *Science*, 299(5605), 386–388. <https://doi.org/10.1126/science.1078155>
- Cutler, H. G., Cox, R. H., Crumley, F. G., & Cole, P. D. (1986). 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone from *Trichoderma harzianum*: Its plant growth inhibitory and antimicrobial properties. *Agricultural and Biological Chemistry*, 50(11), 2934–2945. <https://doi.org/10.1080/00021369.1986.10867860>
- Cutler, H. G., Himmelsbach, D. S., Arrendale, R. F., Cole, P. D., & Cox, R. H. (1989). Koninginin a: A novel plant growth regulator from *Trichoderma koningii*; *Agricultural and Biological Chemistry*, 53(10), 2605–2611. <https://doi.org/10.1080/00021369.1989.10869746>
- Cutler, H. G., & Jacyno, J. M. (1991). Biological Activity of (—)-Harzianopyridone Isolated from *Trichoderma harzianum*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55(10), 2629–2631. <https://doi.org/10.1271/bbb1961.55.2629>
- Cutler, H. G., Cutler, S. J., Ross, S. A., El Sayed, K., Dugan, F. M., Bartlett, M. G., Hill, A. A., Hill, R. A., & Parker, S. R. (1999). Koninginin G, a new metabolite from *Trichoderma aureoviride*. *Journal of Natural Products*, 62(1), 137–139. <https://doi.org/10.1021/np9801817>
- Daane, K. M., Rice, R. E., Zalom, F. G., Barnett, W. W., & Johnson, M. W. (2005). Arthropod Pests of Olive. In G. S. Sibbett & L. Ferguson (Eds.), *Olive production manual* (3353rd ed., Issue June, pp. 105–114). University of California ANR Publication.
- Daane, K. M., & Johnson, M. W. (2010). Olive fruit fly: Managing an ancient pest in modern times. *Annual Review of Entomology*, 55, 151–169. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.54.110807.090553>
- Dale, C., & Moran, N. A. (2006). Molecular Interactions between Bacterial Symbionts and Their Hosts. *Cell*, 126(3), 453–465. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.014>
- Davey, M. E., & O’toole, G. A. (2000). Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), 847–867. <https://doi.org/10.1128/membr.64.4.847-867.2000>
- De Cristofaro, A., Rotundo, G., Belcari, A., & Germinara, G. S. (2007). Effect of age and mating status on the antennal sensitivity of *Bactrocera oleae* (Rossi)(Diptera Tephritidae) male and female. *IOBC/WPRS Bulletin*, 23, 23.
- de Lange, J. H., & Boucher, C. (1990). Autecological studies on *Audouinia capitata* (Bruniaceae). I. Plant-derived smoke as a seed germination cue. *South African Journal of Botany*, 56(6), 700–703. [https://doi.org/10.1016/s0254-6299\(16\)31009-2](https://doi.org/10.1016/s0254-6299(16)31009-2)
- De Marzo, L., Nuzzaci, G., & Solinas, M. (1976). Aspetti anatomici, strutturali, ultrastrutturali e fisiologici delle ghiandole genitali accessorie del maschio di *Dacus oleae* Gmel. in relazione alla maturità ed all’attività sessuale. *ENTOMOLOGICA - Annali Di Entomologia Generale Ed Applicata*, 12.
- Dedeine, F., Bandi, C., Boulétreau, M., & Kramer, L. (2003). Insights Into *Wolbachia* Obligatory Symbiosis. In Kostas Bourtzis & G. T. Miller (Eds.), *Insect symbiosis* (Issue May, pp. 267–282). CRC press. <https://doi.org/10.1201/9780203009918.ch16>
- Degenkolb, T., Berg, A., Gams, W., Schlegel, B., & Gräfe, U. (2003). The occurrence of peptaibols and structurally related peptaibiotics in fungi and their mass spectrometric identification via diagnostic

- fragment ions. *Journal of Peptide Science*, 9(11–12), 666–678. <https://doi.org/10.1002/psc.497>
- Degenkolb, T., Dieckmann, R., Nielsen, K. F., Gräfenhan, T., Theis, C., Zafari, D., Chaverri, P., Ismaiel, A., Brückner, H., Von Döhren, H., Thrane, U., Petrini, O., & Samuels, G. J. (2008). The *Trichoderma brevicompactum* clade: A separate lineage with new species, new peptaibiotics, and mycotoxins. In *Mycological Progress* (Vol. 7, Issue 3). <https://doi.org/10.1007/s11557-008-0563-3>
- Delrio, G., & Cavalloro, R. (1977). Findings on the life-cycle and on the population dynamics of *Dacus oleae* Gmelin in Liguria. *Redia*, 60, 221–253.
- Delucchi, V. (1957). Les parasites de la mouche des olives. *Entomophaga*, 2(2), 107–118. <https://doi.org/10.1007/BF02371118>
- Demain, A. L., & Fang, A. (2000). The Natural Functions of Secondary Metabolites. In A. Fletcher (Ed.), *History of Modern Biotechnology I. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* (1st ed., Vol. 69, pp. 1–39). Springer. [https://doi.org/10.1007/3-540-44964-7\\_1](https://doi.org/10.1007/3-540-44964-7_1)
- Díaz-Fleischer, F., & Aluja, M. (2000). Behavior of tephritid flies: A historical perspective. In Martín Aluja & A. L. Norrbom (Eds.), *Fruit Flies (Tephritidae): Phylogeny and Evolution of Behavior* (Issue January, pp. 39–69). CRC press. <https://doi.org/10.1201/9781420074468>
- Dixit, P., Mukherjee, P. K., Ramachandran, V., & Eapen, S. (2011). Glutathione transferase from *Trichoderma virens* enhances cadmium tolerance without enhancing its accumulation in transgenic *Nicotiana tabacum*. *PLoS ONE*, 6(1), e16360. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016360>
- Dobler, S., Petschenka, G., & Pankoke, H. (2011). Coping with toxic plant compounds - The insect's perspective on iridoid glycosides and cardenolides. *Phytochemistry*, 72(13), 1593–1604. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.04.015>
- Donia, A. R., El Sawaf, S. K., Abou Ghadir, M. F., Sawaf, S. K. E. L., & Ghadir, M. F. A. (1971). Number of generations and seasonal abundance of the olive fruit fly, *Dacus oleae* (Gmel.) and the susceptibility of different olive varieties to infestation (Diptera: Trypetidae). *Bulletin de La Societe Entomologique d'Egypte*, 55, 201–209.
- Douglas, A. E. (1998). Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: Aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. *Annual Review of Entomology*, 43, 17–37. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.43.1.17>
- Douglas, A. E., Minto, L. B., & Wilkinson, T. L. (2001). Quantifying nutrient production by the microbial symbionts in an aphid. *Journal of Experimental Biology*, 204(2), 349–358.
- Douglas, A. E. (2009). The microbial dimension in insect nutritional ecology. *Functional Ecology*, 23(1), 38–47. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01442.x>
- Douglas, A. E. (2013). Microbial Brokers of Insect-Plant Interactions Revisited. *Journal of Chemical Ecology*, 39(7), 952–961. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0308-x>
- Dowd, P. F. (1992). Insect fungal symbionts: A promising source of detoxifying enzymes. *Journal of Industrial Microbiology*, 9(3–4), 149–161. <https://doi.org/10.1007/BF01569619>
- Drew, R. A. I., Courtice, A. C., & Teakle, D. S. (1983). Bacteria as a natural source of food for adult fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Oecologia*, 60(3), 279–284. <https://doi.org/10.1007/BF00376839>
- Drew, R. A. I. (1989). Taxonomy and zoogeography: the taxonomy and distribution of tropical and subtropical Dacinae (Diptera: Tephritidae). In: Fruit Flies their biology, natural enemies and control. In A. S. Robinson & G. Hooper (Eds.), *World Crop Pest 3A: Fruit Flies their biology, natural enemies and control* (pp. 9–14). Elsevier B.V.
- Drew, R. A. I., & Lloyd, A. C. (1991). Bacteria in the life cycle of Tephritid fruit flies. In P. Barbosa, V. A. Krischik, & C. G. Jones (Eds.), *Microbial mediation of plant-herbivore interactions* (pp. 441–465). John Wiley and Sons, Inc.

- Drew, R. A. I., & Yuval, B. (1999). The Evolution of Fruit Fly Feeding Behavior. In Martin Aluja & A. Norrbom (Eds.), *Fruit Flies (Tephritidae) Phylogeny and Evolution of Behavior* (pp. 749–768). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420074468-38>
- Druzhinina, I. S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B. A., Kenerley, C. M., Monte, E., Mukherjee, P. K., Zeilinger, S., Grigoriev, I. V., & Kubicek, C. P. (2011). *Trichoderma*: The genomics of opportunistic success. *Nature Reviews Microbiology*, 9(10), 749–759. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2637>
- Dunbar, H. E., Wilson, A. C. C., Ferguson, N. R., & Moran, N. A. (2007). Aphid thermal tolerance is governed by a point mutation in bacterial symbionts. *PLoS Biology*, 5(5), 1006–1015. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050096>
- Dunlop, R. W., Simon, A., Sivasithamparam, K., & Ghisalberti, E. L. (1989). An antibiotic from *Trichoderma koningii* active against soilborne plant pathogens. *Journal of Natural Products*, 52(1), 67–74. <https://doi.org/10.1021/np50061a008>
- Economopoulos, A. P. (1970). Sexual Competitiveness of Gamma-Ray Sterilized Males of *Dacus oleae*. Mating Frequency of Artificially Reared and Wild Females. *Environmental Entomology*, 1(4), 490–497. <https://doi.org/10.1093/ee/1.4.490>
- Economopoulos, A. P., & Zervas, G. A. (1982). The quality problem in olive flies produced for SIT experiments. *Sterile Insect Technique and Radiation in Insect Control, Vienna, Austria*.
- Engelberth, J., Koch, T., Schüler, G., Bachmann, N., Rechtenbach, J., & Boland, W. (2001). Ion channel-forming alamethicin is a potent elicitor of volatile biosynthesis and tendrill coiling. Cross talk between jasmonate and salicylate signaling in lima bean. *Plant Physiology*, 125(1), 369–377. <https://doi.org/10.1104/pp.125.1.369>
- Engelstädter, J., & Hurst, G. D. D. (2009). The ecology and evolution of microbes that manipulate host reproduction. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 40, 127–149. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.110308.120206>
- Estes, A. M. (2009). *Life in a fly: the ecology and evolution of the olive fly endosymbiont, Candidatus Erwinia dacicola* [University of Arizona, Tucson, AZ, USA]. <http://hdl.handle.net/10150/195735>
- Estes, A. M., Hearn, D. J., Bronstein, J. L., & Pierson, E. A. (2009). The olive fly endosymbiont, “*Candidatus Erwinia dacicola*,” switches from an intracellular existence to an extracellular existence during host insect development. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(22), 7097–7106. <https://doi.org/10.1128/AEM.00778-09>
- Estes, A. M., Hearn, D. J., Burrack, H. J., Rempoulakis, P., & Pierson, E. A. (2012a). Prevalence of “*Candidatus Erwinia dacicola*” in wild and laboratory olive fruit fly populations and across developmental stages. *Environmental Entomology*, 41(2), 265–274. <https://doi.org/10.1603/EN11245>
- Estes, A. M., Nestel, D., Belcari, A., Jessup, A. J., Rempoulakis, P., & Economopoulos, A. P. (2012b). A basis for the renewal of sterile insect technique for the olive fly, *Bactrocera oleae* (Rossi). *Journal of Applied Entomology*, 136(1–2), 1–16. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2011.01620.x>
- Estes, A. M., Hearn, D. J., Agrawal, S., Pierson, E. A., & Dunning Hotopp, J. C. (2018). Comparative genomics of the *Erwinia* and *Enterobacter* olive fly endosymbionts. *Scientific Reports*, 8(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33809-w>
- Expert, D. (1999). Withholding and exchanging iron: Interactions between *Erwinia* spp. and their plant hosts. *Annual Review of Phytopathology*, 37(1), 307–334. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.37.1.307>
- Felton, G. W., & Gatehouse, J. A. (1996). Antinutritive plant defence mechanisms. In M. J. Lehane & P. F. Billingsley (Eds.), *Biology of the Insect Midgut* (pp. 373–416). Chapman & Hall. [https://doi.org/10.1007/978-94-009-1519-0\\_14](https://doi.org/10.1007/978-94-009-1519-0_14)
- Fitches, E., Wiles, D., Douglas, A. E., Hinchliffe, G., Audsley, N., & Gatehouse, J. A. (2008). The

insecticidal activity of recombinant garlic lectins towards aphids. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38(10), 905–915. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2008.07.002>

- Flematti, G. R., Ghisalberti, E. L., Dixon, K. W., & Trengove, R. D. (2004). A compound from smoke that promotes seed germination. *Science*, 305(5686), 977. <https://doi.org/10.1126/science.1099944>
- Fleming, A. (1929). On the antibacterial action of Cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *The British Journal of EXPERIMENTAL PATHOLOGY*, 10(3), 226–236.
- Fletcher, B. S. (1987). The biology of dachine fruit flies. *Annual Review of Entomology*. Vol. 32, 115–144. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.32.010187.000555>
- Fletcher, B. S., Pappas, S., & Kapatós, E. T. (1978). Changes in the ovaries of olive flies (*Dacus oleae* (Gmelin)) during the summer, and their relationship to temperature, humidity and fruit availability. *Ecological Entomology*, 3(2), 99–107. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.1978.tb00908.x>
- Fletcher, B. S., & Kapatós, E. T. (1983). The Influence of Temperature, Diet and Olive Fruits on the Maturation Rates of Female Olive Flies At Different Times of the Year. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 33(3), 244–252. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1983.tb03264.x>
- Fortenbaugh, W. W., & Gutas, D. (1992). *Theophrastus: His Psychological, Doxographical, and Scientific Writings* (Rutgers University Studies in Classical Humanities Ser. (Ed.); 1st ed.). New Brunswick, London, Transaction Publishers. <https://www.worldcat.org/title/theophrastus-his-psychological-doxographical-and-scientific-writings/oclc/1058623107>
- French-Constant, R. H., & Bowen, D. J. (2000). Novel insecticidal toxins from nematode-symbiotic bacteria. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57(5), 828–833. <https://doi.org/10.1007/s000180050044>
- Fry, A. J., Palmer, M. R., & Rand, D. M. (2004). Variable fitness effects of *Wolbachia* infection in *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, 93(4), 379–389. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800514>
- Fytizas, E., & Tzanakakis, M. E. (1966). Some Effects of Streptomycin, When Added to the Adult Food, on the Adults of *Dacus oleae* (Diptera: Tephritidae) and Their Progeny. *Annals of the Entomological Society of America*, 59(2), 269–273. <https://doi.org/10.1093/aesa/59.2.269>
- Garnica-Vergara, A., Barrera-Ortiz, S., Muñoz-Parra, E., Raya-González, J., Méndez-Bravo, A., Macías-Rodríguez, L., Ruiz-Herrera, L. F., & López-Bucio, J. (2016). The volatile 6-pentyl-2H-pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and Ethylene Insensitive 2 functioning. *New Phytologist*, 209(4), 1496–1512. <https://doi.org/10.1111/nph.13725>
- Genta, F. A., Dillon, R. J., Terra, W. R., & Ferreira, C. (2006). Potential role for gut microbiota in cell wall digestion and glucoside detoxification in *Tenebrio molitor* larvae. *Journal of Insect Physiology*, 52(6), 593–601. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2006.02.007>
- Ghanim, M., & Kontsedalov, S. (2009). Susceptibility to insecticides in the Q biotype of *Bemisia tabaci* is correlated with bacterial symbiont densities. *Pest Management Science*, 65(9), 939–942. <https://doi.org/10.1002/ps.1795>
- Ghisalberti, E. L., Hockless, D. C. R., Rowland, C. Y., & White, A. H. (1992). Harziandione, a new class of diterpene from *Trichoderma harzianum*. *Journal of Natural Products*, 55(11), 1690–1694. <https://doi.org/10.1021/np50089a023>
- Ghisalberti, E. L., & Rowland, C. Y. (1993). Antifungal metabolites from *Trichoderma harzianum*. *Journal of Natural Products*, 56(10), 1799–1804. <https://doi.org/10.1021/np50100a020>
- Ghisalberti, E. L. (2003). *Bioactive tetramic acid metabolites* (Vol. 28, Issue PART I, pp. 109–163). [https://doi.org/10.1016/S1572-5995\(03\)80140-0](https://doi.org/10.1016/S1572-5995(03)80140-0)
- Gil, R., Latorre, A., & Moya, A. (2004). Bacterial endosymbionts of insects: Insights from comparative genomics. *Environmental Microbiology*, 6(11), 1109–1122. <https://doi.org/10.1111/j.1462->

- Girolami, V. (1973). Reperti morfo-istologici sulle batteriosimbiosi del *Dacus oleae* Gmelin e di altri ditteri tripetidi, in natura e negli allevamenti su substrati artificiali. *Redia*, *54*, 269–2994.
- Girolami, V. (1983). Fruit fly symbiosis and adult survival: general aspects. In R. Cavalloro (Ed.), *Proceedings of the CEC/IOBC International Symposium* (pp. 74–75). Balkema.
- Giron, D., & Glevarec, G. (2014). Cytokinin-Induced Phenotypes in Plant-Insect Interactions: Learning from the Bacterial World. *Journal of Chemical Ecology*, *40*(7), 826–835. <https://doi.org/10.1007/s10886-014-0466-5>
- Giron, D., Huguet, E., Stone, G. N., & Body, M. (2016). Insect-induced effects on plants and possible effectors used by galling and leaf-mining insects to manipulate their host-plant. *Journal of Insect Physiology*, *84*, 70–89. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.12.009>
- Giron, D., Dedeine, F., Dubreuil, G., Huguet, E., Mouton, L., Outreman, Y., Vavre, F., & Simon, J. C. (2017). Influence of Microbial Symbionts on Plant–Insect Interactions. In N. Sauvion, D. Thiéry, & P.-A. Calatayud (Eds.), *Advances in Botanical Research, Vol. 81: Insect-Plant Interactions in a Crop Protection Perspective* (Vol. 81, pp. 225–257). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2016.09.007>
- Giunti, G., Campolo, O., Laudani, F., Algeri, G. M., & Palmeri, V. (2020). Olive fruit volatiles route intraspecific interactions and chemotaxis in *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera: Tephritidae) females. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58379-8>
- Gjersing, E. L., Codd, S. L., Seymour, J. D., & Stewart, P. S. (2005). Magnetic resonance microscopy analysis of advective transport in a biofilm reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, *89*(7), 822–834. <https://doi.org/10.1002/bit.20400>
- Gómez-Caravaca, A. M., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., Del Carlo, M., Compagnone, D., & Cichelli, A. (2008). Effects of fly attack (*Bactrocera oleae*) on the phenolic profile and selected chemical parameters of olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(12), 4577–4583. <https://doi.org/10.1021/jf800118t>
- Gonçalves, F., & Torres, L. (2012). Effect of copper Oxychloride on the olive infestation by *Bactrocera oleae* in northeastern Portugal. *Acta Horticulturae*, *949*, 333–340. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2012.949.49>
- Grasso, F., Coppola, M., Carbone, F., Baldoni, L., Alagna, F., Perrotta, G., Pérez-Pulido, A. J., Garonna, A. Pietro, Facella, P., Daddiego, L., Lopez, L., Vitiello, A., Rao, R., & Corrado, G. (2017). The transcriptional response to the olive fruit fly (*Bactrocera oleae*) reveals extended differences between tolerant and susceptible olive (*Olea europaea* L.) varieties. *PLOS ONE*, *12*(8), e0183050. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183050>
- Greany, P. D. (1989). Host plant resistance to tephritids: An under-exploited control strategy. In A.S. Robinson & G. Hooper (Eds.), *Fruit flies: their biology, natural enemies and control* (pp. 353–362). Elsevier Science Publ.
- Greenberg, B. (1959). Persistence of bacteria in the developmental stages of the housefly. III. Quantitative distribution in prepupae and pupae. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *8*(6), 613–617. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1959.8.613>
- Gucci, R., Caruso, G., Canale, A., Loni, A., Raspi, A., Urbani, S., Taticchi, A., Esposito, S., & Servili, M. (2012). Qualitative Changes of Olive Oils Obtained from Fruits Damaged by *Bactrocera oleae* (Rossi). *HortScience*, *47*(2), 301–306. <https://doi.org/10.21273/hortsci.47.2.301>
- Gümusay, B., Özilbey, U., Ertem, G., & Oktar, A. (1990). Studies on the susceptibility of some important table and oil olive cultivars of Aegean region to olive fruit fly (*Dacus oleae* Gmel.) in Turkey. *Acta Horticulturae*, *286*, 359–362. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1990.286.73>

- Gutierrez-Rosales, F., Romero, M. P., Casanovas, M., Motilva, M. J., & Mínguez-Mosquera, M. I. (2012).  $\beta$ -Glucosidase involvement in the formation and transformation of oleuropein during the growth and development of olive fruits (*Olea europaea* L. cv. Arbequina) grown under different farming practices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(17), 4348–4358. <https://doi.org/10.1021/jf205209y>
- Haniotakis, G. E., Kozyrakis, E., & Bonatsos, C. (1986). Control of the olive fruit fly, *Dacus oleae* Gmel. (Dipt., Tephritidae) by mass trapping: Pilot scale feasibility study. *Journal of Applied Entomology*, 101(1–5), 343–352. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1986.tb00868.x>
- Hanson, J. R. (2003). *Natural Products: The Secondary Metabolites. Series: Tutorial Chemistry Texts* (E. W. Abel (Ed.); 1st ed.). The Royal Society of Chemistry.
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species - Opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2(1), 43–56. <https://doi.org/10.1038/nrmicro797>
- Hellmuth, H. (1956). Untersuchungen zur bakteriensymbiose der trypetiden (Diptera). *Zeitschrift Für Morphologie Und Ökologie Der Tiere*, 44(6), 483–517. <https://doi.org/10.1007/bf00407171>
- Herbert, B. R. (1994). *The Biosynthesis of Secondary Metabolites* (C. and H. London (Ed.); 2nd ed.). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-009-5833-3>
- Hermosa, R., Rubio, M. B., Cardoza, R. E., Nicolás, C., Monte, E., & Gutiérrez, S. (2013). The contribution of *Trichoderma* to balancing the costs of plant growth and defense. *International Microbiology*, 16(2), 69–80. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.181>
- Hoelmer, K. A., Kirk, A. A., Pickett, C. H., Daane, K. M., & Johnson, M. W. (2011). Prospects for improving biological control of olive fruit fly. *Biocontrol Science and Technology*, 21(9), 1005–1025. <https://doi.org/10.1080/09583157.2011.594951>
- Hoffmann, A. A., & Turelli, M. (1997). CI in insects. In S. L. O'Neill, H. A. A., & J. H. Werren (Eds.), *Influential passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction* (pp. 42–80). Oxford University Press,.
- Hort, A., & Theophrastus. (1916). *Enquiry into plants and minor works on odours and weather signs: in two volumes*. Harvard Univ. Press.
- Hoydonckx, H. E., Van Rhijn, W. M., Van Rhijn, W., De Vos, D. E., & Jacobs, P. A. (2007). Furfural and Derivatives. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry: Vol. d* (pp. 685–688). Wiley-VCH, Weinheim. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00147-0>
- Hurst, G. D. D., Jigging, F. M., Von Der Schulenburg, J. H. G., Bertrand, D., West, S. A., Goriacheva, I. I., Zakharov, I. A., Werren, J. H., Stouthamer, R., & Majerus, M. E. N. (1999). Male-killing *Wolbachia* in two species of insect. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 266(1420), 735–740. <https://doi.org/10.1098/rspb.1999.0698>
- Iannotta, N. (2004). La difesa dell'olivo dai principali fitofagi con metodi conformi al Reg. CEE 2092/91. In *La difesa dai fitofagi in condizioni di olivicoltura biologica. Atti Accademia nazionale dell'Olio e dell'Olio, Spoleto, 29-30 October 2002* (pp. 49–62).
- Iannotta, N., Belfiore, T., Noce, M. E., Perri, L., & Scalercio, S. (2006). Efficacy of products allowed in organic olive farming against *Bactrocera oleae* (Gmel.). *Proceedings of the Second International Seminar on "Biotechnology and Quality of Olive Tree Products around the Mediterranean Basin - Olivebioteq. - Novembre 5th-10th Vol. 2*, 323–326.
- Iannotta, N., Noce, M. E., Ripa, V., Scalercio, S., & Vizzarri, V. (2007). Assessment of susceptibility of olive cultivars to the *Bactrocera oleae* (Gmelin, 1790) and *Camarosporium dalmaticum* (Thüm.) Zachos & Tzav.-Klon. attacks in Calabria (Southern Italy). *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 42(7), 789–793. <https://doi.org/10.1080/03601230701551426>

- Iannotta, N., & Scalercio, S. (2012). Susceptibility of *Cultivars* to Biotic Stresses. In I. Muzzalupo (Ed.), *Olive Germplasm - The Olive Cultivation, Table Olive and Olive Oil Industry in Italy* (pp. 81–106). INTECH Open Access Publisher. <https://doi.org/10.5772/52036>
- International Biochar Initiative. (2015). Standardized Product Definition and Product Testing Guidelines for Biochar That Is Used in Soil. *IBI Biochar Standards, November, 23*. [http://www.biochar-international.org/sites/default/files/Guidelines\\_for\\_Biochar\\_That\\_Is\\_Used\\_in\\_Soil\\_Final.pdf](http://www.biochar-international.org/sites/default/files/Guidelines_for_Biochar_That_Is_Used_in_Soil_Final.pdf)
- Jaiswal, A. K., Frenkel, O., Tsechansky, L., Elad, Y., & Graber, E. R. (2018). Immobilization and deactivation of pathogenic enzymes and toxic metabolites by biochar: A possible mechanism involved in soilborne disease suppression. *Soil Biology and Biochemistry, 121*, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.03.001>
- Janson, E. M., Stireman, J. O., Singer, M. S., & Abbot, P. (2008). Phytophagous insect-microbe mutualisms and adaptive evolutionary diversification. *Evolution, 62*(5), 997–1012. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2008.00348.x>
- Jeyaprakash, A. A., & Hoy, M. A. (2000). Blackwell Science, Ltd Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: wsp sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Molecular Biology, 9*(4), 393–405. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2583.2000.00203.x>
- Jiang, C., Baechrecke, E. H., & Thummel, C. S. (1997). Steroid regulated programmed cell death during *Drosophila* metamorphosis. *Development, 124*(22), 4673–4683.
- Jin, H. Z., Lee, J. H., Zhang, W. D., Lee, H. B., Hong, Y. S., Kim, Y. H., & Lee, J. J. (2007). Harzianums A and B produced by a fungal strain, *Hypocrea* sp. F000527, and their cytotoxicity against tumor cell lines. *Journal of Asian Natural Products Research, 9*(3), 203–207. <https://doi.org/10.1080/10286020500531977>
- Joachim-Bravo, I. S., Fernandes, O. A., De Bortoli, S. A., & Zucoloto, F. S. (2001). Oviposition behavior of *Ceratitis capitata* wiedemann (Diptera: Tephritidae): Association between oviposition preference and larval performance in individual females. *Neotropical Entomology, 30*(4), 559–564. <https://doi.org/10.1590/s1519-566x2001000400008>
- Joubert, D. A., & O'Neill, S. L. (2017). Comparison of Stable and Transient *Wolbachia* Infection Models in *Aedes aegypti* to Block Dengue and West Nile Viruses. *PLoS Neglected Tropical Diseases, 11*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005275>
- Jurkevitch, E. (2011). Riding the Trojan horse: Combating pest insects with their own symbionts. *Microbial Biotechnology, 4*(5), 620–627. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2011.00249.x>
- Kaiser, W., Huguët, E., Casas, J., Commin, C., & Giron, D. (2010). Plant green-island phenotype induced by leaf-miners is mediated by bacterial symbionts. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 277*(1692), 2311–2319. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.0214>
- Kakani, E. G., & Mathiopoulos, K. D. (2008). Organophosphosphate resistance-related mutations in the acetylcholinesterase gene of Tephritidae. *Journal of Applied Entomology, 132*(9–10), 762–771. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2008.01373.x>
- Kaltenpoth, M. (2009). Actinobacteria as mutualists: general healthcare for insects? *Trends in Microbiology, 17*(12), 529–535. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.09.006>
- Kanaoka, M., Isogai, A., & Suzuki, A. (1979). Syntheses of bassianolide and its two homologs, enniatin C and decabassianolide. *Agricultural and Biological Chemistry, 43*(5), 1079–1083. <https://doi.org/10.1080/00021369.1979.10863561>
- Kapatos, E. T., Fletcher, B. S., Pappas, S., & Laudeho, Y. (1977). The release of *Opius concolor* and *O. Concolor* var. *Siculus* [Hym.: Braconidae] against the spring generation of *Dacus oleae* [Dipt.: Trypetidae] on Corfu. *Entomophaga, 22*(3), 265–270. <https://doi.org/10.1007/BF02372147>
- Kapatos, E. T., & Fletcher, B. S. (1984). The phenology of the olive fly, *Dacus oleae* (Gmel.) (Diptera,

- Tephritidae), in Corfu. *Z Angew Entomol*, 97, 360–370. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1984.tb03760.x>
- Karlovsky, P. (Ed.). (2008). *Secondary Metabolites in Soil Ecology. Series: Soil Biology, volume 14* (1st ed.). Springer Nature. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-74543-3>
- Katsoyannos, B. I. (1989). Response to shape, size, and color. In: Fruit Flies their biology, natural enemies and control. In A. S. Robinson & G. Hooper (Eds.), *World Crop Pests 3A: Fruit Flies -Their Biology, Natural Enemies and Control* (p. 307). Elsevier B.V.
- Katsoyannos, P. (1992). Olive pests and their control in the Near East. *FAO Plant Production and Protection Paper, No. 115*, ix + 178 pp. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19941102766>
- Katsoyannos, B. I., & Kouloussis, N. A. (2001). Captures of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* on spheres of different colours. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 100(2), 165–172. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.2001.00860.x>
- Keswani, C., Singh, H. B., Hermosa, R., García-Estrada, C., Caradus, J., He, Y. W., Mezaache-Aichour, S., Glare, T. R., Borriss, R., Vinale, F., & Sansinenea, E. (2019). Antimicrobial secondary metabolites from agriculturally important fungi as next biocontrol agents. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 103, Issues 23–24, pp. 9287–9303). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10209-2>
- Kikuchi, Y., Hosokawa, T., Nikoh, N., Meng, X. Y., Kamagata, Y., & Fukatsu, T. (2009). Host-symbiont co-speciation and reductive genome evolution in gut symbiotic bacteria of acanthosomatid stinkbugs. *BMC Biology*, 7(2), 1–22. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-7-2>
- Kikuchi, Y., Hayatsu, M., Hosokawa, T., Nagayama, A., Tago, K., & Fukatsu, T. (2012). Symbiont-mediated insecticide resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(22), 8618–8622. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200231109>
- Kim, H.-J., Vinale, F., Ghisalberti, E. L., Worth, C. M., Sivasithamparam, K., Skelton, B. W., & White, A. H. (2006). An antifungal and plant growth promoting metabolite from a sterile dark ectotrophic fungus. *Phytochemistry*, 67(20), 2277–2280. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.07.022>
- Kittayapong, P., Milne, J., Tigvattananont, S., & Baimai, V. (2000). Distribution of the Reproduction-modifying Bacteria, *Wolbachia*, in Natural Populations of Tephritid Fruit Flies in Thailand. *ScienceAsia*, 26(2), 93. <https://doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2000.26.093>
- Klepzig, K. D., Adams, A. S., Handelsman, J., & Raffa, K. F. (2009). Symbioses: A key driver of insect physiological processes, ecological interactions, evolutionary diversification, and impacts on humans. *Environmental Entomology*, 38(1), 67–77. <https://doi.org/10.1603/022.038.0109>
- Konno, K., Hirayama, C., Yasui, H., & Nakamura, M. (1999). Enzymatic activation of oleuropein: A protein crosslinker used as a chemical defense in the privet tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(16), 9159–9164. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.16.9159>
- Konno, K., Hirayama, C., Shinbo, H., & Nakamura, M. (2009). Glycine addition improves feeding performance of non-specialist herbivores on the privet, *Ligustrum obtusifolium*: In vivo evidence for the physiological impacts of anti-nutritive plant defense with iridoid and insect adaptation with glycine. *Applied Entomology and Zoology*, 44(4), 595–601. <https://doi.org/10.1303/aez.2009.595>
- Konno, K., Hirayama, C., Yasui, H., Okada, S., Sugimura, M., Yukuhiro, F., Tamura, Y., Hattori, M., Shinbo, H., & Nakamura, M. (2010). GABA,  $\beta$ -Alanine and Glycine in the Digestive Juice of Privet-Specialist Insects: Convergent Adaptive Traits Against Plant Iridoids. *Journal of Chemical Ecology*, 36(9), 983–991. <https://doi.org/10.1007/s10886-010-9842-y>
- Koudounas, K., Banilas, G., Michaelidis, C., Demoliou, C., Rigas, S., & Hatzopoulos, P. (2015). A defence-related *Olea europaea*  $\beta$ -glucosidase hydrolyses and activates oleuropein into a potent protein cross-linking agent. *Journal of Experimental Botany*, 66(7), 2093–2106. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv002>

- Kounatidis, I., Papadopoulos, N. T., Mavragani-Tsipidou, P., Cohen, Y., Tertivanidis, K., Nomikou, M., & Nestel, D. (2008). Effect of elevation on spatio-temporal patterns of olive fly (*Bactrocera oleae*) populations in northern Greece. *Journal of Applied Entomology*, 132(9–10), 722–733. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2008.01349.x>
- Kubicek, C. P., Herrera-Estrella, A., Seidl-Seiboth, V., Martinez, D. A., Druzhinina, I. S., Thon, M., Zeilinger, S., Casas-Flores, S., Horwitz, B. A., Mukherjee, P. K., Mukherjee, M., Kredics, L., Alcaraz, L. D., Aerts, A., Antal, Z., Atanasova, L., Cervantes-Badillo, M. G., Challacombe, J., Chertkov, O., ... Grigoriev, I. V. (2011). Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biology*, 12(R40). <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-4-r40>
- Kulkarni, M. G., Light, M. E., & Van Staden, J. (2011). Plant-derived smoke: Old technology with possibilities for economic applications in agriculture and horticulture. *South African Journal of Botany*, 77(4), 972–979. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2011.08.006>
- Lantero, E., Matallanas, B., Pascual, S., Dolores Ochando, M., & Callejas, C. (2020). Phylogeography of organophosphate resistant ace alleles in spanish olive fruit fly populations: A mediterranean perspective in the global change context. *Insects*, 11(6), 1–12. <https://doi.org/10.3390/insects11060396>
- Laubertie, E. A., Wratten, S. D., & Sedcole, J. R. (2006). The role of odour and visual cues in the pan-trap catching of hoverflies (Diptera: Syrphidae). *Annals of Applied Biology*, 148(2), 173–178. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2006.00046.x>
- Lauzon, C. R., Sjogren, R. E., Wright, S., & Prokopy, R. J. (1998). Attraction of *Rhagoletis pomonella* (Diptera: Tephritidae) Flies to Odor of Bacteria: Apparent Confinement to Specialized Members of *Enterobacteriaceae*. *Environmental Entomology*, 27(4), 853–857. <https://doi.org/10.1093/ee/27.4.853>
- Lauzon, C. R., Sjogren, R. E., & Prokopy, R. J. (2000). Enzymatic capabilities of bacteria associated with apple maggot flies: A postulated role in attraction. *Journal of Chemical Ecology*, 26(4), 953–967. <https://doi.org/10.1023/A:1005460225664>
- Lauzon, C. R. (2003). Symbiotic Relationships of Tephritids. In Kostas Bourtzis & T. A. Miller (Eds.), *Insect Symbiosis* (1st ed., Vol. 1, pp. 115–130). CRC Press.
- Lauzon, C. R., Potter, S. E., & Prokopy, R. J. (2003). Degradation and Detoxification of the Dihydrochalcone Phloridzin by *Enterobacter agglomerans*, a Bacterium Associated with the Apple Pest, *Rhagoletis pomonella* (Walsh) (Diptera: Tephritidae). *Environmental Entomology*, 32(5), 953–962. <https://doi.org/10.1603/0046-225X-32.5.953>
- Lauzon, C. R., McCombs, S. D., Potter, S. E., & Peabody, N. C. (2009). Establishment and vertical passage of *Enterobacter (Pantoea) agglomerans* and *Klebsiella pneumoniae* through all life stages of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 102(1), 85–95. <https://doi.org/10.1603/008.102.0109>
- Lee, S., Yap, M., Behringer, G., Hung, R., & Bennett, J. W. (2016). Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma* species mediate plant growth. *Fungal Biology and Biotechnology*, 3(7), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s40694-016-0025-7>
- Lee, H. J., & Ryu, D. (2017). Worldwide Occurrence of Mycotoxins in Cereals and Cereal-Derived Food Products: Public Health Perspectives of Their Co-occurrence. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(33), 7034–7051. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04847>
- Lehmann, J. (2007). A handful of carbon. *Nature*, 447(7141), 143–144. <https://doi.org/10.1038/447143a>
- Lehmann, J., & Joseph, S. (2015). *Biochar for Environmental Management: Science, Technology and Implementation* (Routledge (Ed.); 2nd ed.). Earthscan Publications Ltd.
- Lemos, F. J. A., & Terra, W. R. (1991). Digestion of Bacteria and the Role of Midgut Lysozyme in some Insect Larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology. B, Comparative Biochemistry*, 100(2), 265–268. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(91\)90372-K](https://doi.org/10.1016/0305-0491(91)90372-K)

- Liaropoulos, C., Louskas, C., Canard, M., & Laudeho, Y. (1977). Release of *Opius concolor* [Hym.: Braconidae] on spring populations of *Dacus oleae* [Dipt.: Trypetidae.] - Experiments in continental Greece. *Entomophaga*, 22, 259–264.
- Liscia, A. M., Angioni, P., Sacchetti, P., Poddighe, S., Granchietti, A., Setzu, M. D., & Belcari, A. (2013a). Characterization of olfactory sensilla of the olive fly: Behavioral and electrophysiological responses to volatile organic compounds from the host plant and bacterial filtrate. *Journal of Insect Physiology*, 59(7), 705–716. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2013.04.008>
- Liscia, A. M., Sacchetti, P., Setzu, M. D., Poddeghe, S., De Rose, F., & Belcari, A. (2013b). Palpal receptors of the olive fly *Bactrocera oleae* play a role in foraging behavior and host finding. *European Journal of Histochemistry*, 57(3), 5.
- Liu, L. J., Martinez-Sañudo, I., Mazzon, L., Prabhakar, C. S., Girolami, V., Deng, Y. L., Dai, Y., & Li, Z. (2016). Bacterial communities associated with invasive populations of *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) in China. *Bulletin of Entomological Research*, 106(6), 718–728. <https://doi.org/10.1017/S0007485316000390>
- Lo Scalzo, R., Scarpati, M. L., Verzegnassi, B., & Vita, G. (1994). *Olea europaea* chemicals repellent to *Dacus oleae* females. *Journal of Chemical Ecology*, 20(8), 1813–1823. <https://doi.org/10.1007/BF02066224>
- López-Mondéjar, R., Ros, M., & Pascual, J. A. (2011). Mycoparasitism-related genes expression of *Trichoderma harzianum* isolates to evaluate their efficacy as biological control agent. *Biological Control*, 56(1), 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.10.003>
- Lorito, M., Woo, S. L., Harman, G. E., & Monte, E. (2010). Translation research on *Trichoderma*: from ‘omics to the field. *Annual Review of Phytopathology*, 48(1), 395–417. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114314>
- Lumaret, R., Ouazzani, N., Michaud, H.-A., Vivier, G., Deguilloux, M.-F., & Di Giusto, F. (2004). Allozyme variation of *Oleaster* populations (wild olive tree) (*Olea europaea* L.) in the Mediterranean Basin. *Heredity*, 92(4), 343–351. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800430>
- Luna-Ramirez, K., Skaljic, M., Grotmann, J., Kirfel, P., & Vilcinskis, A. (2017). Orally delivered scorpion antimicrobial peptides exhibit activity against pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) and its bacterial symbionts. *Toxins*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/toxins9090261>
- Lundgren, J. G. (2009). Relationships of Natural Enemies and Non-Prey Foods. In *Relationships of Natural Enemies and Non-Prey Foods*. Springer, Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9235-0>
- Macheleidt, J., Mattern, D. J., Fischer, J., Netzker, T., Weber, J., Schroeckh, V., Valiante, V., & Brakhage, A. A. (2016). Regulation and Role of Fungal Secondary Metabolites. *Annual Review of Genetics*, 50(1), 371–392. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-035203>
- Macías, F. A., Varela, R. M., Simonet, A. M., Cutler, H. G., Cutler, S. J., Eden, M. A., & Hill, R. A. (2000). Bioactive carotenes from *Trichoderma virens*. *Journal of Natural Products*, 63(9), 1197–1200. <https://doi.org/10.1021/np000121c>
- Mahadevan, K., & Farmer, L. (2006). Key odor impact compounds in three yeast extract pastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(19), 7242–7250. <https://doi.org/10.1021/jf061102x>
- Malheiro, R., Ortiz, A., Casal, S., Baptista, P., & Pereira, J. A. (2015). Electrophysiological response of *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera: Tephritidae) adults to olive leaves essential oils from different cultivars and olive tree volatiles. *Industrial Crops and Products*, 77, 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.08.046>
- Malmierca, M. G., Barua, J., McCormick, S. P., Izquierdo-Bueno, I., Cardoza, R. E., Alexander, N. J., Hermosa, R., Collado, I. G., Monte, E., & Gutiérrez, S. (2015a). Novel aspinolide production by *Trichoderma arundinaceum* with a potential role in *Botrytis cinerea* antagonistic activity and plant defence priming. *Environmental Microbiology*, 17(4), 1103–1118. <https://doi.org/10.1111/1462->

- Malmierca, M. G., McCormick, S. P., Cardoza, R. E., Alexander, N. J., Monte, E., & Gutiérrez, S. (2015b). Production of trichodiene by *Trichoderma harzianum* alters the perception of this biocontrol strain by plants and antagonized fungi. *Environmental Microbiology*, *17*(8), 2628–2646. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12506>
- Mannina, L., Segre, A. L., Ritieni, A., Fogliano, V., Vinale, F., Randazzo, G., Maddau, L., & Bottalico, A. (1997). A new fungal growth inhibitor from *Trichoderma viride*. *Tetrahedron*, *53*(9), 3135–3144. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(97\)00024-0](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(97)00024-0)
- Marchini, D., Petacchi, R., & Marchi, S. (2017). *Bactrocera oleae* reproductive biology: New evidence on wintering wild populations in olive groves of Tuscany (Italy). *Bulletin of Insectology*, *70*(1), 121–128.
- Mareida, K. M., Gage, S. H., Landis, D. A., & Wirth, T. M. (1992). Visual response of *Coccinella septempunctata* (L.), *Hippodamia parenthesis* (Say), (Coleoptera: Coccinellidae), and *Chrysoperla carnea* (Stephens), (Neuroptera: Chrysopidae) to colors. *Biological Control*, *2*(3), 253–256. [https://doi.org/10.1016/1049-9644\(92\)90067-N](https://doi.org/10.1016/1049-9644(92)90067-N)
- Margaritopoulos, J. T., Skavdis, G., Kalogiannis, N., Nikou, D., Morou, E., Skouras, P. J., Tsitsipis, J. A., & Vontas, J. (2008). Efficacy of the pyrethroid alpha-cypermethrin against *Bactrocera oleae* populations from Greece, and improved diagnostic for an iAChE mutation. *Pest Management Science*, *64*(9), 900–908. <https://doi.org/10.1002/ps.1580>
- Marra, R., Lombardi, N., D'Errico, G., Troisi, J., Scala, G., Vinale, F., Woo, S. L., Bonanomi, G., & Lorito, M. (2019). Application of *Trichoderma* Strains and Metabolites Enhances Soybean Productivity and Nutrient Content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *67*(7), 1814–1822. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06503>
- Marroquín-Cardona, A. G., Johnson, N. M., Phillips, T. D., & Hayes, A. W. (2014). Mycotoxins in a changing global environment - A review. *Food and Chemical Toxicology*, *69*(April), 220–230. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.04.025>
- Martinez, A. F. C., De Almeida, L. G., Moraes, L. A. B., & Cônsoli, F. L. (2017). Tapping the biotechnological potential of insect microbial symbionts: New insecticidal porphyrins. *BMC Microbiology*, *17*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1054-y>
- Mathivanan, A., Ravikumar, S., & Selvakumar, G. (2019). Bioprospecting of sponge and its symbionts: New tool for mosquitocidal & insecticidal metabolites. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *19*, 101158. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101158>
- Matloub, A. A., Maamoun, A. A., Abdel-Aziz, N. F., Samour, E. A., & El-Rafie, H. M. (2021). Eco-friendly secondary metabolites from *Conyza dioscoridis* against *Spodoptera littoralis*. *Egyptian Journal of Chemistry*, *64*(1), 341–357. <https://doi.org/10.21608/EJCHEM.2020.38753.2798>
- Mazomenos, B. E. (1989). *Dacus oleae*. In: Fruit Flies, their biology, natural enemies and control. In Alan S. Robinson & G. Hooper (Eds.), *ord crop pests Vol. 3A: fruit flies: their biology, natural enemies and control* (1st ed., p. 169). Elsevier Science Publishers.
- Mazomenos, B. E., Pantazi-Mazomenou, A., & Stefanou, D. (2002). Attract and kill of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* in Greece as a part of an integrated control system. *IOBC Wprs Bulletin*, *25*(9), 137–146. <http://phero.net/iobc/samos/bulletin/mazomenos.pdf>
- Mazzei, P., Vinale, F., Woo, S. L., Pascale, A., Lorito, M., & Piccolo, A. (2016). Metabolomics by Proton High-Resolution Magic-Angle-Spinning Nuclear Magnetic Resonance of Tomato Plants Treated with Two Secondary Metabolites Isolated from *Trichoderma*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*(18), 3538–3545. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00801>
- Mazzini, M., & Vita, G. (1981). Identificazione submicroscopica del meccanismo di trasmissione del batterio simbiote in *Dacus oleae* (Gmelin)(Diptera, Trypetidae). *Redia*, *64*, 277–301.

- Mazzon, L., Pisedda, A., Simonato, M., Martinez-Sañudo, I., Squartini, A., & Girolami, V. (2008). Presence of specific symbiotic bacteria in flies of the subfamily Tephritinae (Diptera Tephritidae) and their phylogenetic relationships: Proposal of “*Candidatus Stammerula tephritidis*.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(6), 1277–1287. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65287-0>
- Mazzon, L., Martinez-Sañudo, I., Simonato, M., Squartini, A., Savio, C., & Girolami, V. (2010). Phylogenetic relationships between flies of the Tephritinae subfamily (Diptera, Tephritidae) and their symbiotic bacteria. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 56(1), 312–326. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.02.016>
- Mazzon, L., Martinez-Sañudo, I., Savio, C., Simonato, M., & Squartini, A. (2011). *Stammerula* and Other Symbiotic Bacteria within the Fruit Flies Inhabiting *Asteraceae* Flowerheads. In E. Zchori-Fein & K. Bourtzis (Eds.), *Manipulative tenants bacteria associated with Arthropods* (1st ed., Issue July, pp. 1–136). CRC press, Taylor and Francis Group. <https://doi.org/10.1201/b11008-10>
- Messina, F. J., & Jones, V. P. (1990). Relationship between Fruit Phenology and Infestation by the Apple Maggot (Diptera: Tephritidae) in Utah. *Annals of the Entomological Society of America*, 83(4), 742–752. <https://doi.org/10.1093/aesa/83.4.742>
- Migheli, Q., González-Candelas, L., Dealessi, L., Camponogara, A., & Ramón-Vidal, D. (1998). Transformants of *Trichoderma longibrachiatum* overexpressing the  $\beta$ -1,4-endoglucanase gene *egl1* show enhanced biocontrol of *Pythium ultimum* on cucumber. *Phytopathology*, 88(7), 673–677. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1998.88.7.673>
- Min, K. T., & Benzer, S. (1997). *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(20), 10792–10796. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.20.10792>
- Miranda, M. A., Miquel, M., Terrassa, J., Melis, N., & Monerris, M. (2008). Parasitism of *Bactrocera oleae* (Diptera; Tephritidae) by *Psytalia concolor* (Hymenoptera; Braconidae) in the Balearic Islands (Spain). *Journal of Applied Entomology*, 132(9–10), 798–805. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2008.01358.x>
- Miyazaki, S., Mallory Boush, G., & Baerwald, R. J. (1968). Amino acid synthesis by *Pseudomonas melophthora*, bacterial symbiote of *Rhagoletis pomonella* (Diptera). *Journal of Insect Physiology*, 14(4), 513–518. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(68\)90066-8](https://doi.org/10.1016/0022-1910(68)90066-8)
- Monastero, R., & Delanoue, P. (1966). Un grande esperimento di lotta biologica artificiale contro la mosca delle olive (*Dacus oleae* Gmel.) a mezzo dell’ *Opius concolor* Sz. siculus Mon. in Sicilia (Palmero, luglio-ottobre 1966). *Boll. Ist. Entomol. Agr. Oss. Fitopatol.*, 6, 1–52.
- Montiel Bueno, A., & Jones, O. T. (2002a). Alternative methods for controlling the olive fly *Bactrocera Olea* involving semiochemicals. *IOBC/WPRS Bulletin*, 25, 1–11.
- Montiel Bueno, A., & Jones, O. T. (2002b). *Use of pheromones and other semiochemicals in integrated production IOBC wprs Bulletin Alternative methods for controlling the olive fly, Bactrocera oleae, involving semiochemicals* (Vol. 25).
- Moran, N. A., & Telang, A. (1998). Bacteriocyte-Associated symbiotic of insects: A variety of insect groups harbor ancient prokaryotic endosymbionts. *BioScience*, 48(4), 295–304. <https://doi.org/10.2307/1313356>
- Moran, N. A., & Baumann, P. (2000). Bacterial endosymbionts in animals. *Current Opinion in Microbiology*, 3(3), 270–275. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00088-6](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00088-6)
- Moran, N. A., & Wernegreen, J. J. (2000). Lifestyle evolution in symbiotic bacteria: insights from genomics. *Trends in Ecology & Evolution*, 15(8), 321–326.
- Moran, N. A., & Degnan, P. H. (2006). Functional genomics of *Buchnera* and the ecology of aphid hosts. *Molecular Ecology*, 15(5), 1251–1261. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02744.x>

- Moran, N. A., McCutcheon, J. P., & Nakabachi, A. (2008). Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Annual Review of Genetics*, 42(1), 165–190. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.41.110306.130119>
- Mourikis, P. A., & Fytizas, E. (1970). Review of olive-fly ecology in relation to the sterile-male technique. *Proceedings of the Sterile-Male Technique Control Fruit Flies*, 131–139.
- Mouzaki, D. G., & Margaritis, L. H. (1987). Comparative structural study of the egg-shell (chorion) in *Dacus oleae*, *Rhagoletis cerasi*, *Ceratitis capitata* and *Eurytoma amygdali*. *Fruit Flies: Proceedings of the Second International Symposium, 16-21 September 1986, Colymbari, Crete, Greece*, 79–87. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302058056>
- Mouzaki, D. G., Zarani, F. E., & Margaritis, L. H. (1991). Structure and morphogenesis of the eggshell and micropylar apparatus in the olive fly, *Dacus oleae* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Morphology*, 209(1), 39–52. <https://doi.org/10.1002/jmor.1052090105>
- Mukherjee, M., Mukherjee, P. K., & Kale, S. P. (2007). cAMP signalling is involved in growth, germination, mycoparasitism and secondary metabolism in *Trichoderma virens*. *Microbiology*, 153(6), 1734–1742. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/005702-0>
- Mukherjee, P. K., Latha, J., Hadar, R., & Horwitz, B. A. (2003). TmkA, a mitogen-activated protein kinase of *Trichoderma virens*, is involved in biocontrol properties and repression of conidiation in the dark. *Eukaryotic Cell*, 2(3), 446–455. <https://doi.org/10.1128/EC.2.3.446-455.2003>
- Mukherjee, P. K., Buensanteai, N., Moran-Diez, M. E., Druzhinina, I. S., & Kenerley, C. M. (2012a). Functional analysis of non-ribosomal peptide synthetases (NRPSs) in *Trichoderma virens* reveals a polyketide synthase (PKS)/NRPS hybrid enzyme involved in the induced systemic resistance response in maize. *Microbiology*, 158(1), 155–165. <https://doi.org/10.1099/mic.0.052159-0>
- Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., & Kenerley, C. M. (2012b). Secondary metabolism in *Trichoderma* - A genomic perspective. *Microbiology*, 158(1), 35–45. <https://doi.org/10.1099/mic.0.053629-0>
- Müller, F. A., Dias, N. P., Gottschalk, M. S., Garcia, F. R. M., & Nava, D. E. (2019). Potential distribution of *Bactrocera oleae* and the parasitoids *Opius arisanus* and *Psytalia concolor*, aiming at classical biological control. *Biological Control*, 132, 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.02.014>
- Mutawila, C., Vinale, F., Halleen, F., Lorito, M., & Mostert, L. (2016). Isolation, production and in vitro effects of the major secondary metabolite produced by *Trichoderma* species used for the control of grapevine trunk diseases. *Plant Pathology*, 65(1), 104–113. <https://doi.org/10.1111/ppa.12385>
- Naganawa, H., Takita, T., Suzuki, A., Tamura, S., Lee, S., & Izumiya, N. (1976). Conformational studies of destruxins, insecticidal cyclopeptides. *Agricultural and Biological Chemistry*, 40(11), 2223–2229. <https://doi.org/10.1080/00021369.1976.10862371>
- Nardi, F., Carapelli, A., Dallai, R., Roderick, G. K., & Frati, F. (2005). Population structure and colonization history of the olive fly, *Bactrocera oleae* (Diptera, Tephritidae). *Molecular Ecology*, 14(9), 2729–2738. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02610.x>
- Nardi, F., Carapelli, A., Boore, J. L., Roderick, G. K., Dallai, R., & Frati, F. (2010). Domestication of olive fly through a multi-regional host shift to cultivated olives: Comparative dating using complete mitochondrial genomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57(2), 678–686. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.08.008>
- Navarro-Llopis, V., Alfaro, C., Primo, J., & Vacas, S. (2011). Response of two tephritid species, *Bactrocera oleae* and *Ceratitis capitata*, to different emission levels of pheromone and parapheromone. *Crop Protection*, 30(7), 913–918. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.03.007>
- Navia, R., & Crowley, D. E. (2010). Closing the loop on organic waste management: Biochar for agricultural land application and climate change mitigation. *Waste Management and Research*, 28(6), 479–480. <https://doi.org/10.1177/0734242X10370928>

- Neuenschwander, P., & Michelakis, S. (1978). The infestation of *Dacus oleae* (Gmel.) (Diptera, Tephritidae) at harvest time and its influence on yield and quality of olive oil in Crete. *Zeitschrift Für Angewandte Entomologie*, 86(1–4), 420–433. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1978.tb01948.x>
- Neuenschwander, P., & Michelakis, S. (1979). Determination of the lower thermal thresholds and day-degree requirements for eggs and larvae of *Dacus oleae* (Gmel.) (Diptera: Tephritidae) under field conditions in Crete, Greece. *Mitteilungen Der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft*, 52(1), 57–74.
- Neuenschwander, P., Michelakis, S., & Bigler, F. (1981). Abiotic Factors Affecting Mortality of *Dacus oleae* Larvae and Pupae in the Soil. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 30(1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1981.tb03577.x>
- Neuenschwander, P. (1982). Beneficial Insects Caught By Yellow Traps Used in Mass-Trapping of the Olive Fly, *Dacus oleae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 32(3), 286–296. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1982.tb03220.x>
- Neuenschwander, P., Michelakis, S., Holloway, P., & Berchtol, W. (1985). Factors affecting the susceptibility of fruits of different olive varieties to attack by *Dacus oleae* (Gmel.) (Dipt., Tephritidae). *Zeitschrift Für Angewandte Entomologie*, 100(1–5), 174–188. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1985.tb02770.x>
- Newton, C., Lorre, C., Sauvage, C., Ivorra, S., & Terral, J.-F. (2014). On the origins and spread of *Olea europaea* L. (olive) domestication: evidence for shape variation of olive stones at Ugarit, Late Bronze Age, Syria—a window on the Mediterranean Basin and on the westward diffusion of olive varieties. *Vegetation History and Archaeobotany*, 23, 567–575. <https://doi.org/10.1007/s00334-013-0412-4>
- Nieto-Jacobo, M. F., Steyaert, J. M., Salazar-Badillo, F. B., Vi Nguyen, D., Rostás, M., Braithwaite, M., de Souza, J. T., Jimenez-Bremont, J. F., Ohkura, M., Stewart, A., & Mendoza-Mendoza, A. (2017). Environmental growth conditions of *Trichoderma* spp. Affects indole acetic acid derivatives, volatile organic compounds, and plant growth promotion. *Frontiers in Plant Science*, 8(February), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00102>
- Noce, M. E., Belfiore, T., Scalercio, S., Vizzarri, V., & Iannotta, N. (2009). Efficacy of new mass-trapping devices against *Bactrocera oleae* (Diptera tephritidae) for minimizing pesticide input in agroecosystems. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 44(5), 442–448. <https://doi.org/10.1080/03601230902935105>
- Noce, M. E., Perri, E., Scalercio, S., & Iannotta, N. (2014). Phenolic compounds and susceptibility of olive cultivars to *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) infestations and complementary aspects: A review. *Acta Horticulturae*, 1057, 177–183. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1057.21>
- Norrbom, A., Carroll, L. E., Thompson, F. C., White, I. M., & Freidberg, A. (1999). Status of knowledge. In F. C. Thompson (Ed.), *Fruit fly expert identification system and systematic information database. Series: MYIA Volume: 9* (1st ed., pp. 9–48). Backhuys.
- Novak, J. M., Busscher, W. J., Watts, D. W., Amonette, J. E., Ippolito, J. A., Lima, I. M., Gaskin, J., Das, K. C., Steiner, C., Ahmedna, M., Rehrah, D., & Schomberg, H. (2012). Biochars impact on soil-moisture storage in an ultisol and two aridisols. *Soil Science*, 177(5), 310–320. <https://doi.org/10.1097/SS.0b013e31824e5593>
- O'Neill, S. L., Giordano, R., Colbert, A. M. E., Karr, T. L., & Robertson, H. M. (1992). 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(7), 2699–2702. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.7.2699>
- Oleszczuk, P., Rycaj, M., Lehmann, J., & Cornelissen, G. (2012). Influence of activated carbon and biochar on phytotoxicity of air-dried sewage sludges to *Lepidium sativum*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 80, 321–326. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.03.015>
- Oliver, K. M., Degnan, P. H., Burke, G. R., & Moran, N. A. (2010). Facultative symbionts in aphids and the

- horizontal transfer of ecologically important traits. *Annual Review of Entomology*, 55, 247–266. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085305>
- Oramahi, H. A., & Yoshimura, T. (2013). Antifungal and antitermitic activities of wood vinegar from *Vitex pubescens* Vahl. *Journal of Wood Science*, 59(4), 344–350. <https://doi.org/10.1007/s10086-013-1340-8>
- Oramahi, H. A., Yoshimura, T., Diba, F., Setyawati, D., & Nurhaida. (2018). Antifungal and antitermitic activities of wood vinegar from oil palm trunk. *Journal of Wood Science*, 64(3), 311–317. <https://doi.org/10.1007/s10086-018-1703-2>
- Oramahi, H. A., Yoshimura, T., Rusmiyanto, E., & Wardoyo, P. (2020). Antifungal and Antitermitic Activities of Vinegars From Two Biomass Resources At Different Pyrolytic Temperatures. *Journal of Applied Biological Sciences E*, 14(1), 26–38. <https://orcid.org/0000-0002-7067-5105>
- Ordano, M., Engelhard, I., Rempoulakis, P., Nemny-Lavy, E., Blum, M., Yasin, S., Lensky, I. M., Papadopoulou, N. T., & Nestel, D. (2015). Olive Fruit Fly (*Bactrocera oleae*) Population Dynamics in the Eastern Mediterranean: Influence of Exogenous Uncertainty on a Monophagous Frugivorous Insect. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127798>
- Ordentlich, A., Wiesman, Z., Gottlieb, H. E., Cojocar, M., & Chet, I. (1992). Inhibitory furanone produced by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Phytochemistry*, 31(2), 485–486. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(92\)90021-H](https://doi.org/10.1016/0031-9422(92)90021-H)
- Pais, R., Lohs, C., Wu, Y., Wang, J., & Aksoy, S. (2008). The obligate mutualist *Wigglesworthia glossinidia* influences reproduction, digestion, and immunity processes of its host, the tsetse fly. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(19), 5965–5974. <https://doi.org/10.1128/AEM.00741-08>
- Pan, R., Bai, X., Chen, J., Zhang, H., & Wang, H. (2019). Exploring structural diversity of microbe secondary metabolites using OSMAC strategy: A literature review. *Frontiers in Microbiology*, 10(FEB), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00294>
- Pape, T., & Thompson, F. C. (2020). Systema Dipteroform (ver. 2.0). In Y. Roskov, G. Ower, T. Orrell, D. Nicolson, N. Bailly, P. M. Kirk, T. Bourgoin, R. E. DeWalt, W. Decock, E. J. Van Nieuwerkerken, & L. Penev (Eds.), *Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2020-08-01 Beta*. Species 2000: Naturalis.
- Pascale, A., Vinale, F., Manganiello, G., Nigro, M., Lanzuise, S., Ruocco, M., Marra, R., Lombardi, N., Woo, S. L., & Lorito, M. (2017). *Trichoderma* and its secondary metabolites improve yield and quality of grapes. *Crop Protection*, 92, 176–181. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.11.010>
- Pascual, S., Sánchez-Ramos, I., & González-Núñez, M. (2010). Repellent/deterrent effect of kaolin and copper on *Bactrocera oleae* oviposition in the laboratory. In A. Kalaitzaki & K. Minichalis (Eds.), *Integrated Protection of Olive Crops. Proceedings of the Meeting at Cordoba, Spain, 1-4 June 2009*. (Vol. 59, pp. 83–88). International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants (OIBCOILB), West Palaearctic Regional Section (WPRS/SROP).
- Pavlidis, N., Gioti, A., Wybouw, N., Dermauw, W., Ben-Yosef, M., Yuval, B., Jurkevitch, E., Kampouraki, A., Van Leeuwen, T., & Vontas, J. (2017). Transcriptomic responses of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* and its symbiont *Candidatus Erwinia dacicola* to olive feeding. *Scientific Reports*, 7(January), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep42633>
- Pennise, D. M., Smith, K. R., Kithinji, J. P., Rezende, M. E., Raad, T. J., Zhang, J., & Fan, C. (2001). Emissions of greenhouse gases and other airborne pollutants from charcoal making in Kenya and Brazil. *Journal of Geophysical Research Atmospheres*, 106(D20), 24143–24155. <https://doi.org/10.1029/2000JD000041>
- Pentzold, S., Zagrobelny, M., Rook, F., & Bak, S. (2014). How insects overcome two-component plant chemical defence: Plant  $\beta$ -glucosidases as the main target for herbivore adaptation. *Biological Reviews*, 89(3), 531–551. <https://doi.org/10.1111/brv.12066>
- Pereira, J. A., Rui Alves, M., Casal, S., & Oliveira, M. (2004). Effect of olive fruit fly infestation on the

quality of olive oil from Chemlali *cultivar* during ripening. *Italian Journal of Food Science*, 3(16), 355–365. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.08.031>

- Perri, E., Iannotta, N., Muzzalupo, I., Russo, A., Caravita, M. A., Pellegrino, M., Parise, A., & Tucci, P. (2006). Kaolin protects olive fruits from *Bactrocera oleae* (Gmelin) infestations unaffacting olive oil quality. *IOBC/WPRS Bulletin, October 2005*. <http://orgprints.org/10205/>
- Petacchi, R., Rizzi, I., & Guidotti, D. (2003). The “lure and kill” technique in *Bactrocera oleae* (Gmel.) control: Effectiveness indices and suitability of the technique in area-wide experimental trials. *International Journal of Pest Management*, 49(4), 305–311. <https://doi.org/10.1080/0967087031000155648>
- Petri, L. (1907). In qual modo il bacillo della mosca olearia venga trasmesso dall’adulto alla larva. *Atti Della Reale Accademia Dei Lincei Classe Dei Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali*, 16, 899–900.
- Petri, L. (1909). *Ricerche sopra i batteri intestinali della mosca Olearia*. Tipografia nazionale di G. Bertero. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300400747>
- Phillips, V. T. (1946). The biology and identification of Trypetid Larvae (Diptera: Trypetidae). In *Memoirs of the American Entomological Society* 12 (pp. 1–161). American Entomological Society. <https://www.amazon.com/biology-identification-Trypetid-Larvae-Diptera/dp/B0007ESZ56>
- Pietri, J. E., & Liang, D. (2020). Insecticidal activity of doxycycline against the common bedbug. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(5), 1–6. <https://doi.org/10.1128/AAC.00005-20>
- Pons, I., Garrault, C., Jaubert, J. N., Morel, J., & Fenyo, J. C. (1991). Analysis of Aromatic Caramel. *Food Chemistry*, 39(3), 311–320. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(91\)90148-H](https://doi.org/10.1016/0308-8146(91)90148-H)
- Poole, P. R., Ward, B. G., & Whitaker, G. (1998). The effects of topical treatments with 6-pentyl-2-pyrone and structural analogues on stem end postharvest rots in kiwifruit due to *Botrytis cinerea*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77(1), 81–86. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199805\)77:1<81::AID-JSFA6>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199805)77:1<81::AID-JSFA6>3.0.CO;2-5)
- Preu, M., Frieß, J. L., Breckling, B., & Schröder, W. (2020). Case Study 1: Olive Fruit Fly (*Bactrocera oleae*). In A. von Gleich & W. Schröder (Eds.), *Gene Drives at Tipping Points: Precautionary Technology Assessment and Governance of New Approaches to Genetically Modify Animal and Plant Populations* (pp. 79–101). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-38934-5\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-030-38934-5_4)
- Prokopy, R. J., Economopoulos, A. P., & McFadden, M. W. (1975). Attraction of Wild and Laboratory-cultured *Dacus oleae* flies to small rectangles of different hues, shades and tints. *Entomologia Applicata. Vol. 3\2, 18(10)*, 141–152.
- Prokopy, R. J., Papaj, D. R., Díaz-Fleischer, F., Aluja, M., Norrbom, A. L., Papaj, D. R., Prokopy, R. J., Norrbom, A. L., & Aluja, M. (2000). Evolution of Fruit Fly Oviposition Behavior. In Martín Aluja & A. L. Norrbom (Eds.), *Fruit Flies (Tephritidae): Phylogeny and Evolution of Behavior* (Issue January, pp. 811–849). CRC press. <https://doi.org/10.1201/9781420074468.ch30>
- Prophetou-Athanasiadou, D. A., Tzanakakis, M. E., Myroyannis, D., & Sakas, G. (1991). Deterrence of oviposition in *Dacus oleae* by copper hydroxide. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 61(1), 1–5. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1991.tb02389.x>
- Qi-Cun, X., Huang, R., Chen, Y.-W., Miao, C.-P., Ma, K.-X., Tang, W., & Wu, S.-H. (2014a). Cyclonerol derivatives from *Trichoderma longibrachiatum* YM311505. *Natural Product Communications*, 9(3), 313–314. <https://doi.org/10.1177/1934578x1400900307>
- Qi-Cun, X., Huang, R., Miao, C.-P., Chen, Y.-W., Zhai, Y.-Z., Song, F., Wang, T., & Shao-Hua. (2014b). Secondary metabolites of endophytic fungus *Trichoderma sp.* YM 311505 of *Azadirachta indica*. *Chemistry of Natural Compounds* 50(5), 749–751.
- Ragaglini, G., Tomassone, D., & Petacchi, R. (2007). Can spring-preventive adulticide treatments be

assumed to improve *Bactrocera oleae* ( Rossi ) management ? Meeting IOBC / WPRS Working Group “Integrated Protection of Olive Crops”. *Bulletin OILB Srop*, 30(9), 309–314.

- Rajagopal, R., & Bhatnagar, R. K. (2002). Insecticidal toxic proteins produced by *Photorhabdus luminescens akhurstii*, a symbiont of *Heterorhabditis indica*. *Journal of Nematology*, 34(1), 23–27.
- Ramamurthy, V., & Krishnaveni, S. (2014). Larvicidal efficacy of leaf extracts of *Heliotropium Indicum* and *Mukia maderaspatana* against the dengue fever mosquito vector *Aedes aegypti*. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 2(5), 40–45.
- Ramírez-Valdespino, C. A., Casas-Flores, S., & Olmedo-Monfil, V. (2019). *Trichoderma* as a model to study effector-like molecules. *Frontiers in Microbiology*, 10(MAY), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01030>
- Ras, E., Beukeboom, L. W., Cáceres, C., & Bourtzis, K. (2017). Review of the role of gut microbiota in mass rearing of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, and its parasitoids. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 164(3), 237–256. <https://doi.org/10.1111/eea.12609>
- Raspi, A., & Loni, A. (1994). Alcune note sull'allevamento di *Opius concolor* Szépl. (Hymenoptera Braconidae) e su recenti tentativi d'introduzione della specie in Toscana e Liguria. *Frustula Entomologica*, 133–145.
- Raspi, A., Canale, A., & Felicioli, A. (1997). Relationship between the photoperiod and the presence of mature eggs in *Bactrocera oleae* (Gmel.) (Diptera Tephritidae). *IOBC/WPRS Bulletin*, 20, 46–54.
- Raspi, A., Iacono, E., & Canale, A. (2002). Variable photoperiod and presence of mature eggs in olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera Tephritidae). *Redia*, 85, 111–119.
- Rattanapun, W., Amornsak, W., & Clarke, A. (2009). *Bactrocera dorsalis* Preference for and performance on two mango varieties at three stages of ripeness. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 131(3), 243–253.
- Reino, J. L, Guerrero, R. F., Hernández-Galán, R. & Collado, I. G. (2008) Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry Reviews*, 7, 89-123. <https://doi.org/10.1007/s11101-006-9032-2>
- Reza Abbasi Mojdehi, M., Akbar Keyhanian, A., & Rafiei, B. (2021). Application of oviposition deterrent compounds for the control of olive fruit fly , *Bactrocera oleae* Rossi ( Dip . Tephritidae ) control. *International Journal of Tropical Insect Science*, 2011, 1–8. <https://doi.org/10.1007/s42690-021-00518-3>
- Rice, R. E. (2000). Bionomics of the Olive Fruit Fly *Bactrocera (Dacus) oleae*. *UC Plant Protection Quarterly*, 10(3), 1–5.
- Rice, R. E., Phillips, P. A., Stewart-Leslie, J., & Sibbett, G. S. (2003). Olive fruit fly populations measured in Central and Southern California. *California Agriculture*, 57(4), 122–127. <https://doi.org/10.3733/ca.v057n04p122>
- Riegler, M., & Stauffer, C. (2002). *Wolbachia* infections and superinfections in cytoplasmically incompatible populations of the European cherry fruit fly *Rhagoletis cerasi* (Diptera, Tephritidae). *Molecular Ecology*, 11, 2425–2434. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01614.x>
- Rigaud, T. (1997). Inherited microorganisms and sex determination of arthropod hosts. In S. L. O’Neill, A. A. Hoffmann, & J. H. Werren (Eds.), *Influent passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction* (pp. 81–101). Oxford University Press.
- Rizzo, R., & Caleca, V. (2006). Resistance to the attack of *Bactrocera oleae* (Gmelin) of some sicilian olive cultivars. *Olivebioteq 2006 - Second International Seminar Biotechnology and Quality of Olive Tree Products around the Mediterranean Basin - November 5th – 10th – Mazara Del Vallo, Marsala (Italy)*, II(January), 35–42.
- Rizzo, R., Lo Verde, G., Sinacori, M., Maggi, F., Cappellacci, L., Petrelli, R., Vittori, S., Reza Morshedloo,

- M., Yvette Fofie, N. G. B., & Benelli, G. (2020). Developing green insecticides to manage olive fruit flies? Ingestion toxicity of four essential oils in protein baits on *Bactrocera oleae*. *Industrial Crops and Products*, *143*, 111884. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111884>
- Robacker, D. C., & Lauzon, C. R. (2002). Purine metabolizing capability of *Enterobacter agglomerans* affects volatiles production and attractiveness to Mexican fruit fly. *Journal of Chemical Ecology*, *28*(8), 1549–1563. <https://doi.org/10.1023/A:1019920328062>
- Rocha, L. S., De Oliveira Mascarenhas, R., Perondini, A. L. P., & Selivon, D. (2005). Ocorrência de *Wolbachia* em amostras Brasileiras da mosca-do-mediterrâneo, *Ceratitidis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). *Neotropical Entomology*, *34*(6), 1013–1015. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2005000600020>
- Rohlf, M., & Churchill, A. C. L. (2011). Fungal secondary metabolites as modulators of interactions with insects and other arthropods. *Fungal Genetics and Biology*, *48*(1), 23–34. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.08.008>
- Rosi, M. C., Sacchetti, P., Librandi, M., & Belcari, A. (2007). Effectiveness of different copper products against the olive fly in organic olive groves. *Integrated Protection of Olive Crops IOBC/Wprs Bulletin*, *30*(9), 277–281.
- Rotundo, G., Germinara, G. S., De Cristofaro, A., & Rama, F. (2001). Identificazione di composti volatili in estratti da diverse cultivar di *Olea europaea* L. biologicamente attivi su *Bactrocera oleae* (Gmelin) (Diptera: Tephritidae). *Bollettino Del Laboratorio Di Entomologia Agraria Filippo Silvestri*, *57*, 25–34.
- Ruiz Castro, A. (1948). *Fauna entomológica del olivo en España: estudio sistemático-biológico de las especies de mayor importancia económica, Volumi 1-2* (1st ed.). Instituto Español de Entomología.
- Ruocco, M., Lanzuise, S., Vinale, F., Marra, R., Turrà, D., Woo, S. L., & Lorito, M. (2009). Identification of a new biocontrol gene in *Trichoderma atroviride*: The role of an ABC transporter membrane pump in the interaction with different plant-pathogenic fungi. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *22*(3), 291–301. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-3-0291>
- Russell, J. A., Latorre, A., Sabater-Muñoz, B., Moya, A., & Moran, N. A. (2003). Side-stepping secondary symbionts: Widespread horizontal transfer across and beyond the Aphidoidea. *Molecular Ecology*, *12*(4), 1061–1075. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01780.x>
- Sacchetti, P. (2003). Mosca delle olive e la simbiosi batterica - Arsia. In *Informatore Fitopatologico* (Vol. 9, pp. 55–59).
- Sacchetti, P., Belcari, A., & Del Pianta, R. (2004). Utilizzo di prodotti ad azione antibatterica per il controllo della mosca delle olive. *La Difesa Dai Fitofagi in Condizioni Di Olivicoltura Biologica, Atti Accademia Nazionale Dell'Olivo e Dell'Olio, Spoleto, 29-30 October 2002*, 23–33.
- Sacchetti, P., Landini, S., Granchietti, A., Camèra, A., Rosi, M. C., & Belcari, A. (2007). Attractiveness to the olive fly of *Pseudomonas putida* isolated from the foregut of *Bactrocera oleae*. *IOBC/WPRS Bulletin*, *30*(9), 37–42.
- Sacchetti, P., Granchietti, A., Landini, S., Viti, C., Giovannetti, L., & Belcari, A. (2008). Relationships between the olive fly and bacteria. *Journal of Applied Entomology*, *132*(9–10), 682–689. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2008.01334.x>
- Sacchetti, P., Liscia, A. M., Pastorelli, R., Bigiotti, G., Guidi, R., & Belcari, A. (2016). Le simbiosi batteriche nella mosca delle olive *Bactrocera oleae*: dalla ricerca di base allo sviluppo di nuove strategie di controllo. *Atti Accademia Nazionale Italiana di Entomologia, Anno LXIV* 93–98.
- Saleem, S., Muhammad, G., Hussain, M. A., & Bukhari, S. N. A. (2018). A comprehensive review of phytochemical profile, bioactives for pharmaceuticals, and pharmacological attributes of *Azadirachta indica*. *Phytotherapy Research*, *32*(7), 1241–1272. <https://doi.org/10.1002/ptr.6076>

- Salima, B., Hachemi, B., & Zineb, B. (2016). Insecticidal activity of *Inula viscosa* L.(Asteraceae) essential oils on adults of *Bactrocera oleae* Gmel (Diptera Tephritidae). *Journal of Global Agriculture and Ecology*, 5(4), 225–230.
- Salvadori, J. D. M., Defferrari, M. S., Ligabue-Braun, R., Yamazaki Lau, E., Salvadori, J. R., & Carlini, C. R. (2012). Characterization of entomopathogenic nematodes and symbiotic bacteria active against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and contribution of bacterial urease to the insecticidal effect. *Biological Control*, 63(3), 253–263. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.08.002>
- Samuels, G. J. (1996). *Trichoderma*: A review of biology and systematics of the genus. *Mycological Research*, 100(8), 923–935. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(96\)80043-8](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(96)80043-8)
- Saour, G., & Makee, H. (2004). A kaolin-based particle film for suppression of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* Gmelin (Dip., Tephritidae) in olive groves. *Journal of Applied Entomology*, 128(1), 28–31. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0418.2003.00803.x>
- Saridaki, A., & Bourtzis, K. (2010). *Wolbachia*: more than just a bug in insects genitals. *Current Opinion in Microbiology*, 13(1), 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.11.005>
- Savio, C., Mazzon, L., Martinez-Sañudo, I., Simonato, M., Squartini, A., & Girolami, V. (2012). Evidence of two lineages of the symbiont “*Candidatus Erwinia dacicola*” in Italian populations of *Bactrocera oleae* (Rossi) based on 16S rRNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(1), 179–187. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.030668-0>
- Selivon, D., Perondini, A. P., Ribeiro, A. F., Marino, C. L., Lima, M. M. A., & Coscrato, V. E. (2002). *Wolbachia* endosymbiont in a species of the *Anastrepha fraterculus* complex (diptera: Tephritidae). *Invertebrate Reproduction and Development*, 42(2–3), 121–127. <https://doi.org/10.1080/07924259.2002.9652768>
- Sergeeva, V. (2014). Effective environmentally-sensitive pest management in olive production. In S. A. Ncare & M. A. Aarinena (Eds.), *5th International Conference on “Olive Culture, Biotechnology and Quality of Olive Tree Products”* (pp. 319–325).
- Sha, S., Liu, L., Pan, S., & Wang, W. (2013). Isolation and purification of antifungal components from *Trichoderma harzianum* ferment broth by high-speed counter-current chromatography. *Chinese Journal of Biological Control*, 29(1), 83–88.
- Sharma, P., Vignesh Kumar, P., Ramesh, R., Saravanan, K., Deep, S., Sharma, M., Mahesh, S., & Dinesh, S. (2011). Biocontrol genes from *Trichoderma* species: A review. *African Journal of Biotechnology*, 10(86), 19898–19907. <https://doi.org/10.5897/AJBX11.041>
- Shentu, X., Zhan, X., Ma, Z., Yu, X., & Zhang, C. (2014). Antifungal activity of metabolites of the endophytic fungus *Trichoderma brevicompactum* from garlic. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(1), 248–254. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014005000036>
- Shi, W.-L., Xiu-Lan, C., Wang, L.-X., Gong, Z.-T., Li, S., Li, C.-L., Xie, B.-B., Zhang, W., Shi, M., Li, C., Zhang, Y.-Z., & Song, X.-Y. (2016). Cellular and molecular insight into the inhibition of primary root growth of *Arabidopsis* induced by peptaibols, a class of linear peptide antibiotics mainly produced by *Trichoderma* spp. *Journal of Experimental Botany*, 67(8), 2191–2205. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw023>
- Shi, Y., Shentu, X., & Yu, X. (2009). Identification of an endophytic fungus isolated from *Ilex cornuta* and the biocontrol effects of its secondary metabolite. *Acta Phytopathologica Sinica*, 39(4), 362–367.
- Sieber, S., Carlier, A., Neuburger, M., Grabenweger, G., Eberl, L., & Gademann, K. (2015). Isolation and Total Synthesis of Kirkamide, an Aminocyclitol from an Obligate Leaf Nodule Symbiont. *Angewandte Chemie - International Edition*, 54(27), 7968–7970. <https://doi.org/10.1002/anie.201502696>
- Silva, F. J., Moret, A., Neef, A., & Belda, E. (2008). Bacterial microbiota associated with a *Bactrocera oleae* population from eastern Spain. In M. A. Miranda-Chueca (Ed.), *First meeting of TEAM, Palma de Mallorca 7–8th April. Abstract book, Vol. 15*.

- Simon, A., Dunlop, R. W., Ghisalberti, E. L., & Sivasithamparam, K. (1988). *Trichoderma koningii* produces a pyrone compound with antibiotic properties. *Soil Biology and Biochemistry*, 20(2), 263–264. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(88\)90050-8](https://doi.org/10.1016/0038-0717(88)90050-8)
- Sinno, M., Bézier, A., Vinale, F., Giron, D., Laudonia, S., Garonna, A. Pietro, & Pennacchio, F. (2020). Symbiosis disruption in the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Rossi), as a potential tool for sustainable control. *Pest Management Science, February*. <https://doi.org/10.1002/ps.5875>
- Sivasithamparam, K., & Ghisalberti, E. L. (1998). Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In C. P. Kubicek & G. E. Harman (Eds.), *Trichoderma and Gliocladium -Volume 1 Basic biology, taxonomy and genetics* (pp. 139–141). Taylor and Francis Ltd, London.
- Skouras, P. J., Margaritopoulos, J. T., Seraphides, N. A., Ioannides, I. M., Kakani, E. G., Mathiopoulos, K. D., & Atsitsipis, J. (2006). Organophosphate resistance in olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, populations in Greece and Cyprus. *Pest Management Science*, 63(1), 42–48. <https://doi.org/10.1002/ps.1306>
- Smith, A. H., Zoetendal, E., & Mackie, R. I. (2005). Bacterial mechanisms to overcome inhibitory effects of dietary tannins. *Microbial Ecology*, 50(2), 197–205. <https://doi.org/10.1007/s00248-004-0180-x>
- Spanedda, A. F., & Terrosi, A. (2004). Population dynamics of *Bactrocera oleae* adults in central Italy. *V International Symposium on Olive Growing*, 791, 611–617. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2008.791.94>
- Stammer, H. J. (1929). Die bakteriensymbiose der trypetiden (Diptera). *Zeitschrift Für Morphologie Und Ökologie Der Tiere*, 15(3), 485–523. <https://doi.org/10.1007/BF00410561>
- Stasinakis, P., Katsares, V., & Mavragani-Tsipidou, P. (2001). Organophosphate resistance and allelic frequencies of esterases in the olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Agricultural and Urban Entomology*, 18(3), 157–168.
- Stouthamer, R., Luck, R. F., & Hamilton, W. D. (1990). Antibiotics cause parthenogenetic *Trichogramma* (hymenoptera/trichogrammatidae) to revert to sex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(7), 2424–2427. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.7.2424>
- Stouthamer, R., Breeuwer, J. A. J., & Hurst, G. D. D. (1999). *Wolbachia pipientis*: Microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annual Review of Microbiology*, 53, 71–102. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.53.1.71>
- Su, Q., Zhou, Z., Zhang, J., Shi, C., Zhang, G., Jin, Z., Wang, W., & Li, C. (2018). Effect of plant secondary metabolites on common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Entomological Research*, 48(1), 18–26. <https://doi.org/10.1111/1748-5967.12238>
- Sun, X., Cui, L., & Li, Z. (2007). Diversity and phylogeny of *Wolbachia* infecting *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) populations from China. *Environmental Entomology*, 36(5), 1283–1289. [https://doi.org/10.1603/0046-225X\(2007\)36\[1283:DAPOWI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0046-225X(2007)36[1283:DAPOWI]2.0.CO;2)
- Sung, W. C. (2013). Volatile constituents detected in smoke condensates from the combination of the smoking ingredients sucrose, black tea leaves, and bread flour. *Journal of Food and Drug Analysis*, 21(3), 292–300. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2013.07.005>
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2010). Secondary metabolites and plant defense. In L. Taiz & E. Zeiger (Eds.), *Plant Physiology* (5th ed., pp. 369–400). Sinauer Associates.
- Tamendjari, A., Angerosa, F., & Bellal, M. M. (2004). Influence of *Bactrocera oleae* infestation on olive oil quality during ripening of Chemlal olives. *Italian Journal of Food Science*, 16(3), 343–354.
- Tan, K. H., Nishida, R., Jang, E. B., & Shelly, T. E. (2014). Pheromones, Male Lures, and Trapping of Tephritid Fruit Flies. In T. Shelly, N. Epsky, E. B. Jang, J. Reyes-Flores, & R. Vargas (Eds.), *Trapping and the Detection, Control, and Regulation of Tephritid Fruit Flies* (1st ed., pp. 15–74). Springer, Dordrecht. [https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-94-017-9193-9\\_2](https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-94-017-9193-9_2)
- Thomas, D. B., & Mangan, R. L. (2006). Nontarget Impact of Spinosad GF-120 Bait Sprays for Control of

- the Mexican Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) in Texas Citrus. *Journal of Economic Entomology*, 98(6), 1950–1956. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-98.6.1950>
- Torres-Vila, L. M., Rodríguez-Molina, M. C., & Martínez, J. A. (2003). Olive fruit fly damage and olive storage effects on paste microflora and virgin olive oil acidity. *Grasas y Aceites*, 54(3), 285–294. <https://doi.org/10.3989/gya.2003.v54.i3.244>
- Tremblay, E. (1960). Ciclo cromosomico e simbiosi endocellulare nella *Diaspis* (= *Pseudaulacaspis pentagona* Targ. *Bollettino Del Laboratorio Di Entomologia Agraria Di Portici*, 18, 149–227.
- Tremblay, E. (1994). Entomologia applicata. Vol. III 2. In *Entomologia applicata. Vol. 3*(2 (1st ed., pp. 132–135). Liguori Editore. <https://www.ibs.it/entomologia-applicata-vol-32-libro-ermenegildo-tremblay/e/9788820723354>
- Tsakas, S., & Krimbas, C. B. (1970). the Genetics of *Dacus oleae*. Iv. Relation Between Adult Esterase Genotypes and Survival To Organophosphate Insecticides. *Evolution*, 24(4), 807–815. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1970.tb01815.x>
- Tsiropoulos, G. J. (1980). Major Nutritional Requirements of Adult *Dacus oleae*. *Annals of the Entomological Society of America*, 73(3), 251–253. <https://doi.org/10.1093/aesa/73.3.251>
- Tsiropoulos, G. J. (1983). The importance of dietary amino acids on the reproduction and longevity of adult *Dacus oleae* (Gmelin) (Diptera Tephritidae). *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie*, 91, 159–164.
- Tsiropoulos, G. J. (1984). Amino-acid synthesis in adult *Dacus oleae* (Gmelin) (Diptera Tephritidae) determined with [<sup>14</sup>C] glucose. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 92(4), 313–316. <https://doi.org/10.3109/13813458409071172>
- Tsitsipis, J. A. (1977). Effect of constant temperatures on the eggs of the olive fruit fly, *Dacus oleae* (Diptera: Tephritidae). *Annales de Zoologie: Ecologie Animale*, 9(1), 133–139.
- Tsitsipis, J. A. (1980). Effect of Constant Temperatures on Larval and Pupal Development of Olive Fruit Flies Reared on Artificial Diet. *Environmental Entomology*, 9(6), 764–768. <https://doi.org/10.1093/ee/9.6.764>
- Tsolakis, H., Ragusa, E., & Tarantino, P. (2011). Control of *Bactrocera oleae* by low environmental impact methods: NPC methodology to evaluate the efficacy of lure-and-kill method and copper hydroxide treatments. *Bulletin of Insectology*, 64(1), 1–8.
- Tzanakakis, M. E., & Tsitsipis, J. A. (1967). Color Changes Useful for Identifying a Certain Age of Pupae of the Olive Fruit Fly, *Dacus oleae* (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 60(1), 277–279. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/aesa/60.1.277a>
- Tzanakakis, M. E. (1985). Considerations on the possible usefulness of olive fruit fly symbiontides in integrated control in olive groves. In: Cavalloro R & Croveti A. “Proceedings of Integrated control in olive groves.” *Proceedings of Integrated Control in Olive Grove CEC7FAO/IOBC Int. Joint Meeting. Pisa. 3-6 April 1984*, 386–393.
- Tzanakakis, M. E. (2003). Seasonal development and dormancy of insects and mites feeding on olive: A review. *Netherlands Journal of Zoology*, 52(2–4), 87–224. <https://doi.org/10.1163/156854203764817670>
- Tzanakakis, M. E. (2006). Insects and mites feeding on olive: distribution, importance, habits, seasonal development and dormancy. In *Insects and mites feeding on olive: distribution, importance, habits, seasonal development and dormancy*. Brill Academic Publishers. [https://www.scirp.org/\(S\(i43dyn45teexjx455qlt3d2q\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1479041](https://www.scirp.org/(S(i43dyn45teexjx455qlt3d2q))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1479041)
- Vamvuka, D. (2011). Bio-oil, solid and gaseous biofuels from biomass pyrolysis processes-An overview. *International Journal of Energy Research*, 35(10), 835–862. <https://doi.org/10.1002/er.1804>

- Velázquez-Robledo, R., Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Hernández-Morales, A., Aguirre, J., Casas-Flores, S., López-Bucio, J., & Herrera-Estrella, A. (2011). Role of the 4-phosphopantetheinyl transferase of *Trichoderma virens* in secondary metabolism and induction of plant defense responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(12), 1459–1471. <https://doi.org/10.1094/MPMI-02-11-0045>
- Viale, E., Martínez-Sañudo, I., Brown, J. M., Simonato, M., Girolami, V., Squartini, A., Bressan, A., Faccoli, M., & Mazzon, L. (2015). Pattern of association between endemic Hawaiian fruit flies (Diptera, Tephritidae) and their symbiotic bacteria: Evidence of cospeciation events and proposal of “*Candidatus Stammerula trupaneae*.” *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 90, 67–79. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.04.025>
- Vinale, F., Marra, R., Scala, F., Ghisalberti, E. L., Lorito, M., & Sivasithamparam, K. (2006). Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 43(2), 143–148. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01939.x>
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Barbetti, M. J., Li, H., Woo, S. L., & Lorito, M. (2008a). A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 72(1–3), 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2008.05.005>
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., & Lorito, M. (2008b). *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.07.002>
- Vinale, F., Ghisalberti, E. L., Sivasithamparam, K., Marra, R., Ritieni, A., Ferracane, R., Woo, S. L., & Lorito, M. (2009a). Factors affecting the production of *Trichoderma harzianum* secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 48(6), 705–711. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02599.x>
- Vinale, F., Flematti, G., Sivasithamparam, K., Lorito, M., Marra, R., Skelton, B. W., & Ghisalberti, E. L. (2009b). Harzianic acid, an antifungal and plant growth promoting metabolite from *Trichoderma harzianum*. *Journal of Natural Products*, 72(11), 2032–2035. <https://doi.org/10.1021/np900548p>
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Ruocco, M., Woo, S. L., & Lorito, M. (2012a). *Trichoderma* secondary metabolites that affect plant metabolism. In *Natural Product Communications* (Vol. 7, Issue 11, pp. 1545–1550). <https://doi.org/10.1177/1934578x1200701133>
- Vinale, F., Arjona-Girona, I., Nigro, M., Mazzei, P., Piccolo, A., Ruocco, M., Woo, S. L., Rosa, D. R., Herrera, C. L., & Lorito, M. (2012b). Cerinolactone, a hydroxy-lactone derivative from *Trichoderma cerinum*. *Journal of Natural Products*, 75(1), 103–106. <https://doi.org/10.1021/np200577t>
- Vinale, F., Nigro, M., Sivasithamparam, K., Flematti, G., Ghisalberti, E. L., Ruocco, M., Varlese, R., Marra, R., Lanzuise, S., Eid, A., Woo, S. L. & Lorito, M. (2013) Harzianic acid: a novel siderophore from *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiology Letters* 347 (2). <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12231>
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Woo, S. L., Nigro, M., Marra, R., Lombardi, N., Pascale, A., Ruocco, M., Lanzuise, S., Manganiello, G., & Lorito, M. (2014). *Trichoderma* Secondary Metabolites Active on Plants and Fungal Pathogens. *The Open Mycology Journal*, 8(1), 127–139. <https://doi.org/10.2174/1874437001408010127>
- Vinale, F., Strakowska, J., Mazzei, P., Piccolo, A., Marra, R., Lombardi, N., Manganiello, G., Pascale, A., Woo, S. L., & Lorito, M. (2016). Cremenolide, a new antifungal, 10-member lactone from *Trichoderma cremeum* with plant growth promotion activity. *Natural Product Research*, 30(22), 2575–2581. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1131985>
- Vinale, F., Nicoletti, R., Borrelli, F., Mangoni, A., Parisi, O. A., Marra, R., Lombardi, N., Lacatena, F., Grauso, L., Finizio, S., Lorito, M., & Woo, S. L. (2017A). Co-Culture of Plant Beneficial Microbes as Source of Bioactive Metabolites. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14569-5>

- Vinale, F., Nicoletti, R., Lacatena, F., Marra, R., Sacco, A., Lombardi, N., D'Errico, G., Digilio, M. C., Lorito, M., & Woo, S. L. (2017b). Secondary metabolites from the endophytic fungus *Talaromyces pinophilus*. *Natural Product Research*, *31*(15), 1778–1785. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1290624>
- Vinale, F., & Sivasithamparam, K. (2020). Beneficial effects of *Trichoderma* secondary metabolites on crops. *Phytotherapy Research*, *34*(11), 2835–2842. <https://doi.org/10.1002/ptr.6728>
- Vitanović, E., Aldrich, J. R., Boundy-Mills, K., Cagalj, M., Ebeler, S. E., Burrack, H., Zalom, F. G., & Rodriguez-Saona, C. (2020). Olive Fruit Fly, *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae), Attraction to Volatile Compounds Produced by Host and Insect-Associated Yeast Strains. *Journal of Economic Entomology*, *113*(2), 752–759. <https://doi.org/10.1093/jee/toz341>
- Viterbo, A., Wiest, A., Brotman, Y., Chet, I., & Kenerley, C. (2007). The 18mer peptaibols from *Trichoderma virens* elicit plant defence responses. *Molecular Plant Pathology*, *8*(6), 737–746. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00430.x>
- Vochozka, M., Maroušková, A., Váchal, J., & Straková, J. (2016). Biochar pricing hampers biochar farming. *Clean Technologies and Environmental Policy*, *18*(4), 1225–1231. <https://doi.org/10.1007/s10098-016-1113-3>
- Wäckers, F. L. (2005). Suitability of (extra-)floral nectar, pollen, and honeydew as insect food sources. In F. L. Wäckers, P. C. J. van Rijn, & J. Bruin (Eds.), *Plant-Provided Food for Carnivorous Insects: A Protective Mutualism and its Applications* (pp. 17–74). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511542220.003>
- Wallis, D. R., & Shaw, P. W. (2008). Evaluation of coloured sticky traps for monitoring beneficial insects in apple orchards. *New Zealand Plant Protection*, *61*, 328–332. <https://doi.org/10.30843/nzpp.2008.61.6811>
- Wang, X. G., Johnson, M. W., Daane, K. M., & Nadel, H. (2009). High Summer Temperatures Affect the Survival and Reproduction of Olive Fruit Fly (Diptera: Tephritidae). *Environmental Entomology*, *38*(5), 1496–1504. <https://doi.org/10.1603/022.038.0518>
- Werren, J. H., Zhang, W., & Guo, L. R. (1995). Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: Reproductive parasites of arthropods. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *261*(1360), 55–63. <https://doi.org/10.1098/rspb.1995.0117>
- Werren, J. H. (1997). Biology of *Wolbachia*. *Annual Review of Entomology*, *42*, 587–609.
- Wharton, R. A. (1989). Classical Biological Control of Fruit-Infesting Tephritidae. In Alan S. Robinson & G. Hooper (Eds.), *World Crop Pests. Fruit Flies, Their Biology, Natural Enemies and Control, Vol. 3B* (pp. 303–313). Elsevier Science Publishers.
- Whipps, J. M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, *52*(SPEC. ISS. MAR.), 487–511. [https://doi.org/10.1093/jxb/52.suppl\\_1.487](https://doi.org/10.1093/jxb/52.suppl_1.487)
- White, I. M., & Elson-Harris, M. M. (1992). *Fruit flies of economic significance: their identification and bionomics*. CAB International.
- White, I. M. (2006). *Taxonomy of the Dacina (Diptera: Tephritidae) of Africa and the Middle East African - Entomology Memoirs Volume: 2*. Entomological Society of Southern Africa.
- Whitehead, S. R., & Bowers, M. D. (2013). Evidence for the adaptive significance of secondary compounds in vertebrate-dispersed fruits. *American Naturalist*, *182*(5), 563–577. <https://doi.org/10.1086/673258>
- Williams, M., Eveleigh, E., Forbes, G., Lamb, R., Roscoe, L., & Silk, P. (2019). Evidence of a direct chemical plant defense role for maltol against spruce budworm. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, *167*(8), 755–762. <https://doi.org/10.1111/eea.12822>
- Woo, S. L., & Pepe, O. (2018). Microbial consortia: Promising probiotics as plant biostimulants for sustainable agriculture. *Frontiers in Plant Science*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01801>

- Worasatit, N., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., & Rowland, C. Y. (1994). Variation in pyrone production, lytic enzymes and control of rhizoctonia root rot of wheat among single-spore isolates of *Trichoderma koningii*. *Mycological Research*, 98(12), 1357–1363. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)81063-0](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)81063-0)
- Xu, R. kou, Zhao, A. zhen, Yuan, J. hua, & Jiang, J. (2012). pH buffering capacity of acid soils from tropical and subtropical regions of China as influenced by incorporation of crop straw biochars. *Journal of Soils and Sediments*, 12(4), 494–502. <https://doi.org/10.1007/s11368-012-0483-3>
- Yang, J. F., Yang, C. H., Liang, M. T., Gao, Z. J., Wu, Y. W., & Chuang, L. Y. (2016). Chemical composition, antioxidant, and antibacterial activity of wood vinegar from *Litchi chinensis*. *Molecules*, 21(9). <https://doi.org/10.3390/molecules21091150>
- Yin, W., Washington, M., Yang, X., Lu, A., Ma, X., Rui, S., Wang, X., & Zhao, R. (2020). Consumer acceptability and sensory profiling of sesame oils obtained from different processes. *Grain & Oil Science and Technology*, 3(2), 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.gaost.2020.04.001>
- Yokoyama, V. Y., Rendon, P. A., & Sivinski, J. M. (2008). *Psytalia cf. concolor* (Hymenoptera: Braconidae) for biological control of olive fruit fly (Diptera: Tephritidae) in California. *Environmental Entomology*, 37(3), 764–773. [https://doi.org/10.1603/0046-225X\(2008\)37\[764:PCCHBF\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0046-225X(2008)37[764:PCCHBF]2.0.CO;2)
- Yousef, M., Lozano-Tovar, M. D., Garrido-Jurado, I., & Quesada-Moraga, E. (2013). Biocontrol of *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) with *Metarhizium brunneum* and its extracts. *Journal of Economic Entomology*, 106(3), 1118–1125. <https://doi.org/10.1603/EC12489>
- Zabalou, S., Riegler, M., Theodorakopoulou, M., Stauffer, C., Savakis, C., & Bourtzis, K. (2004). *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility as a means for insect pest population control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(42), 15042–15045. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403853101>
- Zabalou, S., Apostolaki, A., Livadaras, I., Franz, G., Robinson, A. S., Savakis, C., & Bourtzis, K. (2009). Incompatible insect technique: Incompatible males from a *Ceratitis capitata* genetic sexing strain. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 132(3), 232–240. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2009.00886.x>
- Zamora, R., Alaiz, M., & Hidalgo, F. J. (2001). Influence of *cultivar* and fruit ripening on olive (*Olea europaea*) fruit protein content, composition, and antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(9), 4267–4270. <https://doi.org/10.1021/jf0104634>
- Zeilinger, S., Gruber, S., Bansal, R., & Mukherjee, P. K. (2016). Secondary metabolism in *Trichoderma* - Chemistry meets genomics. In *Fungal Biology Reviews* (Vol. 30, Issue 2, pp. 74–90). <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.05.001>
- Zervas, G. A. (1982). Reproductive physiology of *Dacus oleae* (Gmel.) (Diptera: Trypetidae). Comparison of a wild and artificially reared flies. *Geoponica*, 282, 10–14.
- Zhou, W., Rousset, F., & O'Neill, S. L. (1998). Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 265(1395), 509–515. <https://doi.org/10.1098/rspb.1998.0324>
- Zientz, E., Dandekar, T., & Gross, R. (2004). Metabolic Interdependence of Obligate Intracellular Bacteria and Their Insect Hosts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(4), 745–770. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.4.745>
- Zohary, D., & Spiegel-Roy, P. (1975). Beginnings of fruit growing in the Old World. *Science*, 187(4174), 319–327. <https://doi.org/10.1126/science.187.4174.319>
- Zohary, D. (1994). Wild Genetic Resources. *First Resource*, 275–336. <https://doi.org/10.2307/j.ctt211qvck.12>
- Zohary, D., & Hopf, M. (2000). Domestication of plants in the Old World: the origin and spread of cultivated

plants in West Asia, Europe and the Nile Valley. *Domestication of Plants in the Old World: The Origin and Spread of Cultivated Plants in West Asia, Europe and the Nile Valley.*, Ed.3.

Zouros, E., & Krimbas, C. B. (1970). Frequency of Female Digamy in a Natural Population of the Olive Fruit Fly *Dacus oleae* as found by using Enzyme Polymorphism. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 13, 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1970.tb00080.x>

Zygouridis, N. E., Augustinos, A. A., Zalom, F. G., & Mathiopoulos, K. D. (2009). Analysis of olive fly invasion in California based on microsatellite markers. *Heredity*, 102, 402–412. <https://doi.org/10.1038/hdy.2008.125>