Acta Italus Hortus 10: 185-189

Bactrocera oleae e batteri associati: prospettive per nuove strategie di controllo integrato del Tefritide

Belcari A.[1*], Sacchetti P.[1], Granchietti A.[1] e Bagnoli B.[2]
[1] *Dipartimento di Biotecnologie Agrarie, Università di Firenze*
[2] *CRA-ABP, Centro di ricerca per l'Agrobiologia e la Pedologia, Firenze*

Bactrocera oleae and associated bacteria: perspectives for new integrated control strategies

Abstract. Studies carried out in the years 2007-2010 within the project "SIDIO" confirmed and highlighted that the olive fly *Bactrocera oleae* has two distinct types of relationship with bacteria: a close symbiosis with *Candidatus* Erwinia dacicola, and a temporary and occasional association with Enterobacteriaceae and Pseudomonadaceae present on the olive phylloplane. Concerning *Ca.* Erwinia dacicola, some semi-field trials allowed to verify how different products with bactericidal action, in particular copper sulphate and copper oxychloride, are able to cause until to 50% of mortality in eggs and larvae. Besides, these products showed a marked deterrent activity towards ovipositing females, evaluated, in terms of uninfested olives. The antibacterial activity of copper has been confirmed in laboratory bioassays using bacterial DNA extraction and amplification from the esophageal bulb of flies watered with a mixtures based on copper oxychloride. Concerning the temporary associations which the olive fly has with bacterial epiphytic populations, a series of field trials revealed that a bacterial filtrate from cultures of *Pseudomonas putida* has a considerable attractiveness towards adults, especially against females. Again, the results show a significant practical importance for the development, after identification of active volatiles, of a new and more effective systems of monitoring and control of the pest.

Key words: Olive fruit fly, bactericides, attractans, organic oliviculture, Tuscany.

Introduzione

È ben noto come i microrganismi e in particolare i batteri rivestano per i ditteri tefritidi un ruolo di fondamentale importanza sia come fonte proteica di nutrimento sia per i rapporti simbiotici che instaurano a livello di strutture specializzate del canale alimentare (Girolami, 1973; Drew e Lloyd, 1989; Belcari *et al.*, 2003; Lauzon, 2003; Capuzzo *et al.,* 2005). In *Bactrocera oleae*, recenti ricerche hanno messo in evidenza una stretta associazione fra il dittero e i microrganismi presenti sul filloplano dell'olivo o stabilmente residenti nell'intestino (Sacchetti *et al.*, 2008). In effetti la mosca presenta due distinti tipi di rapporto con i batteri: una simbiosi stretta, dovuta alla presenza di *Candidatus* Erwinia dacicola in adulti selvaggi, e un'associazione temporanea e occasionale con batteri epifiti (batteri residenti soprattutto sulla superficie di foglie, drupe e rami), di cui il tefritide si nutre e che trasporta a sua volta sulle piante dell'agroecosistema. *Ca.* Erwinia dacicola è stato rinvenuto nel bulbo esofageo (estroflessione anteriore del tubo digerente) di maschi e femmine della mosca mediante tecniche molecolari. Non coltivabile sui normali substrati di crescita, questo batterio risulta essere di fondamentale importanza per lo sviluppo delle giovani larve che, soprattutto nelle drupe verdi, necessitano di enzimi proteolitici. È stato infatti dimostrato in prove di laboratorio e di campo come l'assenza del batterio nell'intestino delle larve neonate, a seguito di somministrazione di antibiotici, produca alta mortalità nella popolazione (Fytizas e Tzanakakis, 1966; Tzanakakis, 1985). Riguardo a questo aspetto, le ricerche condotte nell'ambito del progetto "SIDIO" (Strategie Innovative per la Difesa Integrata in Olivicoltura, anni 2007-2010) hanno valutato la possibilità di manipolare la simbiosi batterica come un nuovo sistema di lotta indiretto altamente selettivo ed ecocompatibile (Bagnoli, 2011). A tale scopo, diverse indagini di laboratorio e di campo (negli oliveti dell'Azienda Villa Montepaldi, San Casciano - FI) hanno avuto come obiettivo finale quello di valutare l'attività di prodotti ad azione antibatterica (rame e propoli). Per quanto riguarda i rapporti che la mosca contrae con i batteri epifiti, la ricerca si è indirizzata alla messa a punto di nuovi sistemi di attrazione basati sugli odori emessi da detti batteri, rinvenuti sia nel bulbo esofageo delle mosche che sul filloplano. Tra i vari microrganismi con cui la mosca contrae temporanee associa-

* antonio.belcari@unifi.it

zioni, *Pseudomonas putida* è stata scelta come specie modello di studio in quanto rinvenuta molte volte durante precedenti ricerche (Belcari *et al*., 2003). Filtrati batterici di *P. putida* sono stati quindi comparati con attrattivi commerciali di più largo impiego per i ditteri tefritidi.

Materiali e metodi

Interruzione della simbiosi batterica

Le prove sono state condotte nel 2009 in condizioni di semicampo utilizzando adulti ottenuti da drupe infestate, pertanto caratterizzati da una medesima età ed elevati livelli di batteriosimbiosi, che sono stati introdotti in speciali manicotti appositamente applicati alle branche delle piante. Sono stati presi in esame tre differenti formulati commerciali: Pasta Caffaro Blu (allo 0,35%) (25% di rame metallo da ossicloruro in sospensione concentrata), Poltiglia Caffaro 20 DF New (allo 0,75%) (20% di rame metallo da solfato neutralizzato con calce spenta, in granuli idrodispersibili), Propoli® Serbios (allo 0,17%) (estratto flavonoidico-resinoso di propoli in glicole). Con tali prodotti, nel periodo autunnale, sono state allestite due prove, A e B, allo scopo di valutare gli effetti dei trattamenti in termini di deterrenza, azione ovicida e azione larvicida. In ciascuna prova sono state considerate 5 piante di una medesima area dell'oliveto sulle quali sono state individuate 4 branche destinate a 4 differenti trattamenti (3 antibatterici + 1 controllo con acqua deionizzata). Una volta rimosse le drupe infestate, si è provveduto a effettuare i trattamenti previsti e a isolare ciascuna branca con appositi manicotti di tulle bianco. All'interno di questi, sono stati quindi immessi adulti di *B. oleae* (sex ratio 1:1) e rimossi a distanza di una settimana. Nella prova A si sono utilizzati 20 adulti e circa 100 drupe per branca, con asportazione ed esame delle drupe dopo 7 giorni dai trattamenti (per la valutazione dell'effetto deterrente e ovicida). Nella prova B si sono utilizzati 10 adulti e circa 50 drupe per branca, con rimozione ed esame delle drupe dopo 20 giorni dai trattamenti (per la valutazione dell'effetto deterrente e larvicida). A integrazione delle precedenti, una terza prova è stata condotta in laboratorio, sempre su individui selvaggi, abbeverati con acqua e Pasta Caffaro, o acqua e Propoli o solo acqua (controllo). In questo caso si è inteso valutare l'eventuale azione battericida dei due prodotti mediante esami molecolari *ad hoc* sul contenuto batterico del bulbo esofageo.

Potere attrattivo di filtrati batterici

A partire da un ceppo di *P. putida* isolato dal bulbo esofageo di individui selvaggi di *B. oleae*, lo studio si è sviluppato attraverso la preparazione di filtrati batterici (Sacchetti *et al.*, 2007) e la loro successiva utilizzazione in prove sperimentali di campo. In questo ambito, detti filtrati sono stati posti a confronto con esche proteiche di largo impiego nella lotta contro le mosche della frutta (Nubait), utilizzando come comune dispositivo di cattura bottiglie-trappola (Elkophon, Phytophyl, Grecia). Più specificatamente, dopo alcuni saggi preliminari di campo effettuati nel 2007, nel biennio successivo sono state condotte prove per confrontare il potere attrattivo del filtrato batterico con quello del Nubait e del controllo, rappresentato dal mezzo di coltura del batterio, il TSB (Tryptone Soya Broth). Il modello sperimentale utilizzato nel 2008 è quello del quadrato latino con tre tesi e tre ripetizioni, replicato quattro volte nello spazio e tre volte nel tempo, per un totale di 36 trappole (12 per tipo di attrattivo) testate 9 volte nel periodo settembre-ottobre. In considerazione che il filtrato batterico va facilmente incontro a processi fermentativi in grado di modificarne sostanzialmente la composizione chimica, l'esame delle catture ottenute con i tre differenti tipi di trappola è stato effettuato, per ciascuna delle nove prove, a distanza di 24 ore dal posizionamento delle trappole. Per quanto riguarda l'effetto della concentrazione, ricerche specifiche sono state condotte nel 2008 e nel 2009 nel medesimo oliveto di Villa Montepaldi, per confrontare il potere attrattivo del filtrato batterico al 10%, 20% e 40%. Nel biennio, secondo uno schema sperimentale a quadrato latino, con 3 tesi e 3 ripetizioni, replicato 4 volte nello spazio (per un totale di 12 trappole per dosaggio), sono state effettuate 3 prove nel periodo ottobre-novembre, con rilevamento delle catture 24-30 ore dopo l'allestimento delle trappole.

Risultati e discussione

Interruzione della simbiosi batterica

I risultati del primo esperimento hanno evidenziato un buon effetto deterrente (inibizione dell'ovideposizione) soprattutto da parte della Pasta Caffaro che ha limitato la percentuale di olive con punture al 16% (contro il 20% della Propoli, il 36% della Poltiglia e il 41% del testimone). Per quanto riguarda l'azione ovicida, è risultata invece la Poltiglia il formulato più efficace con una mortalità delle uova di oltre il 59% (rispetto al 45% della Propoli, al 41% della Pasta e al 21% del testimone) (fig. 1). I risultati del secondo esperimento hanno evidenziato la maggiore attività di deterrenza da parte della Poltiglia che ha contenuto la percentuale di olive con punture a poco più del 6%. Le altre due tesi si sono attestate su valori di poco

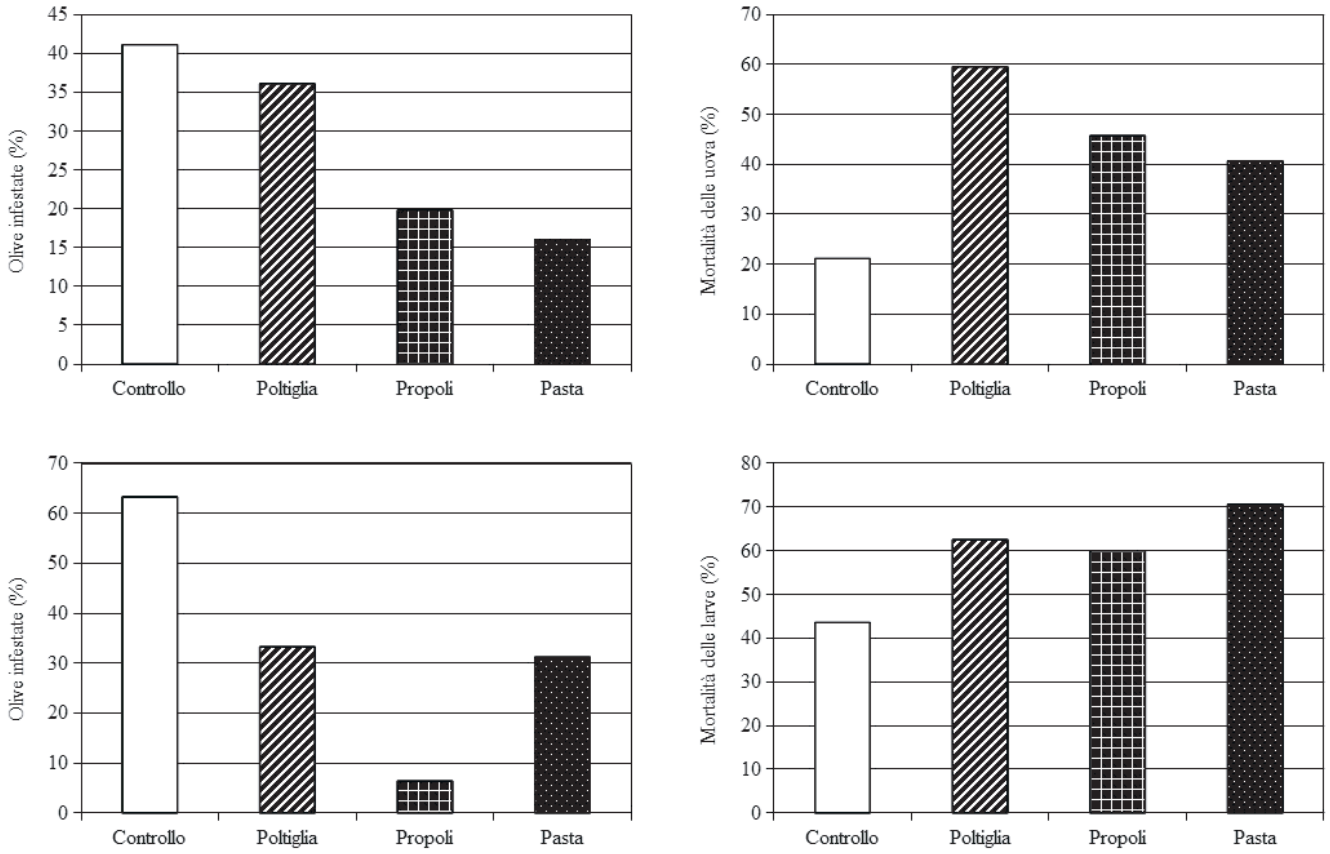

Fig. 1 - Azienda Villa Montepaldi (FI), 2009. Effetto dei trattamenti sull'infestazione e la mortalità delle uova nella prova A (sopra) e sull'infestazione e la mortalità delle larve nella prova B (sotto).

Fig. 1 - Villa Montepaldi farm (FI), 2009. Treatment effects on the olive infestation and egg mortality in the A trial (above) and on the olive infestation and larval mortality in the B trial (below).

superiori al 30%, mentre nel testimone l'infestazione ha raggiunto il 63%. Per quanto concerne l'azione larvicida, gli effetti medi più marcati si sono avuti da parte della Pasta con ben il 71% di mortalità (contro il 43% del testimone) (fig. 1).

Per quanto concerne le prove di laboratorio riguardanti l'influenza del rame sullo sviluppo di *Ca*. Erwinia dacicola, dai risultati è emerso che per la tesi relativa alla Pasta Caffaro si sono ottenuti amplificati di DNA batterico solo dal 29% dei bulbi (contro il 59% della tesi Propoli e 64% del testimone). Ciò dimostra che i prodotti rameici, assunti per ingestione dalla mosca, producono a livello di bulbo esofageo un considerevole effetto battericida limitando così, in misura più o meno marcata, la trasmissione verticale del batterio dalla madre alla prole.

Potere attrattivo di filtrati batterici

I risultati hanno evidenziato che detti filtrati batterici, nelle prime 24 ore di esposizione, esercitano nei confronti degli adulti, ed in particolare delle femmine, un'elevata capacità attrattiva, significativamente superiore a quella degli attrattivi di confronto (fig. 2A). Le catture mostrano (pur in assenza di differenze statisticamente significative) che la soluzione al 40% è stata la più attrattiva nella prima e nella terza prova, mentre quella al 20% è apparsa di gran lunga la più efficace al rilievo del 15 ottobre (fig. 2B). I dati di sintesi riportati nelle figure 2C e 2D confermano, per tutte le concentrazioni saggiate, la maggiore attrattività dell'esca nei confronti delle femmine, evidenziandone le potenzialità come mezzo di monitoraggio e controllo della popolazione dacica. Le prove condotte nel 2009, hanno consentito inoltre di evidenziare più chiaramente la maggiore attrattività del filtrato batterico al 40% (fig. 2D).

Conclusioni

I risultati delle prove di laboratorio e di campo aventi come oggetto le complesse relazioni intercorrenti fra *B. oleae* e batteri, permettono di confermare come la mosca presenti due principali tipi di associazioni batteriche, una con *Ca.* Erwinia dacicola e l'altra con specie di enterobatteriacee e pseudomonadacee pressoché ubiquitarie e ordinariamente presenti anche sul filloplano dell'olivo, di cui la mosca si nutre. *Ca*. Erwinia dacicola riveste un'importanza fondamentale

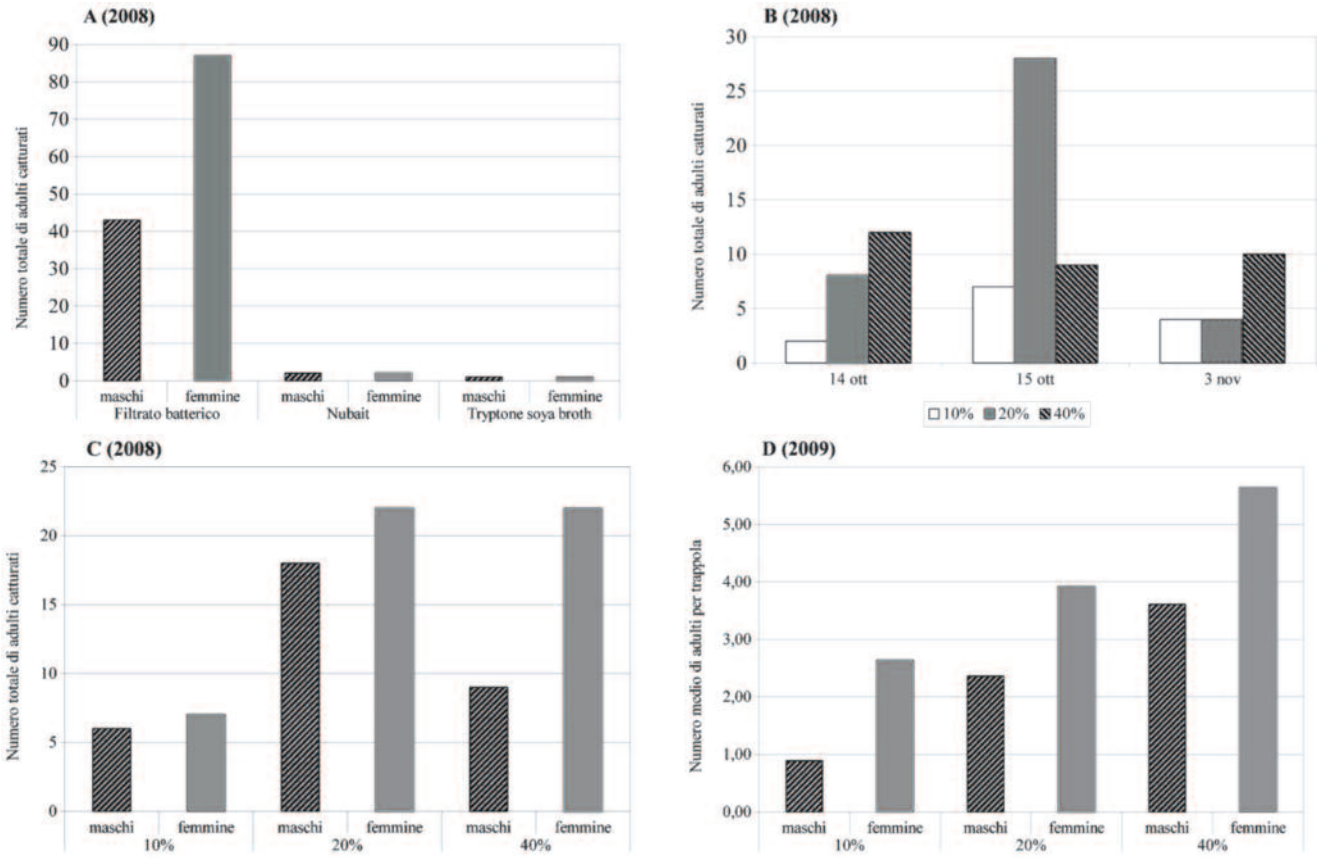

Fig. 2 - Azienda Villa Montepaldi (FI), 2008 e 2009. Adulti catturati con trappole Elkofon innescate con tre diversi tipi di attrattivo (A) o con filtrato batterico al 10%, 20% e 40% (B, C e D).

Fig. 2 - Villa Montepaldi farm (FI), 2008 and 2009. Adult captures by Elkofon traps baited with different kind of attractants (A) or with bacterial filtrate at 10%, 20% and 40% (B, C and D).

in quanto, attraverso un passaggio verticale da femmina a larva, permette a questa l'utilizzazione delle fonti proteiche presenti nel mesocarpo dell'oliva, soprattutto quando le olive sono nelle prime fasi di maturazione. La verifica che prodotti ad azione battericida, come alcuni formulati a base di rame o di propoli, siano in grado di interrompere la batteriosimbiosi, apre nuove e interessanti prospettive di controllo ecocompatibile del tefritide.

Per quanto riguarda le popolazioni batteriche epifite che la mosca ricerca attivamente come sorgente di cibo, una serie di indagini di campo ha permesso di rilevare il considerevole potere attrattivo esercitato nei confronti degli adulti di *B. oleae* da parte di un filtrato batterico ottenuto da colture di *P. putida*. Anche in questo caso i risultati presentano notevoli prospettive per lo sviluppo, previa individuazione delle sostanze volatili attive, di nuovi e più efficaci sistemi di monitoraggio.

Riassunto

I batteri rivestono, per le mosche della frutta, un ruolo di fondamentale importanza sia come fonte di nutrimento sia per i rapporti simbiotici che instaurano con l'ospite a livello di strutture specializzate del canale alimentare.

Gli studi condotti nell'ambito del progetto "Strategie Innovative per la Difesa Integrata in Olivicoltura - SIDIO", cofinanziato da ARSIA Regione Toscana per il triennio 2007-2010, hanno permesso di confermare ed evidenziare come *Bactrocera oleae* abbia due distinti tipi di rapporto con i batteri: una simbiosi stretta con *Candidatus* Erwinia dacicola, e un'associazione temporanea e occasionale con enterobatteriacee e pseudomonadacee presenti sul filloplano, di cui gli adulti del dittero si nutrono e che trasportano a loro volta sulle piante di olivo.

Riguardo a *Ca.* Erwinia dacicola, diverse indagini di semicampo hanno permesso di verificare come alcuni prodotti ad azione battericida, e in particolare il solfato e l'ossicloruro di rame, siano in grado di causare una mortalità embrionale e larvale dell'ordine del 50%, mostrando altresì un marcato effetto deterrente sull'ovideposizione, quantificato, in termini di olive non attaccate, fino a valori di circa il 90% di efficacia, rispetto al testimone non trattato. L'attività antibatteri-

ca del rame è stata confermata in biosaggi di laboratorio mediante estrazione e amplificazione di DNA batterico prelevato dal bulbo esofageo di mosche abbeverate con miscele a base di ossicloruro di rame.

Relativamente alle associazioni che la mosca contrae con le popolazioni batteriche epifite, una serie di prove di campo ha permesso di rilevare che un filtrato batterico ottenuto da colture di *Pseudomonas putida* esercita un considerevole potere attrattivo nei confronti degli adulti e in particolare delle femmine del tefritide. Anche in questo caso, i risultati presentano una notevole importanza applicativa per lo sviluppo, previa individuazione delle sostanze volatili attive, di nuovi e più efficaci sistemi di monitoraggio e di controllo del fitofago.

Parole chiave: mosca delle olive, sostanze antibatteriche, attrattivi, olivicoltura biologica.

Ricerca svolta nell'ambito del progetto "Strategie Innovative per la Difesa Integrata in Olivicoltura - SIDIO", cofinanziato da ARSIA Regione Toscana per gli anni 2007-2010.

Bibliografia

Bagnoli B., 2011. *Il rame per la difesa*. Olivo e Olio, 14 (6): 6-11.

Belcari A., Sacchetti P., Marchi G., Surico G., 2003. *La mosca delle olive e la simbiosi batterica*. Informatore Fitopatologico, 53 (9): 53-59.

Capuzzo C., Firrau G., Mazzon L., Squartini A., Girolami V., 2005. *"*Candidatus *Erwinia dacicola", a coevolved symbiotic bacterium of olive fly* Bactrocera oleae *(Gmelin).* Int. J. Syst. Evol. Micr., 55: 1641-1647.

Drew R.A.I., Lloyd A.C., 1989. *Bacteria associated with fruit flies and their host plants.* In: A. Robinson and G. Hooper (eds.), "Fruit Flies their Biology, Natural Enemies and Control", World Crop Pest, Elsevier, Amsterdam, 3A: 131-140.

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.

Girolami V., 1973. *Reperti morfoistologici sulle batterio simbiosi del* Dacus oleae *(Gmelin) e di altri ditteri tripetidi in natura e negli allevamenti su substrati artificiali.* Redia, 54: 269-294.

Lauzon C.R., 2003. *Symbiotic relationships of Tephritids.* In: K. Bourtzis and T.A. Miller (eds.), Insect Symbiosis, CRC Press, Boca Raton, London: 115-129.

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 Bull., 30 (9): 37-42.

Sacchetti P., Granchietti A., Landini S., Viti C., Giovannetti L., Belcari A., 2008. *Relationships between the olive fly and bacteria.* J. Appl. Ent., 132: 682-689.

Tzanakakis M.E., 1985. *Considerations on the possible usefulness of olive fruit fly symbionticides in integrated control in olive groves.* In: R. Cavalloro and A. Crovetti (eds.), Integrated Pest Control in Olive-Groves, Proc. CEC/FAO/IOBC, Int. Joint Meeting, Pisa, 3-6 april 1984: 386-393.

Acta Italus Hortus 10: 190-193

Effetti sull'artropodocenosi di trattamenti con Imidacloprid impiegato contro *Bactrocera oleae*

Iannotta N.*, Belfiore T., Noce M.E., Scalercio S., Vizzarri V. e Zaffina F.
CRA-OLI Centro di Ricerca per l'Olivicoltura e l'Industria Olearia, Rende (CS)

Effects on non-target arthropods of an Imidacloprid-based insecticide used against *Bactrocera oleae*

Abstract. The efficacy of imidacloprid for *Bactrocera oleae* (Rossi,1790) control has been assed but there is a lack of knowledge about its impact on non target fauna, mainly represented by arthropods, of olive ecosystem. Therefore, the aim of this study was to assess the impact of imidacloprid (commercial formulation Confidor® O-TEQ) in two different chemical concentration (50 and 62.5% g/hl) on this biotic component. Trials were performed in 2009 and 2010 years in the area of Mirto-Crosia, located on Cosenza Ionian coast and characterized by high levels of infestation. Results showed a significant impact of imidacloprid on non target arthropods, even if the effects on arthropod fauna are not homogeneous in both study years emphasizing in 2010 a significant difference only between the control thesis and the Confidor 62.5% g/hl thesis. Some groups showed more sensitivity, as Homoptera Cicadellidae that displayed a significant decrease of their populations. Data of strong impact were not detected for beneficial arthropod as parasitoids and predator.

Key words: imidacloprid, olive tree, *Bactrocera oleae*, infestation, Calabria

Introduzione

La revisione degli agrofarmaci impiegabili in agricoltura, recentemente attuata dalla UE, ha cancellato prodotti largamente usati in olivicoltura con efficacia di azione sui fitofagi dannosi come la 'mosca delle olive'. Recenti sperimentazioni in olivicoltura convenzionale ed integrata hanno saggiato nuove sostanze attive con risultati paragonabili a quelli del dimetoato per combattere *Bactrocera oleae* (Rossi, 1790). Tra questi è apparso abbastanza efficace l'imidacloprid, un principio attivo sistemico appartenente alla classe dei neonicotinoidi cloronicotinici. Tuttavia poco si conosce sull'impatto che questo presidio fitosanitario provoca sugli artropodi non-target ed in particolare sui rapporti tra i vari gruppi tassonomici e/o funzionali. La modalità del meccanismo di azione dei nicotinici sembra selettiva in quanto i principi attivi colpiscono i recettori nicotinici dell'acetilcolina degli insetti, e forse è il motivo per cui negli ultimi dieci anni si è avuto un incremento notevole di tali sostanze in sostituzione dei carbammati e dei fosforganici. Lo scopo di questa ricerca è stato quello di valutare l'impatto di tale sostanza attiva, nel formulato commerciale Confidor® O-TEQ, recentemente registrato su olivo per il controllo della mosca delle olive, sulle dinamiche a breve e medio termine dell'artopodofauna dell'oliveto.

Materiali e metodi

Le prove sono state condotte negli anni 2009 e 2010 nell'areale di Mirto-Crosia (CS), situato sul litorale ionico cosentino e caratterizzato da elevati livelli di infestazione. Sono state utilizzate 3 parcelle di circa Ha 0,5: una prima trattata con 50g/hl di formulato, una seconda trattata con 62,5g/hl di formulato (dosi minima e massima consigliata in etichetta), una terza è stata utilizzata come controllo non trattato. I trattamenti sono stati effettuati intorno alla metà di settembre in entrambi gli anni di studio. Le due parcelle trattate sono state ruotate da un anno al successivo. In ognuna di esse sono state collocate 5 coppie di trappole collose bianche all'interno della chioma di 5 olivi, posti nel centro delle parcelle e distanziati 16 metri. I taxa indagati sono stati scelti fra quelli noti in bibliografia per essere dei buoni bioindicatori: *Araneae, Opiliones, Insecta (Hymenoptera Icneumonoidea, Hymenoptera Formicidae, Altri Hymenoptera, Coleoptera Coccinellidae, Macrolepidoptera, Neuroptera, Mecoptera, Diptera Syrphidae, Homoptera Cicadellidae,* Altri *Homoptera*,

* nino.iannotta@entecra.it

Heteroptera). I rilievi sono stati effettuati ogni dieci giorni. Le trappole, una volta raccolte sono state trasportate in laboratorio, dove è stata eseguita, con l'ausilio dello stereomicroscopio, la separazione e il conteggio visivo dei taxa prescelti per ottenere un dato quantitativo. I dati raccolti sono stati sottoposti a diverse analisi statistiche in modo da cogliere le differenze fra le strutture di comunità, le risposte dei taxa campionati ai vari trattamenti e gli effetti dei composti testati sull'efficienza dei livelli trofici. I dati di abbondanza (numero di individui) sono stati sottoposti all'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal test post-hoc LSD per separare le medie utilizzando STATISTICA 5.5. Le risposte ai trattamenti dei singoli taxa sono state valutate attraverso l'utilizzo di un indice di dinamica fenologica che si traduce nel rapporto pre-trattamento/post-trattamento dell'abbondanza dei taxa campionati (A/B_{ratio}) (Iannotta *et al*., 2006): A/B_{ratio} = n° individui post-trattamento / n° individui pre-trattamento

Risultati e discussione

Nel 2009 e 2010 sono stati rispettivamente raccolti 29.080 e 19.938 individui, di questi sono stati conteggiati e classificati 3.763 e 2.584 rispettivamente (tab. 1). Nel complesso il maggior numero di individui determinato è stato registrato nelle tesi controllo (tesi B) mentre in minor numero è stato riscontrato nelle parcelle dove è stato effettuato il trattamento con l'imidacloprid alle concentrazioni più elevate (Confidor 62,5%). Il gruppo più abbondante è stato quello degli *Homoptera Cicadellidae* sia nel primo anno di sperimentazione (n = 993; 26,39%) che nel secondo (n = 743; 28,75%). Il numero degli individui può non essere indicativo, in quanto è noto che diversi gruppi possono essere influenzati più che dalla gestione fitosanitaria, dalla diversificazione vegetazionale come ad esempio i *Macrolepidoptera* (Weibull, 2003), mentre altri, come i Neurotteri, oltre ad avere una grande abilità di dispersione attraverso il volo, hanno sviluppato una resistenza ai pesticidi permettendo loro di sopravvivere negli habitat sfavorevoli come gli agroecosistemi sottoposti ad input chimici (Ruano *et al.*, 2001).

L'effetto del trattamento valutato mediante l'indice di dinamica fenologica ha mostrato per i due anni consecutivi di sperimentazione un impatto dell'imidacloprid sulle comunità di artropodi campionate nel suo complesso, in particolare un effetto negativo si è avuto per gli *Icneumonoidea*, i *Syrphidae* e *Cicadellidae* (tab. 2).

Nei due anni di sperimentazione, osservando l'andamento fenologico sia della cenosi totale che di quella determinata, si evidenzia una diminuzione del numero di individui proprio nelle tesi trattate in seguito al trattamento stesso, mentre le parcelle controllo nello stesso periodo registrano un aumento delle loro popolazioni (fig. 1). In particolare il taxon maggiormente sensibile si è dimostrato quello dei *Cicadellidae* ($F_{2,90} = 14{,}683$; $p < 0.0001$), pur evidenziando quasi tutti i taxa dei decrementi sensibili nel periodo successivo al trattamento.

Tab. 1 - Abbondanza dei taxa campionati nelle tesi sperimentali durante il 2009 calcolata come numero di individui.
Tab 1 - Abundance of taxa sampled into experimental theses during 2009 computed as number of individuals.

Taxa	Confidor 62,5%		Confidor 50%		Controllo	
	2009	2010	2009	2010	2009	2010
Araneae	123	74	135	74	110	48
Opiliones	3		15	1	24	6
altri Hymenoptera	106	99	169	92	74	139
Ichneumonoidea	127	40	53	112	70	72
Formicidae	144	57	133	46	210	61
Coccinellidae	8	4	12	4	16	7
Macrolepidoptera	83	44	56	28	47	37
Neuroptera	14	38	44	27	18	33
Mecoptera	44	1	22	9	181	11
Syrphidae	56	83	152	57	42	118
Cicadellidae	205	199	171	291	617	253
Heteroptera	50	18	45	37	74	46
Homoptera	109	90	83	105	118	123
Totale Catturati	7.763	6.277	11.700	5.398	9.617	8.263
Totale Determinati	1.072	747	1.090	883	1.601	954

Tab. 2 - Rapporti dopo/prima trattamenti della cenosi campionata. Per *Opiliones* e *Mecoptera* non è disponibile alcun valore per l'assenza degli individui prima dei trattamenti.
Tab. 2 - After/before treatment ratios of coenosis sampled. No value is available for Opiliones *and* Mecoptera *due to tha lack of individuals before treatments.*

Taxa	2009			2010		
	Confidor 62,5%	Confidor 50%	Controllo	Confidor 50%	Confidor 62,5%	Controllo
Araneae	1,71	1,48	1,03	0,48	0,75	0,88
Altri *Hymenoptera*	0,88	1,12	1,0	0,28	0,18	0,75
Hymenoptera Ichneumonoidea	0,38	0,5	1,47	0,18	0,35	1,94
Hymenoptera Formicidae	1,68	2,61	1,72	1,4	0,17	2,14
Coleoptera Coccinellidae	0	5	1	0	0	1
Lepidoptera	3,63	8,25	2,2	0,64	2,27	1,78
Neuroptera	1,5	0,45	1,0	0,44	0,43	0,13
Diptera Syrphidae	6,67	9,67	21	0,84	0,86	1,38
Hemiptera Cicadellidae	0,04	0,13	1,59	0,48	0,38	3,1
Hemiptera Heteroptera	0,36	1	0,9	0,21	0,29	0,76
Hemiptera Homoptera	0,4	0,77	0,78	1,1	1,35	0,24
Totale	0,63	0,95	1,57	0,49	0,52	1,13

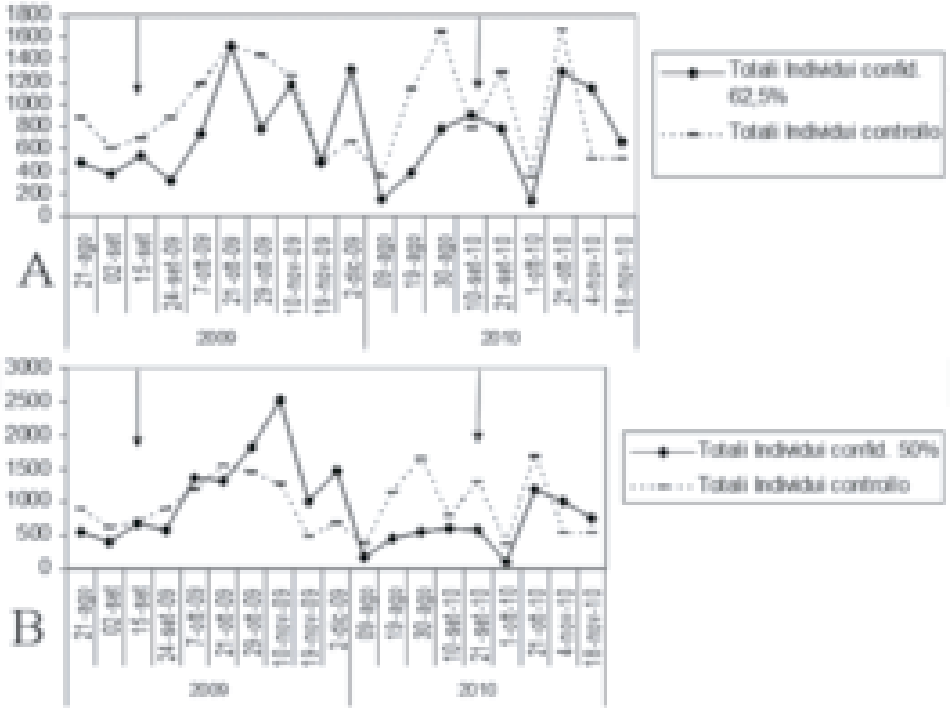

Fig. 1 - Fenogramma complessivo nelle tre stazioni campionate.
Fig. 1 - Total phenogram in the three stations sampled.

Conclusioni

I risultati ottenuti in questa ricerca mostrano nel complesso un impatto significativo dell'imidacloprid sugli artropodi non target. Tuttavia si nota che le conseguenze sull'artropodofauna non sono omogenee nei due anni di osservazione: nella seconda annualità si evidenzia una differenza statisticamente significativa solo tra la parcella trattata con Confidor O-TEQ alla massima concentrazione (62,5% g/hl) ed il controllo. Alcuni gruppi si sono mostrati più sensibili di altri ed in particolare gli *Homoptera Cicadellidae* hanno evidenziato un decremento significativo della loro popolazione. Quale considerazione generale si può evidenziare che gli insetticidi sistemici disturbano di meno l'entomofauna utile, parassitoidi e predatori, in quanto quest'ultimi si nutrono di prede e solo di rado, come nel caso di alcuni imenotteri parassitoidi (Krischik *et al.*, 2007), di tessuti vegetali, evitando il contatto con l'insetticida.

Riassunto

L'imidacloprid si è dimostrato efficace per la difesa contro il principale parassita dell'olivo, *Bactrocera oleae* (Rossi,1790), ma insufficienti sono le conoscenze sul suo impatto sulla fauna non target presente nell'ecosistema oliveto, che è composta in massima parte da artropodi. Pertanto, l'obiettivo di questa ricerca è stato quello di valutare l'impatto dell'imidacloprid su questa componente biotica utilizzando il formulato commerciale Confidor® O-TEQ con due differenti concentrazioni (50 e 62.5% g/hl). Le prove sono state condotte negli anni 2009 e 2010 nell'areale di Mirto-Crosia, situato sul litorale ionico cosentino e caratterizzato da elevati livelli di infestazione. I risultati ottenuti mostrano nel complesso un impatto significativo dell'imidacloprid sugli artropodi non target. Tuttavia le conseguenze sulla artropodofauna non sono omogenee nei due anni di campionamento, mostrando nella seconda annualità una differenza statisticamente significativa solo fra il campo trattato con il principio attivo alla massima concentrazione e il controllo. Alcuni gruppi si sono mostrati più sensibili di altri e in particolare gli *Homoptera Cicadellidae* hanno mostrato un calo significativo delle loro popolazioni. Per gli artropodi considerati utili (parassitoidi e predatori), non sembrano emergere dati di un forte impatto.

Parole chiave: imidacloprid, olivo, *Bactrocera oleae*, infestazione, Calabria

Ricerca effettuata nell'ambito del progetto RIOM- Risorse aggiuntive.

Bibliografia

Iannotta N., Belfiore T., Brandmayr P., Noce M.E., Scalercio S., 2006. *Impatto sull'ecosistema oliveto di alcuni fitofarmaci biologici*. L'Informatore Agrario, 44, 65-68.

Krischilk V.A., Landmark A.L., Heimple, G.E., 2007. *Soil-applied imidacloprid is translocated to nectar and kills nectar-feeding* Anagyrus pseudococci (Girault) *(Hymenoptera: Encyrtidae)*. Environ. Entomol., 36, 1238-1245.

Ruano F., Lozano C., Tinaut A., Peña A., Pascual F., Garcia P., Campos M., 2001. *Impact of pesticides on benefical arthropod fauna of olive groves*. *Pesticides and Beneficial Organisms*. IOBC/WPRS Bulletin., 24(4), 113-120.

Weibull A.C., Östman Ö., Granqvist Å., 2003. *Species richness in agroecosystems: the effect of landscape, habitat and farm mamagement*. Biodivers. Conserv., 12, 1335-1355.

Metodo LC/DAD/ESI/MS per la determinazione di Imidacloprid, Thiacloprid e Spinosad su olive e nell'olio di oliva dopo trattamenti in campo

Angioni A.[1*], Porcu L.[1], Bandino G.[2], Pirisi F.[1] e Sedda P.[2]
[1] Dipartimento Farmaco chimico Tecnologico, Università di Cagliari
[2] Agenzia per la Ricerca in Agricoltura della Sardegna, Dipartimento per la Ricerca nell'Arboricoltura (AGRIS-DIRARB), Cagliari (CA)

LC/DAD/ESI/MS method for the determination of Imidacloprid, Thiacloprid and Spinosad residues in olives and olive oil after field treatments

Abstract. The present study allowed investigating the behaviour of the residues of three insecticides, imidacloprid, thiacloprid and spinosad after treatment in field, and during the technological process of transformation in olive oil. Pesticide residues immediately after treatment were clearly under the maximum residue level (MRL) set for these insecticides on olives by the European Community, with average values of 0.14, 0.04 and 0.30 mg/kg for imidacloprid, thiacloprid and spinosad, respectively. At the pre-harvest interval (PHI) no residues were detected for the samples treated with imidacloprid and thiacloprid, while the samples treated with spinosad showed a residue of 0.04 mg/kg. The study of the effect of the technological process on pesticide transfer in olive oil showed that these insecticides tend to remain in the olive cake. The LC/DAD/ESI/MS method showed good recoveries ranging from 80 to 119%, and good instrument limits of quantitation (LOQs) and of determination (LODs). No matrix effect was detected.

Key words: LC/DAD/ESI/MS, olives, olive oil, pesticide residues, decline curve.

Introduzione

Le olive sono soggette a numerose patologie in campo, causate da insetti, funghi e malerbe, che possono portare anche alla perdita di prodotto per il 30% (Weems e Nation, 2009). Il parassita che maggiormente affligge la pianta d'olivo nel bacino del Mediterraneo è rappresentato dalla mosca dell'olivo (*Bactrocera oleae* (Gmelin), 1788, in passato *Dacus oleae*). Questo parassita causa un decadimento sia qualitativo che quantitativo dell'olio d'oliva (Koprinjak *et al.*, 2010). La difesa dell'olivo viene effettuata utilizzando molto antiparassitari di sintesi di diverse famiglie chimiche (Cabras *et al.*, 1993, 1997; Ferrer *et al.*, 2005; Amvrazi e Albanis 2007; Garcia *et al.*, 2007; Fuentesa *et al.*, 2010; Gilbert *et al.*, 2010). La maggiore coscienza del consumatore sulla salute umana e sull'ambiente hanno portato negli ultimi anni a ricercare composti di sintesi e naturali a bassissima tossicità da utilizzare in sistemi di lotta integrata per proteggere l'olivo dall'attacco della mosca (Cabras *et al.*, 2002; Caboni *et al.*, 2002; Alexandrakis *et al.*, 2005; Montiel Bueno e Jones, 2002). Imidacloprid, thiacloprid e spinosad sono pesticidi di nuova generazione con buone caratteristiche tossicologiche e di utilizzo in campo. Nonostante queste buone caratteristiche non sono presenti in letteratura lavori sulle olive e sull'olio che valutino il comportamento in campo e del processo tecnologico nei confronti di questi insetticidi. Gilbert *et al.* (2010) hanno riportato un metodo multiresiduo per la determinazione dei residui di imidacloprid e thiachloprid nelle olive, mentre Benincasa *et al.* (2011) hanno riportato la determinazione dello spinosad e dei suoi metaboliti nell'olio d'oliva. In questo lavoro è stato messo a punto un metodo veloce e facile da utilizzare per l'estrazione e la determinazione dei residui su olive e su olio, dopo trattamento in campo, di tre insetticidi largamente utilizzati contro la mosca dell'olivo, imidacloprid, thiacloprid e spinosad. Il metodo HPLC-DAD-ESI-MS utilizzato è stato validato secondo le norme EC SANCO/10684/2009 (Cunha *et al.*, 2007).

Materiali e metodi

Le prove di campo sono state effettuate in un oliveto della cv Semidana impiantato nel 1994, con un sesto d'impianto 5 x 4 m. E' stato utilizzato un siste-

* angioni@yahoo.com

ma a blocchi randomizzati con quattro replicazioni, ogni blocco era costituito da trenta piante. I formulati commerciali sono stati utilizzati alle concentrazioni consigliate dal produttore (Warrant SL - imidacloprid 17.1%, Cheminova, Roma; 200 g/l di acqua e 1.000 l/ha; Calypso SC - thiacloprid 48%, Bayer, Milano; 96 g/ha; Success 120 SC - spinosad 120 g/l; 12 ml/10 l di acqua e 1,8 l/ha). I campionamenti sono stati effettuati dopo 0, 3, 7 e 14 giorni dall'ultimo trattamento per l'imidacloprid e il thiacloprid e 0, 2, 4, 7 e 10 giorni per lo spinosad.

Per l'analisi strumentale è stato utilizzato un sistema HPLC Shimadzu (Milano) on line con un rivelatore di Massa MS2010. E' stata utilizzata un'eluizione isocratica: (A) 99,9% acqua-0,1% acido trifluoroacetico (TFA), e (B) acetonitrile-acqua (50:50, v/v) per 15 min. La colonna utilizzata era una Waters Symmetry, 3,5 µm, 2,1 x 150 mm I.D. (Milford, MA), il volume di iniezione era di 20 µl, e il flusso era di 0,4 ml/min. le analisi quantitative sono state effettuate in modalita SIM utilizzando i valori di m/z 256, 253, 732, e 746 per imidacloprid, thiacloprid e spinosyn A, e D, rispettivamente (fig. 1).

L'estrazione delle olive e dell'olio è stata effettuata utilizzando un sistema QuEChERS modificato per le matrici grasse (Cunha *et al.*, 2007; Gilbert *et al.*, 2010). 25 g di olive macinate e omogeneizzate o 2 g di olio erano pesati in una beuta da 250 ml estratti con 25 ml di acetonitrile, 5g di $MgSO_4$ e 3 g di NaCl, la beuta veniva agitata per 1 min in vortex e quindi per 10 min agitatore rotante. Dopo centrifugazione a 3.500 RPM un ml del surnatante veniva evaporato e ripreso con 1 ml di acqua per HPLC e iniettato nel sistema HPLC-DAD-ESI-MS per l'analisi. Il metodo è stato validato determinando la deviazione standard relativa (RSD) della ripetibilità intra day, la precisione intermedia interday, i recuperi a quattro livelli di concentrazione e la linearità espressa come R^2.

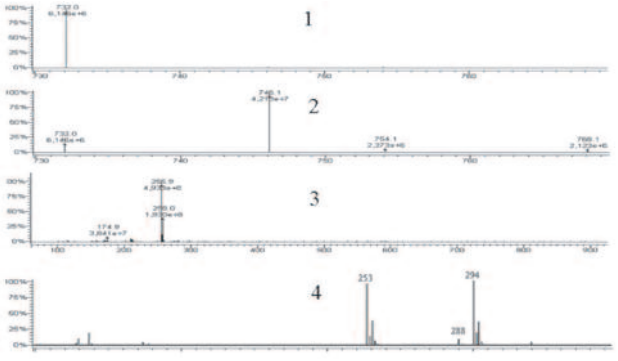

Fig. 1 - LC/ESI/MS SIM: spynosin A (1), spynosin D (2), imidacloprid (3) and thiacloprid (4).
Fig. 1 - LC/ESI/MS SIM: spynosin A (1), spynosin D (2), imidacloprid (3) and thiacloprid (4).

Risultati e discussione

Il metodo analitico ha permesso una buona separazione cromatografica dei composti analizzati (fig. 2). Il limite di quantificazione e di determinazione sono stati calcolati come 10 e 3 volte il valore del rapporto segnale/rumore. Per ogni insetticida sono state preparate curve di calibrazione a cinque punti, i coefficienti di correlazione (R^2) ottenuti variavano da 0,9989 (spinosyn D in matrice di olive) a 0,9998 (spynosyn A in matrice di olio d'oliva) e il CV% max era del 16% (tab. 1). Buoni recuperi sono stati ottenuti per tutti i pesticidi analizzati mostrando una buona accuratezza del metodo (tab. 2). La ripetibilità intraday è stata valutata per n=6, mentre la precisione intermedia per n=36 sia per le olive che per l'olio. Sono stati ottenuti buoni risultati per entrambi gli esperimenti con CV% ≤20) in accordo con EC SANCO/10684/2009 (Sanco, 2009). I residui di insetticidi dopo il trattamento erano molto bassi e al di sotto del MRL fissato in EU (tab. 3). I residui di imidacloprid diminuivano con un t½ di 10 giorni, passando da 0,14 mg/kg subito dopo il trattamento a 0,051 mg/kg dopo due settimane. Alla raccolta i residui di imidacloprid erano al di sotto del LOD ottenuto in questo studio. Il thiacloprid mostrava residui ben al di sotto del MRL e vicino al LOQ già dopo il trattamento. L'intervallo di sicurezza di questo insetticida è di 14 giorni, ma già dopo una settimana dall'esperimento i residui erano 0,01 mg/kg e successivamente non erano più determinabili. I trattamenti con spinosad considerano la somministrazione di dosi estremamente basse di pincipio attivo in campo, portando a livelli residuali notevolmente al di sotto del MRL o comunque prossimi al LOD analitico. Per poter valutare la curva di degradazione è stato necessario in questo caso utilizzare dosi di trattamento dieci volte maggio-

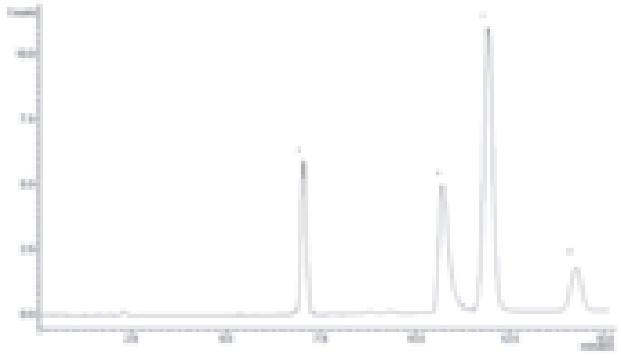

Fig. 2 - Cromatogramma LC/ESI/MS SIM a 0,1 mg/kg in matrici di olivo estratte da: spynosin A (1), spynosin D (2), imidacloprid (3), e thiacloprid (4).
Fig. 2 - LC/ESI/MS SIM chromatogram at 0.1 mg/kg in olive matrix extract of spynosin A (1), spynosin D (2), imidacloprid (3), and thiacloprid (4).

Tab. 1 - Limite del metodo analitico di quantificazione (LOQ) e determinazione (LOD) dei pesticidi nelle olive (mg/kg) e nell'oilo (mg/l). Coefficiente di correlazione e CV%.
Tab. 1 - Analytical method limits of quantification (LOQ) and determination (LOD) of the studied pesticides in olives (mg/kg), and olive oil (mg/l). Correlation coefficient and CV%.

Parametri		Imidacloprid	Thiacloprid	Spinosyn A	Spinosyn D
MRL	olive (mg/kg)	1	4	1,00 (sum of)	
	olio (mg/l)	-	-	0,01 (sum of)	
PHI (giorni)	olive (giorni)	28	14	7	
LOD	olive (mg/kg)	0,005	0,005	0,001	0,004
	olio (mg/l)	0,005	0,008	0,001	0,004
LOQ	olive (mg/kg)	0,01	0,01	0,01	0,01
	olio (mg/l)	0,01	0,01	0,01	0,01
Coeff. linearità	(mg/kg)	0,01 – 3.36	0,01 – 4,04	0,01-3,01	0,01 – 0,53
R^2 ± CV%	olive	0,9993 ± 12	0,9992 ± 4	0,9991 ± 15	0,9994 ± 16
	olio	0,9997 ± 8	0,9996 ± 6	0,9998 ± 7	0,9989 ± 8
Produzione olio (%)		15 ± 3	16 ± 1	16 ± 2	

Tab. 2 - Recuperi (% ± CV%) su olive (mg/kg) e olio (mg/l) a quattro livelli di fortificazione.
Tab. 2 - Recoveries in olives (mg/kg), and olive oil (mg/l) at four different levels of fortification.

Parametri	recoveries% (n=4) ± CV%					
		imidacloprid	thiacloprid		Spynosin A		Spynosin D
Olive	0,04	105 ± 13	97 ± 9	0,04	112 ± 5	0,01	93 ± 2
Olio		110 ± 1	87 ± 19		80 ± 3		92 ± 8
Olive	0,20	115 ± 4	99 ± 2	0,10	92 ± 4	0,02	102 ± 5
Olio		109 ± 5	106 ± 1		96 ± 4		100 ± 3
Olive	0,40	119 ± 4	101 ± 3	0,50	105 ± 7	0,09	100 ± 6
Olio		110 ± 5	85 ± 3		114 ± 3		112 ± 10
Olive	1,01	107 ± 3	96 ± 8	1,00	115 ± 5	0,18	101 ± 3
Olio		110 ± 3	86 ± 2		90 ± 3		103 ± 5

Tab. 3 - Residui (mg/kg) di imidacloprid, thiacloprid e spinosad in olive dopo il trattamento (n = 4).
Tab. 3 -. Residues (mg/kg) of imidacloprid, thiacloprid, and spinosad in olives after field treatment (n = 4).

Giorni post trattamento	Imidacloprid	Thiacloprid	Spinosad A + D
-0	n.d.	n.d.	n.d.
0	0,140 ± 0,03	0,04 ± 0,01	0,30 ± 0,02
3	0,096 ± 0,02	0,02 ± 0,00	0,15 ± 0,01
7	0,083 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,04 ± 0,01
10			n.d.
14	0,051 ± 0,01	n.d.	
28	n.d.		

ri di quelle consigliate dal produttore. In queste condizioni operative lo spinosad ha mostrato dopo il trattamento un residuo di 0,30 mg/kg che scendeva a 0,04 mg/kg dopo sette giorni con un tempo di dimezzamento (t½) di un giorno. Siccome tutti i pesticidi presentavano al PHI un residuo notevolmente basso la valutazione dell'influenza del processo tecnologico sul trasferimento di residui dalle olive all'olio, è stata effettuata utilizzando olive raccolte subito dopo il trattamento in campo. I campioni di olive utilizzate hanno mostrato una resa in olio di 15 - 16% (tab. 1). I dati ottenuti hanno permesso di affermare che gli insetticidi utilizzati in questo esperimento non sono trasferiti nell'olio se non a livelli molto bassi.

Riassunto

Lo studio ha permesso di valutare il comportamento in campo e durante il processo di trasformazione delle olive in olio di tre insetticidi imidacloprid, thiacloprid e spinosad. I residui riscontrati nelle olive subito dopo il trattamento erano nettamente al di sotto del massimo residuo ammissibile (MRL) stabilito nella comunità europea sulle olive, attestandosi in media a 0,14, 0,04 e 0,30 mg/kg per imidacloprid, thiacloprid e spinosad, rispettivamente. Alla raccolta dopo l'intervallo di sicurezza (PHI) i campioni trattati con imidacloprid e thiacloprid non hanno mostrato residui, mentre i campioni trattati con spinosad presentavano un residuo di 0,04 mg/kg. Il processo di tra-

sformazione delle olive in olio permetteva di attestare che il residuo era trattenuto dalla sansa e non veniva trasferito all'olio. Il metodo analitico LC/DAD/ESI/MS si è dimostrato efficace e sensibile, con buoni recuperi fra 80 e 119% e buoni limiti di determinazione (LODs) e quantificazione (LOQs). Non è stato osservato nessun effetto matrice durante la determinazione analitica dei residui.

Parole chiave: LC/DAD/ESI/MS, olive, olio d'oliva, residui di pesticidi, curve di degradazione.

Bibliografia

Alexandrakis V., Varikou K., Kalaitzaki A., Lykouressis D., 2005. *Effect of several insecticides for control of* Bactrocera oleae *(Gmelin) (Diptera: Tephritidae) to arthropods fauna of olive grove.* 2nd Eur. Meeting IOBC/WPRS Working Group 'Integrated Protection of Olive Crops' Florence, 26-28 october: 29.

Amvrazi E.G., Albanis T.A., 2006 *Multiresidue method for determination of 35 pesticides in virgin olive oil by using liquid-liquid extraction techniques coupled with solidphase extraction clean up and gas chromatography with nitrogen phosphorus detection and electron capture detection*. J. Agric. Food Chem. 54: 9642-9651.

Benincasa C., Perri E., Iannotta N., Scalercio S., 2011. *LC/ESI–MS/MS method for the identification and quantification of spinosad residues in olive oils*. Food Chem. 125: 1116-1120

Caboni P., Cabras M., Angioni A., Russo M., Cabras P., 2002. *Persistence of Azadirachtin Residues on Olives after Field. Treatment.* J. Agric. Food Chem. 50: 3491-3494.

Cabras P., Garau V.L., Melis M., Pirisi F.M., Spanedda L., 1993. *Persistence and fate of fenthion in olives and olive products.* J Agric Food Chem. 41: 2431-2433.

Cabras P., Angioni A., Garau V.L., Melis M., Pirisi F.M., Karim M., Minelli E.V., 1997 *Persistence of Insecticide Residues in Olives and Olive Oil.* J. Agric. Food Chem. 45: 2244-2247.

Cabras P., Caboni P., Cabras M., Angioni A., Russo M., 2002. *Rotenone Residues on Olives and in Olive Oil.* J. Agric. Food Chem. 50: 2576-2580.

Cunha S.C., Lehotay S.J., Mastovska K., Fernandes J.O., Oliveira M.B.P.P., 2007. *Evaluation of the QuEChERS sample preparation approach for the analysis of pesticide residues in Olives.* J. Sep. Sci. 30: 620-632.

Ferrer I., Thurman E.M., Fernández-Alba A.R., 2005. *Quantitation and accurate mass analysis of pesticides in vegetables by LC/TOF-MS.* Anal. Chem. 77(9): 2818-2825.

Fuentesa E., Báeza M.E., Díaz J., 2010. *Survey of organophosphorus pesticide residues in virgin olive oils produced in Chile.* Food Add Contam: Part B. 3(2): 101-107.

Garcia J.F., Ferrer C., Gomez M.J., Molina A., Fernandez A.R., 2007. *Determination of pesticide residues in olive oil and olives.* Trends Anal Chem. 26: 239-251.

Gilbert-López B., García-Reyes J.F., Lozano A., Fernández-Alba A.R., Molina-Díaz A., 2010. *Large-scale pesticide testing in olives by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry using two sample preparation methods based on matrix solid-phase dispersion and QuEChERS.* J. Chromatogr. A, 1217: 6022-6035.

Koprivnjak O., Dminic I., Kosic U., Majetic V., Godena S., Valencic V., 2010. *Dynamics of oil quality parameters changes related to olive fruit fly attack.* Eur. J. Lipid Sci. Technol. 112: 1033-1040.

Montiel Bueno A., Jones O., 2002. *Alternative methods for controlling the olive fly,* Bactrocera oleae, *involving semiochemicals.* IOBC wprs Bulletin.

SANCO/10684/2009 (01/01/2010), European Commission. *Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed.*

Weems H.V., Nation J.L., 2009. *Olive fruit fly,* Bactrocera oleae *(Rossi) (Insecta: Diptera: Tephritidae).* EENY-113 (IN270) DPI Entomology Circular No. 44, University of Florida.

Osservazioni sul comportamento di *Psyttalia concolor* nei confronti di *Bactrocera oleae*

Raspi A.[1*], Canale A.[1], Loni A.[1] e Bagnoli B.[2]
[1] Università di Pisa, Dipartimento di Coltivazione e Difesa delle Specie Legnose "G. Scaramuzzi"
[2] CRA-ABP, Centro di ricerca per l'Agrobiologia e la Pedologia, Firenze

Field and laboratory observations on *Psyttalia concolor* in relation to *Bactrocera oleae*

Abstract. Within the project "SIDIO" the parasitization of the endophagous solitary parasitoid *Psyttalia concolor* (Szépligeti) (Hymenoptera: Braconidae) against *Bactrocera oleae* (Rossi) under semi-field and laboratory conditions and the presence of the parasitoid in Tuscan olive-growing areas, were investigated. In semi-field conditions, the parasitized larval stages of *B. oleae* ranged from 14% (2009) to 44% (2008). Laboratory tests have confirmed that all the larval instars of *B. oleae* can be successfully parasitized by *P. concolor*. The parasitoid has been found in 2007 and 2009 only in coastal olive groves. The failure to find *P. concolor* in inland olive-growing areas could be due to the lower consistency of the olive fruit fly population that usually characterizes these areas.

Key words: olive fruit fly, parasitic wasps, Braconidae, Tuscany.

Introduzione

In ordine al controllo biologico della mosca delle olive, *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera Tephritidae), è noto che nel bacino del Mediterraneo il dittero non abbia parassitoidi specifici (Silvestri, 1914). In questa area geografica, sono rinvenibili nel periodo estivo solo quattro imenotteri calcidoidei idiobionti ectofagi e polifagi, non strettamente infeudati a tale fitofago e la cui incidenza sulle sue popolazioni risulta limitata. In molte aree olivicole mediterranee, comprese alcune della Toscana, è anche nota la spontanea presenza di *Psyttalia concolor* (Szépligeti) (Raspi *et al*., 1996; 2007), un imenottero braconide endofago coinobionte rinvenibile nel tardo autunno, la cui azione di contenimento non garantisce, al pari di quella dei calcidoidei, significative riduzioni dell'infestazione. Questo parassitoide, allevabile in laboratorio su *Ceratitis capitata* (Wiedemann), è stato ed è tuttora oggetto di grande interesse, nonostante gli insuccessi dei tentativi di introduzione ripetutamente effettuati nel secolo scorso. In condizioni di laboratorio, vari aspetti della bioetologia del braconide sono stati indagati, rimangono tuttavia da colmare molte carenze conoscitive su suoi aspetti comportamentali in condizioni naturali. Nell'ambito del progetto "SIDIO" (anni 2007-2010) (Bagnoli, 2011), tale tematica è stata affrontata valutando l'attività di parassitizzazione di *P. concolor* a carico di *B. oleae* in campo ed in laboratorio, per verificarne la capacità di attaccare stadi larvali differenti, e conducendo indagini sulla sua diffusione in aree olivicole toscane.

Materiali e metodi

Nel corso del triennio 2007-2009, sono state effettuate prove di semi-campo per valutare la capacità di esemplari di laboratorio di *P. concolor* di parassitizzare con successo larve di *B. oleae*. In un oliveto della fascia costiera toscana (Venturina, LI), sono state prese in considerazione due differenti densità del parassitoide (10 e 20 femmine) e ciascuna tesi è stata replicata cinque volte. Dopo aver isolato con manicotti di rete branche di olivo contenenti almeno 100 frutti, esemplari del parassitoide sono stati immessi e lasciati all'interno di tali manicotti per un periodo di 24 ore, trascorso il quale le olive di ogni branca sono state prelevate e collocate in contenitori in attesa dello sfarfallamento del parassitoide. Circa 2.000 olive sono state contestualmente prelevate dalle medesime piante, portate in laboratorio e utilizzate sia per verificare l'eventuale spontanea presenza di *P. concolor*, sia per caratterizzare l'infestazione di *B. oleae* presente al momento del rilascio.

Nei saggi di laboratorio sulla attività di parassitizzazione di *P. concolor*, è stata valutata la risposta di

* araspi@agr.unipi.it

femmine del parassitoide a stimoli provenienti da olive sane, infestate o da falsi frutti (una biglia di vetro del diametro di circa 1,5 cm di colore verde o frutti di *Prunus* sp., delle dimensioni di 1 cm circa e di colore verde acerbo). Abbiamo operato in condizioni di two-choice, utilizzando una still-air arena (contemporanea presenza di stimolo visivo e olfattivo), ricavata da una lastra di plexiglas (15×15 cm, 1 cm di altezza) costituita da una camera centrale circolare (4 cm di diametro), e da quattro camere delle stesse dimensioni, disposte a croce e collegate con la centrale da un corridoio lungo circa 1 cm (per operare in condizioni di two-choice, due camere erano ostruite). Le femmine venivano rilasciate singolarmente nella camera centrale e si annotava la scelta, intesa come la capacità di dirigersi con esattezza in direzione di uno degli stimoli messi a confronto e di iniziare la sequenza di *host-searching*. Per ogni tesi è stato osservato il comportamento di 50 femmine e ciascuna prova durava 3 minuti. Sono state utilizzate femmine di *P. concolor naive* (senza esperienza nella parassitizzazione) ed *experienced* (con esperienza nella parassitizzazione di *C. capitata*), oltre che olive sane e/o infestate da larve di *B. oleae.* Le olive appartenevano alle cvs Ascolana e Leccino; per ottenere olive infestate, queste sono state poste nelle gabbie di *B. oleae* per 48 ore e utilizzate dagli 8 ai 12 giorni successivi. I dati comportamentali relativi alla scelta sono stati analizzati statisticamente mediante il test del χ^2, apportando la correzione di Yates prevista per piccoli campioni (n<100).

Per le prove di parassitizzazione dell'ospite *B. oleae*, sono state utilizzate femmine *experienced* di *P. concolor* e olive della cv Ascolana, tenute per 24 ore in gabbie contenenti 100-150 individui di *B. oleae*. Per ottenere lotti di olive omogeneamente infestate da larve di differenti età, abbiamo operato tenendo conto dei tassi di crescita della mosca rilevati da Gambineri (2006) per una temperatura di laboratorio di 20±2 °C. Sono state messe a confronto le seguenti tesi, replicate due volte:

- L1 (larve di I età, 5 giorni dopo l'infestazione);
- L2 (larve di II età, 9 giorni dopo l'infestazione);
- L3 (larve di III età, 12 giorni dopo l'infestazione).

Per confermare la presenza dell'età larvale desiderata all'interno dell'oliva, un campione di queste è stato dissezionato ed analizzato allo stereomicroscopio. Per ogni tesi sono state analizzate 60 olive (ciascuna oliva costituiva una replica). Le olive sono state poste, in gruppi di 10, in una gabbia di plexiglas contenente circa 100-150 individui di *P. concolor*. Ogni oliva è stata fatta parassitizzare, facendovi deporre un solo uovo; successivamente l'oliva è stata tolta dalla gabbia e messa in un bicchierino in plastica da 200 ml coperto con rete a maglia fine. È stato quindi rilevato il numero di pupe e di adulti di *B. oleae* e il numero di adulti di *P. concolor* emersi per ogni replica.

Risultati e discussione

La figura 1 riporta i risultati delle prove di semicampo per valutare la capacità di *P. concolor* di parassitizzare con successo larve di *B. oleae*. È risultato evidente come il parassitoide possieda una buona capacità di adattamento alle condizioni di semicampo. La parassitizzazione degli stadi larvali disponibili è oscillata da un minimo di circa il 10% (anno 2009, tesi con 20 esemplari per branca insacchettata) a un massimo del 44% (anno 2008, tesi con 20 esemplari per branca insacchettata).

Dall'analisi complessiva dei risultati possiamo dedurre che anche in annate di bassa infestazione dacica (2008), *P. concolor* sia in grado di adattarsi alle condizioni sperimentali descritte e di parassitizzare con successo larve di mosca di prima e seconda età, nonostante la specie sia allevata in laboratorio ininterrottamente dal 1990 su *C. capitata*.

Nei biosaggi in *still-air arena* abbiamo riscontrato una sostanziale quota di femmine che non hanno operato alcuna scelta (37±3 % e 36±7 %, per le femmine *naive* ed *experienced*, rispettivamente). Le femmine *naive* sono attratte significativamente da un'oliva sana rispetto al controllo (assenza di stimolo) (23 *vs* 7, rispettivamente, χ^2=8,57; g.d.l.=1; P<0,01). L'oliva sana però non è uno stimolo sufficiente nella scelta quando le stesse femmine sono messe di fronte ad un

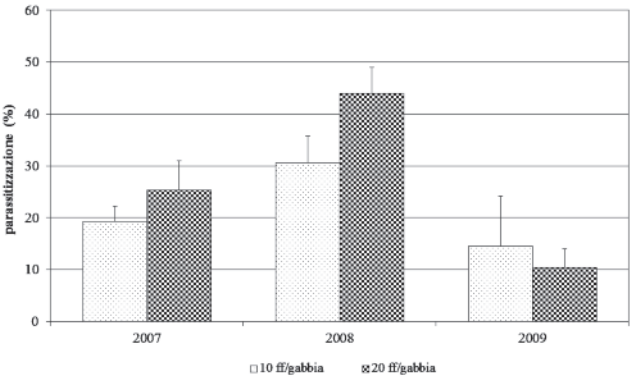

Fig. 1 - Venturina (LI). Tassi medi di parassitizzazione di larve di *B. oleae* da parte di *P. concolor*, rilevati in condizioni di semicampo per due differenti densità del parassitoide (10 e 20 femmine/gabbia).
Fig. 1 - Venturina (LI). Mean rates of P. concolor *parasitization on* B. oleae *larvae, obtained in semi-field conditions for two different densities of the parasitoid (10 and 20 females/cage).*

falso frutto (biglia). Stimolo significativo risulta essere l'oliva infestata nei confronti di un falso frutto (biglia) (21 *vs* 10, rispettivamente, χ^2=3,93; g.d.l.=1; P<0,05). L'oliva infestata non ha dato risultati significativi quando messa a confronto con un'oliva sana. Utilizzando femmine *experienced*, l'oliva sana non ha dato risultati significativi rispetto ai frutti di *Prunus* sp. Risposte significative si sono avute quando l'oliva infestata è stata messa a confronto con la biglia (28 *vs* 7, rispettivamente, χ^2=12,61; g.d.l.=1; P<0,01) o con l'oliva sana (20 *vs* 9, rispettivamente, χ^2=4,30; g.d.l.=1; P<0,05).

In figura 2 sono evidenziati i risultati delle prove di parassitizzazione di differenti stadi larvali di *B. oleae.* Lo sfarfallamento di *P. concolor* da larve di II e III età è risultato pressoché identico (27,6% e 27,8%, rispettivamente). I risultati ottenuti nelle prove con larve di II età sono in accordo con quelli di Gambineri (2006) e di Canale (1999, 2001, 2002).

Infine, le indagini volte alla verifica della presenza di *P. concolor* in differenti comprensori olivicoli toscani, effettuate a partire dal primo anno di indagine con periodiche raccolte di pupari di *B. oleae,* hanno evidenziato la presenza del parassitoide solo nel 2007 e nel 2009, in oliveti costieri della provincia di Livorno e di Grosseto. Nel 2008, anno di bassa infestazione dacica, non è stato possibile rilevare la presenza del braconide in alcuna delle aree toscane indagate. Ricerche precedenti (Raspi *et. al.* 1996; Raspi *et. al.* 2007) avevano messo in evidenza come il parassitoide sia frequentemente associato alla mosca delle olive nella Toscana litoranea, nelle isole dell'Arcipelago Toscano ed in Corsica. Facendo parte dell'entomofauna utile dell'agro-ecosistema oliveto, *P. concolor* è un parassitoide che merita di essere ulteriormente studiato per aspetti di base come pure applicativi.

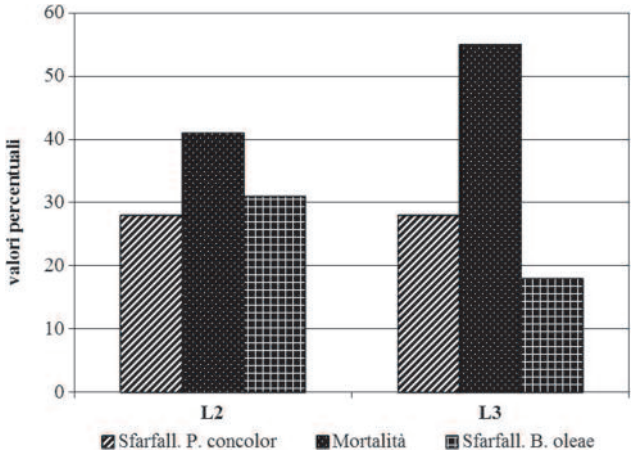

Fig. 2 - Tassi di parassitizzazione di *P. concolor* nei confronti della seconda (L2) e terza (L3) età larvale di *B. oleae*, in condizioni di laboratorio.

Fig. 2 - Parasitization rates of P. concolor *on the second (L2) and third (L3) larval instars of* B. oleae*, in laboratory conditions.*

Conclusioni

Nonostante *P. concolor* sia allevata in laboratorio ininterrottamente dal 1990 su *C. capitata,* i risultati di parassitizzazione ottenuti in condizioni di semi-campo e di laboratorio denotano come questo braconide possa parassitizzare larve di mosca di differenti età, in particolare quelle di I e II. Da un punto di vista applicativo, questa evidenza suggerisce l'opportunità di rilasciare il parassitoide in campo quando siano prevalenti larve giovani (I e II età) del fitofago. Le indagini volte alla verifica della presenza del parassitoide in differenti aree olivicole toscane indicano che esso sembra essere presente solo in oliveti costieri e che la sua presenza in questo areale possa dipendere dall'entità dell'infestazione dacica. Una possibile spiegazione della sua presenza esclusiva nelle aree olivicole di costa potrebbe risiedere nel fatto che, in tali oliveti, l'infestazione è mediamente più precoce ed elevata che non nelle aree interne. Ad ogni modo, il parassitoide svolge un utile ruolo di contenimento, benché non sufficiente a limitare l'incidenza economica del danno prodotto dal fitofago. La strada del controllo biologico della mosca delle olive con entomofagi passa comunque dalla individuazione di altri parassitoidi, esotici, specifici e più efficaci, che possano nelle nostre aree integrare l'azione di contenimento comunque svolta da *P. concolor* e dai calcidoidei ectofagi e polifagi, di norma attivi nel periodo estivo.

Riassunto

Nell'ambito del progetto SIDIO, la tematica del controllo biologico della mosca delle olive con entomofagi è stata affrontata indagando l'attività di parassitizzazione dell'imenottero *Psyttalia concolor* (Szépligeti) (Braconidae) nei confronti di *Bactrocera oleae* (Rossi) in condizioni di semi-campo e in laboratorio, e la presenza del parassitoide in differenti aree olivicole toscane. In condizioni di semi-campo, la parassitizzazione degli stadi larvali di *B. oleae* disponibili (larve di prima e seconda età) è oscillata da un minimo di circa il 14% (2009) a un massimo del 44% (2008). Prove di laboratorio hanno permesso di confermare che tutte le età larvali di *B. oleae* sono parassitizzabili con successo da *P. concolor.* Le indagini sulla diffusione del parassitoide in Toscana, hanno evidenziato la sua presenza solo in comprensori olivicoli costieri, sia nel 2007 che nel 2009. Il mancato ritrovamento di *P. concolor* nelle aree olivicole inter-

ne della Toscana, potrebbe essere dovuto alla minore consistenza numerica delle popolazioni daciche che solitamente caratterizza queste aree.

Parole chiave: mosca delle olive, parassitoidi, Braconidae.

Ricerca svolta nell'ambito del progetto SIDIO (Strategie Innovative per la Difesa Integrata in Olivicoltura) co-finanziato da ARSIA Regione Toscana per gli anni 2007-2010.

Bibliografia

BAGNOLI B., 2011. *Il rame per la difesa*. Olivo e Olio, 14 (6): 6-11.

CANALE A., 1999. *Studi bio-etologici su parassitoidi di Ditteri Tefritidi di interesse economico: il superparassitismo in* Opius concolor *Szépligeti (Hymenoptera: Braconidae)*. Ph. D. Thesis, Università di Pisa.

CANALE A., 2001. *Effect of exposure time on superparasitism of* Ceratitis capitata *(Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) fully-grow larvae by* Psyttalia concolor *(Szépligeti) (Hymenoptera: Braconidae)*. Frustula entomologica, 26: 167-172.

CANALE A., 2002. *Superparasitism of* Psyttalia concolor *(Szépligeti) (Hymenoptera Braconidae) at three different parasitoid/host ratio.* Frustula entomologica, 25: 110-116.

GAMBINERI S., 2006. Psyttalia concolor *(Szépligeti) (Hymenoptera Braconidae): saggi di laboratorio sulla parassitizzazione di mosca delle olive.* Tesi di laurea, Facoltà di agraria, Università di Pisa.

RASPI A., CANOVAI R., ANTONELLI R., 1996. *Andamento dell'infestazione di* Bactrocera oleae *(Gmelin) in oliveti del Parco regionale della Maremma.* Frustula entomologica, 19: 189-198.

RASPI A., LONI A., CANOVAI R., CANALE A., 2007. *Entomophages of olive pests in Corsica, coastal Tuscany and Islands of Tuscan archipelago.* Frustula entomologica, 30: 187-194.

SILVESTRI F., 1914. *Viaggio in Eritrea per cercare i parassiti della mosca delle olive*. Boll. Lab. Zool. Gen. e Agr., Portici, 9: 186-226.

Studio della resistenza di genotipi di olivo a *Verticillium dahliae* Kleb. e relativa risposta della pianta

Vizzarri V.[1], Ferrara M.[2], Salimonti A.[1], Zelasco S.[1], Iannotta N.[1], Santilli E.[1], Perri E.[1] e Nigro F.[2*]

[1]*C.R.A. Centro di Ricerca per l'Olivicoltura e l'Industria Olearia, Rende (CS)*

[2]*Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti, Università di Bari "Aldo Moro"*

Studies on genetic resistance and defence response against *Verticillium dahliae* Kleb. in *Olea europaea* L.

Abstract. Verticillium wilt, caused by the soil-borne fungus *Verticillium dahliae Kleb.,* is one of the most important disease of olive worldwide. It is responsible for severe dieback and death of the olive trees in the southern regions of Italy and occurs with increasing frequency and severity in most olive-growing areas of the Mediterranean basin. Certification of propagative material and the preventive diagnostic tests of soil prior to planting, are more concrete measures to limit the spread of the disease. The search for sources of genetic resistance is a useful and environmentally sustainable strategy to control the disease too. The CRA-OLI and the University of Bari, have been searching for years genetic resistance sources, by screening olive cultivars and different pathotypes of *V. dahliae* and, more recently, by studying the host/pathogen interaction with molecular approaches. In this work, the genetic resistance of some important olive cultivars has been evaluated by means of susceptibility tests to the disease. Moreover, a molecular technique to investigate the expression of genes involved in defense response has been developed.

Key words: tracheomycosis, resistance, *Olea europaea* L., *PAL*, *CHS*

Introduzione

La verticilliosi, causata dal fungo *Verticillium dahliae* Kleb., è una grave tracheomicosi di molte piante arboree ed erbacee. In seguito al diffondersi dell'irrigazione e delle tecniche di coltivazione intensiva e superintensiva nell'olivicoltura, la malattia è in espansione in diversi paesi del bacino del Mediterraneo. La gravità, inoltre, risulta accentuata dalle notevoli difficoltà tuttora esistenti in merito all'impiego della lotta chimica, in quanto i trattamenti con fosetyl-Al iniettato direttamente nel sistema conduttore della pianta sono di difficile applicazione in campo e poco efficaci. Considerata la difficoltà della lotta diretta contro la malattia, la prevenzione mediante l'impiego di materiale di propagazione sano, la realizzazione dei nuovi impianti in terreni non infestati dal patogeno, nonché l'impiego di cultivar resistenti, costituiscono al momento i mezzi più efficaci e concreti di lotta. In precedenti esperienze, alcuni genotipi di olivo hanno mostrato un diverso comportamento rispetto a infezioni artificiali del patogeno (Vizzarri *et al.*, 2009), stimolando ulteriori ricerche per la comprensione dei meccanismi di resistenza mediante approcci molecolari. Infatti, poco è noto dalla letteratura circa la natura e/o i meccanismi biochimici e molecolari della resistenza dell'olivo a *V. dahliae.* Tra gli aspetti indagati, di rilievo appare il ruolo del metabolismo fenolico (Markakis *et al.,* 2010; Baidez *et al.,* 2007). In questo lavoro vengono riportati i risultati di uno *screening* di suscettibilità alla verticilliosi di alcune varietà di olivo, nonché la messa a punto di un metodo molecolare per lo studio dei meccanismi di resistenza della pianta, mediante lo studio dell'espressione di geni (fenilalanina ammonio-liasi, *PAL*; calcon-sintasi, *CHS*) coinvolti nel metabolismo fenolico dell'olivo.

Materiali e metodi

I ceppi di *V. dahliae,* denominati "F ND Sicilia", "ND M Puglia", "D Puglia" "ND Calabria"e "ND Umbria" sono stati impiegati in questo screening di resistenza; ad eccezione del ceppo "ND M", isolato da mandorlo, gli altri ceppi sono stati ottenuti da olivo mediante isolamento su PDA (**P**atata-**D**estrosio **A**gar) a pH 5.5. Lo schema sperimentale ha previsto l'impiego di piantine appartenenti alle cultivar Arbequina, Arbosana, Frantoio, Ottobratica, Sant'Agostino e Urano. Dieci piantine per ogni cultivar sono state inoculate artificialmente con ciascuno dei cinque ceppi di

* franco.nigro@uniba.it

V. dahliae; altre dieci piante per varietà sono state utilizzate come controllo. Le piantine, di circa 18 mesi di età e alte circa 160 cm, sono state inoculate a fine giugno, ponendo un tassello di agar, prelevato da una colonia di ciascun ceppo di 30 gg di età, sul fusto dopo aver rimosso la corteccia. Il sito di inoculazione è stato coperto con cotone umido e avvolto con parafilm allo scopo di prevenire l'essiccamento. Le piante controllo sono state inoculate allo stesso modo, utilizzando tasselli di solo PDA. Dopo l'inoculazione tutte le piantine sono state collocate in serra e tenute in osservazione per un anno. La gravità della malattia è stata valutata mediante una scala empirica comprendente 5 classi, individuate sulla base della percentuale di chioma con sintomi e della loro intensità: 0% pianta sana; 20% clorosi diffusa e ripiegamento a doccia di diverse foglie; 50% ripiegamento a doccia delle foglie e parziale disseccamento del germoglio apicale; 75% disseccamento di oltre metà pianta; 100% completo disseccamento, senza defogliazione, dell'intera pianta con morte del soggetto infetto (Colella *et al*., 2008). I rilievi sono stati effettuati in tre periodi dell'anno (1-metà dicembre 2010, 2-metà marzo e 3-metà giugno 2011). Per la messa a punto di un metodo molecolare per lo studio dell'espressione di geni coinvolti nella risposta di difesa dell'olivo sono state utilizzate piante della cv Leccino di 14 mesi di età, sia artificialmente ferite al fusto che non ferite. Sono stati disegnati primers specifici per quantificare il livello relativo di trascritto del gene *PAL* (GeneBank AY738639.1) e *CHS* (GeneBank AF384049.1) mediante Real Time-qPCR (RT-qPCR). L'espressione dei geni è stata normalizzata rispetto al gene β-actin (*act1*) di *Olea europaea* (GeneBank AF545569.1), utilizzato come *housekeeping* endogeno (Nigro *et al.,* 2006). L'espressione relativa dei geni *PAL* e *CHS* è stata determinata mediante il metodo ΔΔCt (Pfaffl, 2001).

Risultati e discussione

Dall'esame della tabella 1 si evince che le cultivar Frantoio e Urano non hanno mostrato alcun sintomo evidente di verticilliosi in tutte le tesi saggiate. Un'unica pianta della cultivar Arbosana, inoculata con il ceppo "NDM Puglia" ha manifestato una gravità della malattia del 100%; la cultivar Arbequina ha evidenziato complessivamente sette piante malate, di cui cinque con gravità al 100% e due al 75%; relativamente ai ceppi del patogeno, invece, il "D Puglia" e il "ND M Puglia" (isolato mandorlo), sono risultati i ceppi più virulenti. Evidenti sintomi della malattia sono stati osservati su sei piante della cv Ottobratica, delle quali quattro con gravità al 100% e due al 75%, risultando i ceppi "D Puglia", "ND M Puglia" e "ND Sicilia", quelli più virulenti. Le piante della cultivar Sant'Agostino sono risultate complessivamente quelle più recettive al metodo di infezione utilizzato, mostrando sintomi su nove delle 50 piante inoculate, tutte con una gravità del 100%. Il ceppo di *V. dahliae* più virulento è risultato il "D Puglia" (6/50), seguito da "ND Sicilia" (2/50) e "ND M Puglia" (1/50).

Tali risultati sono in accordo con quanto osservato in precedenti prove svolte presso il Cra-Oli. Il comportamento delle piante della cultivar Arbequina, invece, è risultato contraddittorio rispetto a quanto osservato precedentemente, probabilmente a causa del fatto che una maggiore gravità della malattia è stata riscontrata con l'inoculo dei ceppi "D Puglia" e "ND M Puglia", entrambi non saggiati nella precedente prova, laddove, invece, era stato utilizzato esclusivamente il ceppo "ND Sicilia", per tutte le cultivar oggetto di indagine. In particolare, il ceppo "ND M Puglia" isolato da piante di mandorlo è probabilmente caratterizzato da un diverso livello di virulenza rispetto ai ceppi isolati da piante di olivo infette. Il metodo sviluppato per lo studio dell'espressione dei geni *PAL* e *CHS* coinvolti nei meccanismi di difesa dell'olivo è risultato efficace e sensibile, con un ampio range di valori in cui la concentrazione del DNA e il numero dei cicli soglia (Ct) ottenuti dalla RT-qPCR sono risultati linearmente correlati (*PAL*: efficienza di PCR = 96,84 %; R^2= 0,991; *CHS*: efficienza di PCR = 100,92 %; R^2= 0,997). Il livello di trascritto dei geni *PAL* e *CHS* ha mostrato significativi incrementi nel

Tab. 1 - Risultati del saggio di suscettibilità genotipica. Cultivar e isolati utilizzati (10 repliche per ogni cultivar).
Tab. 1 - Results of the genotypic susceptibility assay. Cultivars and isolates used (10 replicates for each cultivar).

Isolato	Arbequina (%)				Arbosana (%)				Urano (%)				S. Agostino (%)				Ottobratica (%)				Frantoio (%)			
	20	50	75	100	20	50	75	100	20	50	75	100	20	50	75	100	20	50	75	100	20	50	75	100
ND (Sicilia)																2			1	1				
ND M (Puglia)			2	2				1								1			1	1				
D (Puglia)				3												6				2				
Mirto (Calabria)																								
ND (Umbria)																								

tempo, raggiungendo il valore più alto nove ore dopo l'evento traumatico. Successivamente, il livello di trascritto di entrambi i geni ha mostrato un certo decremento, più evidente per il gene *PAL* dopo 24 ore, mantenendosi comunque a livelli significativamente elevati fino a 30 giorni dopo la ferita (fig. 1). Tale metodo ha consentito di verificare che i tempi di risposta della pianta sono piuttosto brevi, collocandosi nell'arco delle 9-12 ore. Le prove di valutazione dell'espressione dei geni PAL e CHS nelle piantine delle varieta di olivo saggiate verso le infezioni di ceppi D e ND di V. dahliae sono in corso. La valutazione del livello di espressione di *PAL* e *CHS* in varietà con diverso comportamento nei confronti del patogeno potrà consentire di verificare il ruolo del metabolismo fenolico nei meccanismi di resistenza dell'olivo. Recenti ricerche hanno dimostrato che le sostanze fenoliche risultano di fondamentale importanza nella modulazione della risposta di resistenza/suscettibilità dell'olivo alla verticilliosi. La risposta fenolica all'infezione di *V. dahliae*, infatti, risulta molto diversa tra varietà suscettibili e resistenti. Significativi incrementi di fenoli totali, orto-difenoli, oleuropeina e verbascoside sono stati osservati in piante della cv Koroneiki (resistente), rispetto alla cv Amfissis (suscettibile), inoculate sia con patotipi defoglianti (D) che non-defoglianti (ND) (Markakis *et al.,* 2010). I geni *PAL* e *CHS* occupano un ruolo centrale nella biosintesi delle sostanze fenoliche, agendo rispettivamente a monte e più a valle della relativa pathway biosintetica. Pertanto, è ipotizzabile un loro ruolo nei meccanismi di resistenza dell'olivo a *V. dahliae*.

Conclusioni

Queste prove hanno dimostrato e/o confermato un diverso comportamento delle cultivar saggiate in relazione all'inoculazione con diversi ceppi di *V.dahliae*, mettendo in evidenza ulteriormente come la resistenza genetica della cultivar sia subordinata alla virulenza del ceppo patogeno. La cv Frantoio non ha mostrato alcun sintomo della malattia, evidenziando una potenziale resistenza genetica al patogeno; le cv Ottobratica e Sant'Agostino hanno mostrato una elevata suscettibilità alla malattia. Ad ulteriori approfondimenti, invece, sono demandati le conclusioni circa il comportamento delle cv Arbequina, Arbosana e Urano, tre cultivar in crescente diffusione con i nuovi impianti superintensivi: le prime due hanno mostrato una sensibilità diversa in relazione alla virulenza del ceppo di *V. dahliae* impiegato nel saggio, "Urano" invece non ha mostrato alcuna suscettibilità nei confronti dei ceppi utilizzati, pertanto potrebbe acquisire un ruolo di grande importanza nella gestione ecosostenibile dei nuovi impianti. Le ricerche, proseguiranno con ulteriori approfondimenti, sia sul comportamento dei diversi genotipi verso ulteriori ceppi di *V. dahliae* sia sul ruolo svolto da geni chiave del metabolismo fenolico nei meccanismi di resistenza dell'olivo.

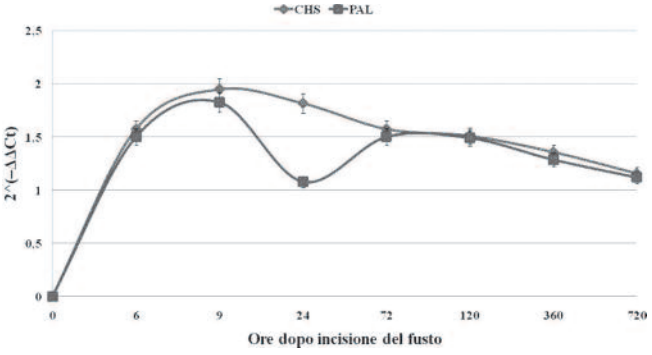

Fig. 1 - Monitoraggio dell'espressione relativa dei geni PAL e CHS in foglie di piante di olivo (cv Leccino) ferite al fusto, rispetto a piante non ferite.

Fig. 1 - Time course of the relative transcript level of PAL and CHS genes in the leaves of stem-wounded olive plantlets (cv Leccino), as compared to unwounded plantlets.

Riassunto

La verticilliosi, causata da *Verticillium dahliae* Kleb., è una malattia tracheomicotica tra le più difficili da gestire che costituisce la principale causa di deperimento e morte delle piante di olivo nelle regioni meridionali d'Italia e che risulta in espansione anche nelle principali aree olivicole del Mediterraneo. La certificazione fitosanitaria del materiale vivaistico, unitamente alla verifica e selezione pre-impianto di terreni non infestati, costituiscono le misure più concrete nella prevenzione della malattia. La ricerca di fonti di resistenza genetica rappresenta una strategia valida ed eco-sostenibile per il controllo della malattia. Il CRA-OLI e l'Università di Bari, conducono da anni studi relativi alla ricerca di fonti di resistenza genetica, attraverso lo *screening* di cultivar di olivo, l'impiego di diversi patotipi di *V. dahliae* e, più recentemente, studiando l'interazione ospite/patogeno anche con approcci molecolari. In questo lavoro è stata valutata la resistenza genetica di alcune importanti cultivar attraverso uno *screening* di suscettibilità alla verticilliosi e la messa a punto di una tecnica molecolare per studiare l'espressione di geni coinvolti nella risposta di difesa.

Parole chiave: tracheomicosi, resistenza, *Olea europaea* L., *PAL*, *CHS.*

Bibliografia

Baidez A.G., Gomez P., Del Rio J. A., Ortuno A., 2007. - *Dysfunctionality of the xylem in* Olea europaea *L. plants associated with the infection process by* Verticillium dahliae *Kleb. role of phenolic compounds in plant defense mechanism.* J. Agr. Food Chem., 55: 3373-3377.

Cirulli M., Montemurro G., 1976. *A comparison of pathogenic isolates of* Verticillium dahliae *and sources of resistance in olive.* Agriculturae Consepctus Scientificus, 39: 469-476.

Colella C., Miacola C., Amenduni M., D'amico M., Bubici G., Cirulli M., 2008. *Sources of verticillium wilt resistence in wild olive germplasm from the Mediterranean region*. Plant Pathology, 57: 533-539.

Markakis E.A., Tjamos S.E., Antoniou P.P., Roussos P.A., Paplomatas E.J., Tjamos E.C., 2010. *Phenolic responses of resistant and susceptible olive cultivars induced by defoliating and nondefoliating* Verticillium dahliae *pathotypes*. Plant Disease, 94 (9): 1156-1162.

Nigro F., Pentimone I., Mammella M., Ligorio A., Ippolito A., Salerno M.G., 2006. *Increase of transcript level of PAL and CHS genes in olive plantlets following* Verticillium dahliae *infection and acibenzolar-s-methyl application*. Journal of Plant Pathology, 88 (3, Supplement), S51.

Pfaffl M.W., 2001. *A new mathematical for relative quantification in real time RT-PCR.* Nucl. Ac. Res., 29 (9): 2002-2007.

Vizzarri V., Belfiore T., Noce M.E., Scalercio S., Iannotta N., 2009. *Test di resistenza genetica alla verticilliosi (*Verticillium dahliae *Kleb.) su alcune importanti e diffuse cultivar di olivo*. Atti I Convegno Nazionale "Olivo e Olio", Portici (NA), 1-2 ottobre. Acta Italus Ortus 1: 390-393.

Impiego dei sottoprodotti olivicoli nella lotta ai nematodi fitoparassiti in alternativa agli agrofarmaci in un regime di agricoltura sostenibile

Basile T.[1], Russo G.[1*] e Sasanelli N.[2]
[1] Dipartimento di Scienze Agro-Ambientale e Territoriale, Universitàdi Bari "Aldo Moro"
[2] CNR IPP, Istituto di Protezione delle Piante, UOS di Bari

Use of olive mill wastes in the control of plant parasitic nematodes as an alternative to chemicals in a sustainable agriculture

Abstract. In this article, the soppressive effects of different olive mill wastes on the phytoparasitic nematodes *Meloidogyne incognita* and *Xiphinema index* are reported from experimental trials carried out in protected conditions. Crop residues and olive mill wastes (leaves, raw sewage and fresh and exausted olive pomaces) were incorporated into the soil for the control of the root-knot nematode *M. incognita* on tomato. In addition, in glasshouse condition on grapevine, fresh olive pomace at different rates was used as soil amendment to control the nematode virus vector *X. index*. In both trials the materials used in the experiments showed a significant suppressive activity against the two considered plant parasitic nematode populations. Incorporation of these materials into the soil could represent a possible alternative solution either to the use of synthetic nematicides and to their disposal in the aereas of cultivation of olive as large amounts of these materials are produced every year in a short time.

Key words: Olive pomace, raw sewage, *Meloidogyne incognita*, *Xiphinema index*, suppressive action.

Introduzione

Le recenti disposizioni legislative della Comunità Europea (Reg. CE 396/2005; 1095/2007; 33 e 299/2008; 1107/2009) hanno profondamente rivisto e ristretto l'uso dei pesticidi sulle colture di interesse agrario ed hanno focalizzato l'attenzione sulla sicurezza ambientale e sulla salute umana ed animale. La difesa delle piante da nematodi fitoparassiti, nonché da altri agenti biotici sia di natura fungina che entomologica, deve essere basata su strategie alternative di controllo che siano eco-compatibili ed economicamente sostenibili. Gli agrofarmaci impiegati in agricoltura hanno, pertanto, subito nel tempo e recentemente una notevole variazione che è stata determinata principalmente da due fattori: cresciuta specificità d'azione e riduzione dell'impatto ambientale. I prodotti attualmente in commercio devono possedere una bassa tossicità ed un ridotto impatto ambientale (Russo e Basile, 2011). I prodotti chimici ad azione nematocida applicati in agricoltura, alla pari degli altri prodotti di sintesi, sono stati oggetto di particolare attenzione in questi ultimi decenni. Le quantità di principi attivi applicati per ettaro di terreno sono elevate, anche se le dosi hanno subìto nel tempo notevoli riduzioni, dal 75% sino, in alcuni casi, al 92% (Lamberti *et al*., 1988).

La sensibilizzazione alle problematiche per un effettivo miglioramento dell'impiego di prodotti di sintesi, una descrizione più realistica dell'interazione tra chimica ed agricoltura, una qualificazione profonda delle varie componenti presenti nel comparto agricoltura, una cooperazione ed una interazione tra chi consuma, chi produce e chi consiglia, inseriti realisticamente nel nostro sistema agricolo, hanno prodotto risultati concreti tenendo sempre a mente il binomio sviluppo economico e tutela ambientale.

In questa ottica e con la consapevolezza di queste nuove esigenze che superano la contrapposizione tra sviluppo economico in qualsiasi modo e tutela ambientale a qualsiasi costo, sono stati condotti diversi esperimenti, per mostrare che è possibile combinare le esigenze di produttività con la tutela dell'ambiente e la sicurezza del consumatore. Allo scopo di ridurre e/o trovare una alternativa all'impiego di nematocidi di sintesi per una maggiore tutela ambientale, sono state considerate due prove sperimentali, dirette ad accertare l'azione soppressiva sulle popolazioni di

[*]rsgr01ag@uniba.it

nematodi fitoparassiti dei residui di lavorazione delle industrie olearie. L'impiego di residui colturali e dei sottoprodotti dell'attività di molitura delle olive potrebbe costituire una innovativa strategie di lotta alternativa all'uso di nematocidi di sintesi per il contenimento di specie di nematodi fitoparassiti ed al contempo darebbe un notevole contributo allo smaltimento di tali sottoprodotti, che costituiscono un serio problema ambientale in quanto, nell'ambito soprattutto del bacino del Mediterraneo, sono prodotti in elevati quantitativi in un arco di tempo molto ristretto. Il loro interramento nel terreno, inoltre, favorisce nel tempo un miglioramento delle caratteristiche fisiche e chimiche del terreno, incluso l'aumento di fertilità (Pagliai, 1996). L'azione tossica della sansa vergine è stata mostrata in vari esperimenti, e successivamente sono stati indagati anche altri scarti di lavorazione sempre ottenuti dalla spremitura delle olive (D'Addabbo *et al*., 1997; Sasanelli *et al.*, 2002).

In questa nota vengono riportati i risultati di due dei più significativi esperimenti condotti impiegando i sottoprodotti ottenuti dalla molitura delle olive per mostrare una possibile alternativa ecocompatibile di lotta ai nematodi fitoparassiti nelle condizioni pedoclimatiche dell'Italia meridionale (D'Addabbo *et al.*, 1998; 1999).

Materiali e metodi

I materiali e i metodi sono ampiamente descritti nei due lavori citati (D'Addabbo *et al.*, 1998; 1999), di seguito riportiamo una loro breve descrizione. I sottoprodotti della coltivazione dell'olivo e dell'estrazione dell'olio (foglie triturate di olivo, sansa fresca ed esausta di olive ed acque di vegetazione), nella misura dell'1% in peso, sono stati interrati in un terreno sabbioso fortemente infestato da *Meloidogyne incognita* (Kofoid *et* White) Chitw. (32 uova e larve per grammo di terra). Dopo un mese dall'interramento, il terreno è stato travasato in vasi di terracotta del diametro di 12 cm in ciascuno dei quali è stata trapiantata una giovane piantina di pomodoro (cv. Rutgers). I vasi sono stati quindi disposti su bancali in serra a 25±2 °C secondo uno schema sperimentale a blocchi randomizzati con sei ripetizioni per trattamento (D'Addabbo *et al*., 1998). Come testimoni di riferimento sono stati impiegati un terreno non trattato ed uno trattato con fenamiphos alla dose di 30 g per metro quadro. Alla fine della prova, tre mesi più tardi, è stata determinata l'azione tossica su *M. incognita* valutando il grado di infestazione del nematode sulle radici secondo una scala empirica di valutazione da 0 a 5, dove : 0 = assenza di galle, 1 = da una a due galle, 2 = da tre a dieci galle, 3 = da undici a trenta galle, 4 = da trentuno a cento galle e 5 = oltre cento galle per apparato radicale (Taylor e Sasser, 1978). Le uova e le larve di ciascun apparato radicale sono state estratte col metodo dell'ipoclorito di sodio (1%) (Hussey e Barker, 1973) mentre l'estrazione dal terreno è avvenuta secondo il metodo di Coolen (1979). L'indice di riproduzione del nematode è stato calcolato come rapporto tra la popolazione finale e quella iniziale ($r = Pf/Pi$).

Nella prova su vite, la sansa fresca di olive, alle dosi di 20, 30 e 50 g/kg di terreno, è stata miscelata ad un terreno sabbioso sterile. Le miscele così ottenute sono state versate in vasi di plastica della capacità di 1,2 l, tenuti per tutta la durata della prova su bancali in serra alla temperatura di 25±2 °C, secondo uno schema sperimentale a blocchi randomizzati con 10 replicazioni per trattamento. Due settimane dopo nei suddetti vasi sono state trapiantate piantine di vite (*Vitis vinifera* D.C., cv Diamante) e dopo una settimana è stata inoculata una popolazione italiana di *Xiphinema index* Thorne *et* Allen nella misura di 100 giovani femmine non gravide per vaso. Come testimone è stato considerato un terreno non ammendato ed inoculato. Le popolazioni di *X. index* sono state monitorate ad intervalli di sei mesi e precisamente dopo sei, dodici e diciotto mesi dalle inoculazioni (D'Addabbo *et al*., 1999).

Risultati e discussione

I dati sperimentali riportati sull'impiego di diversi residui olivicoli, mostrano che è possibile ridurre il consumo di agrofarmaci ad azione nematocida con risultati apprezzabili per quanto riguarda il contenimento del nematode galligeno *M. incognita* che arreca gravi danni alle produzioni di pomodoro (tab.1).

Il grado di infestazione del nematode sulle radici di pomodoro risulta, in tutti i trattamenti, significativamente inferiore a quello osservato nel controllo non trattato. Tutti i diversi sottoprodotti non sono significativamente diversi tra loro e l'utilizzo della sansa fresca d'oliva consente risultati paragonabili a quelli ottenibili col nematocida di sintesi fenamiphos, riconosciuto molto efficace alla dose di 300 Kg/ha. Per i diversi parametri nematologici considerati l'utilizzazione delle foglie trinciate, ed in particolare della sansa fresca, consente significative riduzioni rispetto al controllo non trattato.

Risultati interessanti ed analoghi sono stati ottenuti nella lotta contro *Xiphinema index*, vettore naturale del virus dell'arricciamento infettivo della vite (tab.2).

I dati riportati dimostrano che anche dosi contenute di sansa di oliva riducono le popolazioni di *X. index*

Tab. 1 - Effetto dei sottoprodotti dell'olivo sui parametri riproduttivi di *M. incognita* su pomodoro (cv Rutgers) (D'Addabbo *et al.*, 1998).
Tab. 1 - Effect of olive mill wastes on reproductive parameters of M. incognita *on tomato (cv Rutgers) (D'Addabbo* et al.*, 1998).*

Trattamento	Grado di infestazione (0 - 5)	% di riduzione*	Uova e larve/g radici	% di riduzione	Tasso di riproduzione (*Pf*/*Pi*)	% di riduzione
Controllo non trattato	4,5** a***	---	95.700 a	---	60,8 a	---
Fenamiphos	2,2 c	51,1	25.400 c	73,5	14,8 c	75,7
Foglie di olivo	2,7 b	40,0	54.700 b	42,8	27, 2 b	55,3
Sansa d'oliva fresca	2,3 bc	48,9	41.500 b	56,6	15,2 c	75,0
Sansa d'oliva esausta	3,8 ab	15,6	89.900 a	61,	52,8 a	13,2
Acque di vegetazione	3,2 b	28,9	91.500 a	4,4	54,0 a	11,2

* % di riduzione rispetto al controllo non trattato;
** ciascun valore è la media di 6 replicazioni;
*** i dati seguiti in ciascuna colonna dalle stesse lettere non sono significativamente diversi tra loro in accordo al test di Duncan (P=0,05).

Tab. 2 - Azione tossica di sansa di olive nei confronti di Xiphinema index su vite (D'Addabbo *et al.*, 1999).
Tab. 2 - Toxic action of olive pomace against Xiphinema index on vine (D'Addabbo et al.*, 1999).*

Trattamento	Dose di applicazione (g/kg terreno)	Popolazione di *X. index* (femmine e larve/ml di terreno)		
		6 mesi dopo l'inoculazione	12 mesi dopo l'inoculazione	18 mesi dopo l'inoculazione
Sansa di oliva	20	10,6* (-45%)**	2,4 (-94%)	13,9 (-71%)
Sansa di oliva	30	3,8 (-80%)	1,1 (-97%)	11,2 (-77%)
Sansa di oliva	50	0,6 (-97%)	0,4 (-99%)	2,6 (-95%)
Testimone non trattato	---	19,4	41,5	47,9

* ogni valore è la media di 10 ripetizioni;
** in parentesi è indicata la riduzione percentuale in confronto al testimone non trattato.

e questo risulta interessante in quanto le foglie di olivo e la sansa di oliva, fresca o esausta, devono essere somministrate in quantità non elevata, in quanto i prodotti degradativi che si formano nel terreno potrebbero indurre fitotossicità (D'Addabbo *et al*., 1998). I componenti fitotossici quali acidi grassi, acidi organici e polifenoli (Estaùn *et al*., 1985) possono però essere rimossi con l'aggiunta al terreno di urea o di altro preparato contenente azoto organico, perché un basso rapporto carbonio/azoto stimola la degradazione microbiologica dei composti fitotossici (Rodriguez-Kabana *et al.*, 1995).

E' stato mostrato come l'interramento di foglie di olivo in percentuale inferiore all'1%, non risulta causare fenomeni di fitotossicità ma solo un'azione soppressiva su *M. incognita* (Vouyoukalou, 1994). Si deve tener presente che tali quantità sarebbero presenti nello strato di terreno arabile se si eseguissero trinciatura ed interramento dei residui della potatura dell'olivo. In questo modo semplice ed economico si otterrebbero riduzioni di popolazioni di *M. incognita* eventualmente presenti negli oliveti. Il vantaggio sarebbe notevole visto che questo nematode galligeno può causare gravi danni sia direttamente, con perdita di produzione a causa dell'azione parassitaria, sia indirettamente, per la accresciuta suscettibilità delle piante all'azione di altri parassiti o patogeni (Lamberti *et al*., 2002).

Conclusioni

I sottoprodotti olivicoli impiegati nel modo qui descritto porterebbero numerosi vantaggi. Non solo permetterebbero di coniugare un soddisfacente livello di efficacia, un ridotto impatto ambientale ed una maggiore sicurezza per gli operatori e per il consumatore, ma consentirebbero anche di eliminare tutte le problematiche di smaltimento di questi sottoprodotti in regioni, come la Puglia, in cui sono presenti svariati milioni di piante di olivo.

Questa strategia, che costituisce un'importante novità in un mondo alla costante ricerca di soluzioni tecniche affidabili ed a ridotto impatto ambientale che portino concreti vantaggi minimizzando i rischi, non trova attualmente una giusta valorizzazione.

Sebbene occorra tener presente che l'impiego di questi mezzi "naturali" incorporati nel terreno, possa dare origine alla formazione di differenti prodotti tossici per gli organismi ivi presenti a causa di processi ossidativi e idrolitici che possono aver luogo e che dipendono da vari fattori (popolazioni microbiche, temperatura, ossidi, ecc.); va però sottolineato il notevole risparmio nell'uso, non solo economico ma anche ambientale-salutistico, di prodotti chimici di sintesi sostituiti dai sopra citati sottoprodotti che possono integrare, se non in alcuni casi sostituire gli agrofarmaci di sintesi.

E' quindi auspicabile che si continui con la sperimentazione su questa strada, senza tuttavia pensare ad una completa rinunzia ai prodotti di sintesi che nelle condizioni attuali risultano ancora insostituibili.

Riassunto

In questo lavoro si riportano i risultati sperimentali di prove di lotta, sia in ambiente controllato sia in pieno campo, che dimostrano l'azione soppressiva esercitata da sottoprodotti olivicoli nei confronti di popolazioni di nematodi fitoparassiti particolarmente dannosi a colture di interesse agrario (*Meloidogyne incognita* e *Xiphinema index*). Residui colturali e della spremitura delle olive (foglie, acqua di vegetazione, sansa vergine ed esausta) sono stati somministrati al terreno per il controllo del nematode galligeno *M. incognita* su pomodoro. Inoltre, in ambiente controllato su vite è stata impiegata sansa da sola a dosi diverse, per il controllo di *Xiphinema index* nematode vettore di virus. In entrambe le prove, i sottoprodotti olivicoli hanno mostrato una significativa azione soppressiva nei confronti delle due popolazioni di nematodi fitoparassiti considerati. L'interramento di questi materiali nel terreno, pertanto, potrebbe rappresentare una possibile soluzione alternativa sia ai nematotocidi di sintesi sia al loro smaltimento nelle aree di coltivazione dell'olivo dove grandi quantità di questi materiali sono prodotte ogni anno in un breve periodo di tempo.

Parole chiave: sansa, acqua di vegetazione, *Meloidogyne incognita*, *Xiphinema index*, azione soppressiva.

Bibliografia

COOLEN W.A., 1979. *Methods for the extraction of Meloidogyne spp. and other nematodes from roots and soil.* In: F. Lamberti and C.E. Taylor Eds., Root-knot nematodes (*Meloidogyne* species), Systematics, Biology and Control, Academic Press, London (U.K.): 317- 329.

D'ADDABBO T., FONTANAZZA G., LAMBERTI F., SASANELLI N., PATUMI M., 1997. *The suppressive effect of soil amendments with olive residues on Meloidogyne incognita.* Nematologia Mediterranea, 25: 195-198.

D'ADDABBO T., SASANELLI N., PATUMI M., FONTANAZZA G., LAMBERTI F., 1998. *Effetto dell'interramento di sottoprodotti della coltivazione dell'olivo sul nematode galligeno Meloidogyne incognita.* Olivo e Olio, 4: 56- 60.

D'ADDABBO T., SASANELLI N., COIRO M.I., 1999. *Suppression of Xiphinema index by olive and grape pomace.* Nematologia Mediterranea, 27: 257-260.

ESTAÙN V., CALVET C., GRASES J.M., PAGÈS M.,1985. *Chemical determination of fatty acids, organic acids and phenols, during olive composting process.* Acta Horticolturae, 172: 263-270.

HUSSEY R.S., BARKER K.R., 1973. *A comparison of methods of collecting inocula of Meloidogyne spp. including a new technique.* Plant Disease Report, 57: 1025-1028.

LAMBERTI F., BASILE M., CARELLA A., 1988. *Impiego del Fenamiphos nella lotta contro i nematodi galligeni su pomodoro.* Atti Giornate Fitopatologiche, Lecce 16-20 maggio 1988, 2: 235-240.

LAMBERTI F., SASANELLI N., D'ADDABBO T., CICCARESE F., AMBRICO A., D. SCHIAVONE, 2002. *Relationship between Plant Parasitic Nematodes and Verticillium dahliae in Olive*. Acta Horticulturae (ISHS) 586:749-752

PAGLIAI M., 1996. *Effetti della somministrazione di acque reflue di frantoi oleari sulle caratteristiche fisiche del suolo*. Atti Convegno Internazionale, Trattamento e riciclaggio in agricoltura dei sottoprodotti dell'industria olearia. Lecce, Italia, 8-9 marzo.

RODRÌGUEZ-KABANA R., EATAÙN V. PINOCHET J., MARFÀ O., 1995. *Mixtures of olive pomace with different nitrose sources for the control of Meloidogyne spp. on tomato.* Journal of Nematology, 27 (4S): 575-584.

RUSSO G., BASILE T., 2011. *Considerazioni sulle caratteristiche chimiche, fisiche ed ambientali di alcuni agrofarmaci impiegati in olivicoltura*. Acta Italus Hortus, 1: 398-402.

SASANELLI N., D'ADDABBO T., CONVERTINI G., FERRI D., 2002. *Soil Phytoparasitic Nematodes Suppression and Changes of Chemical Properties Determined by Waste Residues from Olive Oil Extraction*. Proceedings of 12th ISCO Conference, May 26-31, 2002, Beijing China. Vol. III: 588-592.

TAYLOR A. L., SASSER J.N., 1978. Biology, *Identification and Control of Root-knot Nematodes (Meloidogyne spp.).* North Carolina State University Graphics, Raleigh, NC (Usa): 111.

VOUYOUKALOU E., 1994. *Use of green leaves from olive trees as soil amendment for the control of Meloidogyne*. Bull. OEPP/EPPO, 24: 485-488.

Acta Italus Hortus 10: 210-213

Caratterizzazione preliminare dell'entomofauna degli oliveti in Puglia

Simeone V.[1], El Hachem N.[1], Tucci M.[1], Lamaj F.[1], Iannotta N.[2*] e Scalercio S.[2]
[1] *Istituto Agronomico Mediterraneo di Bari (CIHEAM/IAMB), Valenzano (BA)*
[2] *Centro di Ricerca per l'Olivicoltura e l'Industria Olearia (CRA-OLI), Rende (CS)*

First data on the insects of olive groves in Apulia

Abstract. During last decades olive groves were intensively managed, and insecticides were more and more utilised. As consequence, coenotic balance was disrupted leading to a widespread environmental disturbance. To date, there is a lack of knowledge on insects living in olive groves. The main goal of this study is the characterisation of entomocoenosis in a so important agroecosystem. Study areas was located in Bari, Brindisi Taranto and Lecce. Field monitoring was carried out from january to may 2009. insects were collected by pitfall traps (3 per site) and malaise traps (1 per site). Pit fall traps collected 6.438 individuals. More abundant taxa were Diptera (esclusi Syrphidae) (55,84%), Hymenoptera (excl. Ichneumonoidea, Vespidae and Formicidae) (14,53%), Staphylinidae (13,01%), Collembola (5,37%), and Coleoptera (excl. Coccinellidae, Carabidae, Tenebrionidae and Staphylinidae) (4,73%). The highest number of individuals was collected in Taranto (59,25%). Malaise traps collected 115.950 individuals, from the 34.375 individuals in Brindisi to 24.568 individuals in Lecce. Lepidoptera (only some superfamilies), Diptera Syrphidae, Neuroptera and Coleoptera Curculionidae were determinated at species level. In the olive grove located in Bari we collected a specie new for the apulian fauna, *Microlarinus lareynii* (Jacquelin du Val) (Curculionidae), an important species because of its control on the weed *Tribulus terrestris*. Another species new for the apulian fauna was *Dichochrysa prasina* (Burmeister,1839) (Chrysopidae), collected in Bari and Lecce. It is important in the biological control because antagonists of aphids and other pests. Although this study was only preliminary, it is clear the important role that insects can play for biological control strategies and environmental evaluation such as impact of pesticides on non target biota..

Key words: biodiversity, sustainability, insects, bioindicators, biological control.

Introduzione

L'agroecosistema oliveto ha subito negli ultimi decenni una notevole intensificazione della coltura e un incremento dell'uso di prodotti chimici utilizzati per la difesa e per la produzione, con conseguente destabilizzazione degli equilibri biologici e di un diffuso degrado ambientale. Con 50 milioni di piante coltivate su 360 mila ettari, 255 mila aziende, di cui 150 mila specializzate, l'olivicoltura pugliese rappresenta il 24% della superficie agricola utilizzata dell'intera regione, fornisce il 44% della produzione italiana di olio di oliva e il 12% della produzione mondiale di olio d'oliva (ISTAT, 2007). Attualmente però mancano studi relativi ai dati sulla biocenosi ed in particolare sulle comunità degli insetti che vivono nell'oliveto. Il presente studio rappresenta una prima indagine sulla entomofauna presente in quattro oliveti della Puglia, ed ha lo scopo di dare delle indicazioni sulla composizione delle comunità di insetti che possono essere utilizzate come bioindicatori, come già evidenziato da molte ricerche.

Materiali e metodi

La prova è stata svolta nel 2009 in areali caratterizzati da una grande variabilità delle caratteristiche del suolo, delle condizioni climatiche, del sistema di allevamento e dell'età delle piante. In ogni campo è stato installato un datalogger per monitorare temperatura e umidità relativa. Il primo oliveto di circa 70 anni di età, irriguo, è situato in agro di Valenzano (BA) a 66 m s.l.m. Le precipitazioni nel periodo gennaio-luglio sono state di 425 mm. Il terreno è moderatamente alcalino, con presenza di carbonati. Da sei anni è condotto col metodo di produzione biologico. Per il controllo delle malattie si utilizzano prodotti autorizzati dalla normativa vigente, in particolare si usa il rame nelle sue diverse forme, nonchè l'olio minerale. Si effettua l'inerbimento e per la concimazione si utilizza il compost. Il secondo oliveto è situato in agro di Castellaneta (TA) a 78 m s.l.m., età di circa 30 anni, irriguo. Per la concimazione si utilizza

* nino.iannotta@entecra.it

sia compost che letame e si attua la "non lavorazione" del terreno. Non si effettuano trattamenti contro i più comuni parassiti. Il terzo oliveto è situato in agro di Carovigno (BR) a 49 m s.l.m., di età secolare, in asciutto. Vengono effettuati tre-quattro lavorazioni l'anno. Non si effettuano trattamenti contro i più comuni parassiti. L'ultimo oliveto è situato in agro di Cutrofiano, (LE) a 108 m s.l.m., di circa 20 anni di età ed è coltivato in asciutto. Per la concimazione viene utilizzato sia il compost che il letame e si effettua la "non lavorazione" del terreno.

Gli insetti sono stati campionati tramite due tipologie di trappole:

- Pitfall traps innescate con una miscela di aceto commerciale allo 0,5%, che ha funzione di attrazione, e di acido ascorbico, che agisce da conservante e sono utili per il campionamento degli insetti camminatori (Luff, 1975). Sono state posizionate tre trappole per ogni campo, coperte da un coperchio in plastica al fine di evitare danni da elevate precipitazioni e ridurre l'evaporazione della miscela (Klein, 1989);
- Malaise traps che permettono la cattura di insetti volatori. Le trappole sono state svuotate a partire dal 5 gennaio fino al 16 maggio, con cadenza di venti giorni.

Risultati e discussioni

Con le pitfall traps sono stati identificati un numero totale di 6.438 individui. I taxa più abbondanti in tutte le località sono risultati: *Diptera* (esclusi *Syrphidae*) (n = 3.595, 55,84%), seguito da *Hymenoptera* (esclusi *Ichneumonoidea* e *Formicidae*) (n = 936, 14,53%), *Coleoptera Staphylinidae* (n = 838, 13,01%), *Collembola* (n = 346, 5,37%) e altri Coleotteri (n = 305, 4,73%). Il numero più alto di individui sono stati raccolti nell'oliveto di Taranto (n = 3.815, 59,25%), seguito da quello di Bari (n = 1.275,19.80%), poi quello di Brindisi (n = 890, 13,82%) e di Lecce (n = 458, 7,13%).

In totale sono stati raccolti 1.275 individui nell'oliveto di Bari con le pitfall traps. I taxa più abbondanti sono stati: *Diptera* (esclusi *Syrphidae*) (34,82%), *Coleoptera Staphylinidae* (20,86%), *Collembola* (15,76%), *Coleoptera* (esclusi *Carabidae, Staphylinidae, Curculionidae, Coccinellidae* e *Chrysomelidae*) (9,65%), *Hymenoptera* (esclusi *Ichneumonoidea* e *Formicidae*) (7,45%), *Carabidae* (4,63%), *Formicidae* (4,16 %).

In totale sono stati raccolti 3.815 individui nell'oliveto di Taranto con le pitfall traps. I taxa più abbondanti sono: altri Ditteri (67,18%), altri Imenotteri (19,49%), *Staphylinidae* (5,63%), altri Coleotteri (2,78%), e Collemboli (2,62%). In totale sono stati raccolti 890 individui con le pitfall traps nell'oliveto di Brindisi. I taxa più abbondanti sono stati: altri Ditteri (54,94%), Stafilinidi (22,13%), altri Imenotteri (8,76%), altri Coleotteri (4,61%), Collemboli (2,36%), Formicidi (2,13%), e Lepidotteri (1,69%). In totale nell'oliveto di Lecce sono stati raccolti 458 individui con le pitfall nell'oliveto di Lecce. I taxa più abbondanti sono stati: Stafilinidi (34,93%), altri Ditteri (21,18%), Tenebrionidi (8,73%), altri Coleotteri (7,64%), Formicidi (6,77%), Collemboli (5,24%), altri Imenotteri (4.15%), Carabidi (3,28 %), Lepidotteri (2,18%), Blattoidi (1,31%), e Crisomelidi (1,09%).

L'analisi delle medie (ANOVA) ha rivelato che l'abbondanza di alcuni taxa è stata significativamente diversa tra gli oliveti presi in esame. Ad esempio, per quanto riguarda il gruppo sia degli altri ditteri, l'oliveto situato in agro di Taranto ha mostrato valori statisticamente più elevati rispetto agli altri areali (fig. 1), per gli altri coleotteri gli oliveti di Bari e Taranto hanno mostrato valori statisticamente più elevati rispetto a quelli di Brindisi e Lecce (fig. 2), mentre per i Collemboli è stato l'oliveto della provincia di Bari a mostrare valori statisticamente più elevati (fig. 3).

Dalle Malaise sono stati catturati un numero totale di 115.950 individui appartenenti ai diversi taxa. Brindisi ha presentato la massima abbondanza di insetti (N = 34.375), seguita da Taranto (N = 31.024), Bari (N = 25.983) e Lecce (N = 24.568).

A livello di specie, la classificazione è stata limitata ad alcuni taxa, in particolare lepidotteri (68 specie), curculionidi (20 specie), neurotteri (3 specie) e sirfidi (8 specie). L'indagine ha evidenziato nell'oliveto in provincia di Bari una nuova specie per la fauna

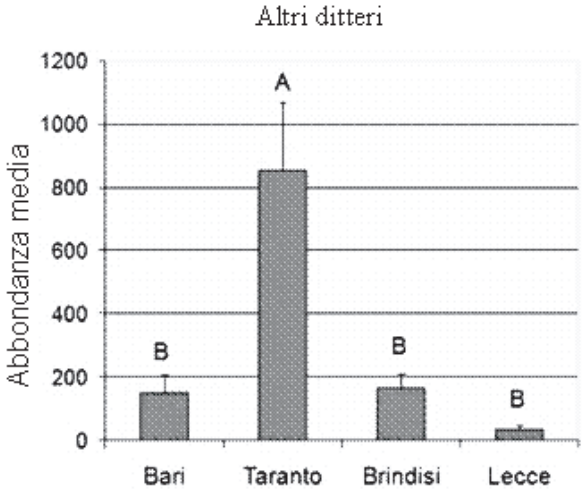

Fig. 1 - Abbondanza di Altri Ditteri negli oliveti campionati.
Fig. 1 - Abundance of Other Diptera in sampled olive groves.

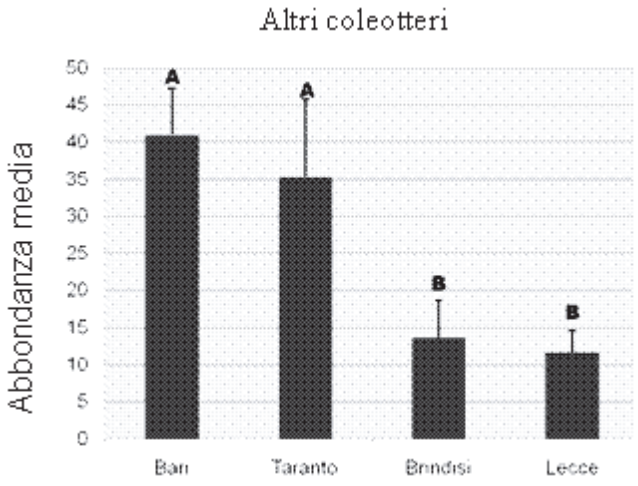

Fig. 2 - Abbondanza di Altri Coleoptera negli oliveti campionati.
Fig. 2 - Abundance of Other Coleoptera in sampled olive groves.

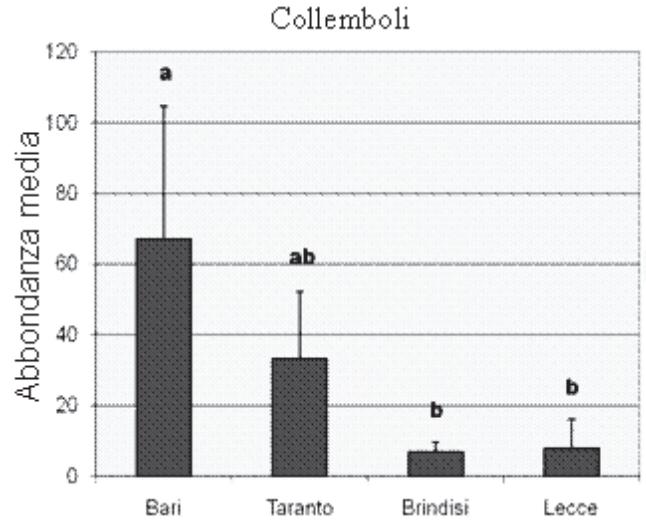

Fig. 3 - Abbondanza di Collembola negli oliveti campionati.
Fig. 3 - Abundance of Collembola in sampled olive groves.

pugliese, *Microlarinus lareynii* (Jacquelin du Val) (Coleoptera: Curculionidae) che è di rilevante importanza come agente di controllo biologico dell'infestante *Tribulus terrestris*. Tra i Neurotteri per la prima volta è stato rinvenuto un Chrysopidae, *Dichochrysa prasina* nelle province di Bari e Lecce, importante nel controllo biologico in quanto le larve sono predatori che si nutrono di afidi, tripidi, psille, acari e uova di lepidotteri.

Conclusioni

Il monitoraggio anche se effettuato in un breve periodo (gennaio-maggio) ha permesso di dare le prime indicazioni riguardante l'entomofauna negli oliveti di quattro areali pugliesi, mostrando anche differenze statisticamente significative tra gli oliveti indagati. Delle due tipologie di trappole utilizzate, le Malaise traps hanno permesso la cattura di due insetti non presenti in Puglia, il *Microlarinus lareynii* e il *Dichochrysa prasina* agenti di biocontrollo. Considerando il periodo di campionamento è auspicabile estenderlo per tutto l'intero anno per ottenere ulteriori indicazioni, ma soprattutto individuare altre tipologie di oliveti in altre aree. Nonostante lo studio sia solo preliminare vista l'enormità della ricchezza e della variabilità delle comunità di insetti, si evidenzia chiaramente che le entomocenosi possono fornire importanti strumenti valutativi in ambito agrario.

Riassunto

L'agroecosistema oliveto ha subito negli ultimi decenni una intensificazione della coltura e un uso massiccio di prodotti chimici, con conseguente destabilizzazione degli equilibri biologici e con un diffuso degrado ambientale. Attualmente però mancano ricerche sulle biocenosi ed in particolare sulle comunità degli insetti che vivono nell'oliveto. Con questo studio si vuol cominciare a caratterizzare l'entomofauna di un così importante ecosistema. Per avere una idea della struttura delle comunità a livello regionale lo studio ha interessato quattro aree ricorrenti in quattro differenti province (Bari, Brindisi, Taranto, Lecce). La prova è stata svolta in gennaio-maggio 2009. Gli insetti sono stati campionati tramite tre pitfall traps e una trappola malaise per sito, in modo da ottenere il maggior numero di dati possibile anche su componenti ecologicamente e etologicamente molto differenti. Con le pitfall traps sono stati raccolti 6.438 individui. I taxa più abbondanti in tutte le località di cattura sono stati i *Diptera* (esclusi *Syrphidae*) (55,84%), *Hymenoptera* (esclusi I*chneumonoidea, Vespidae* e *Formicidae*) (14,53%), *Staphylinidae* (13,01%), *Collembola* (5,37%), e *Coleoptera* (esclusi *Coccinellidae, Carabidae, Tenebrionidae* e *Staphylinidae*) (4,73%). Il numero più alto di individui sono stati raccolti nell'oliveto di Taranto (59,25%). Con le trappole malaise sono stati catturati 115.950 individui. Il totale raccolto è stato compreso fra i 34.375 di Brindisi e i 24.568 di Lecce. *Lepidoptera* (alcune superfamiglie), *Diptera Syrphidae, Neuroptera* e *Coleoptera Curculionidae* sono stati determinati a livello specifico. Nell'oliveto in provincia di Bari è stata raccolta una specie nuova per la fauna della Puglia, *Microlarinus lareynii* (Jacquelin du Val) (Curculionidae) che è di rilevante importanza come agente di controllo biologico dell'infestante *Tribulus terrestris*. Anche *Dichochrysa prasina* (Burmeister,1839) (Chrysopidae) è una nuova specie per la fauna regionale. Rinvenuta nelle provin-

ce di Bari e Lecce, è importante nel controllo biologico in quanto le larve sono predatori di afidi, tripidi, psille, acari e uova di lepidotteri. Nonostante lo studio sia solo preliminare vista l'enormità della ricchezza e della variabilità delle comunità di insetti, si evidenzia chiaramente che le entomocenosi possono fornire importanti strumenti valutativi in ambito agrario.

Parole chiave: biodiversità, sostenibilità, insetti, bioindicatori, controllo biologico.

Bibliografia

ISTAT, 2007. *Dati su agricoltura e zootecnia*, coltivazioni 2007.

LUFF M.L., 1975. *Some features influencing the efficiency of pitfall traps.* Oecologia, 19 (4): 345-357.

MALAISE R., 1937. *A new insect-trap*. Entomologisk Tidskrift, 58: 148-60.

KLEIN B.C. 1989. *Effect of forest fragmentation on dung and carrion beetle communities in central Amazonia*. Ecology, 70(6): 1715-1725.

WARD D.F., NEW T.R., YEN A.L., 2001. *Effects of pitfall trap spacing on the abundance, richness and composition of invertebrate catches.* J. Insect Conservation, 5: 47-53.

Efficacia di Imidacloprid contro le infestazioni di *Bactrocera oleae* (Rossi, 1790) in Calabria

Iannotta N.*, Belfiore T., Noce M.E., Scalercio S. e Zaffina F.
CRA-OLI, Centro di Ricerca per l'Olivicoltura e l'Industria Olearia, Rende (CS)

Efficacy of Imidacloprid for controlling *Bactrocera oleae* (Rossi, 1790) infestations in Calabria

Abstract. The olive crop protection plays an important role especially in those areas characterized by climatic conditions highly favourable to the development of parasites, as Southern regions of Italy. Consequently, an efficient protection is needed for controlling the key pest of olive crop *Bactrocera oleae* (Rossi, 1790). The aim of this study was to test the efficacy of commercial formulation Confidor® O-TEQ, containing imidacloprid, that recently obtained regulatory approval for olive for *B. oleae* control. Results are highly promising for *B. oleae* control in conventional and integrated olive farming management, mainly performing curative intervention (larvicidal effect).

Key words: imidacloprid, olive tree, *Bactrocera oleae*, infestation, Calabria.

Introduzione

L'olivicoltura in Italia riveste un ruolo fondamentale sia dal punto di vista economico che in virtù del profondo legame con il territorio e di forte "identità" paesaggistica e culturale. Pertanto, appare opportuna la tutela degli areali olivicoli mediante l'attuazione di una razionale difesa fitosanitaria, soprattutto nelle regioni meridionali d'Italia dove le condizioni bioclimatiche favorevoli allo sviluppo dei parassiti, determinano una maggiore incidenza di danno a causa di un decremento quali-quantitivo delle produzioni olivicole (Noce *et al*., 2009). Di conseguenza, una razionale difesa fitosanitaria s'impone nella lotta al principale parassita dell'olivo, *Bactrocera oleae* (Rossi, 1790), negli ambienti dove esso provoca gravi danni. Le recenti revisioni normative sulle molecole utilizzabili in agricoltura, inoltre, hanno imposto la ricerca di nuovi formulati efficaci nel controllo dei principali parassiti, in particolare contro la mosca delle olive. In prosecuzione di indagini precedenti, l'obiettivo di questa ricerca è stato quello di valutare l'efficacia del formulato commerciale Confidor® O-TEQ (Bayer CropScience), a base di imidacloprid, recentemente registrato su olivo, per il contenimento di tale fitofago.

Materiale e metodi

Le prove sono state condotte nel periodo compreso tra agosto e novembre nel biennio di indagine 2009-2010 nell'areale di Mirto-Crosia (CS), situato sulla costa ionica cosentina, caratterizzato da elevati livelli di infestazione utilizzando un disegno sperimentale a blocchi randomizzati (fig. 1). In ogni anno di indagine è stato effettuato un unico trattamento in data 14 e 15 settembre, rispettivamente. I rilievi sono stati condotti ogni dieci giorni e le drupe sono state analizzate in

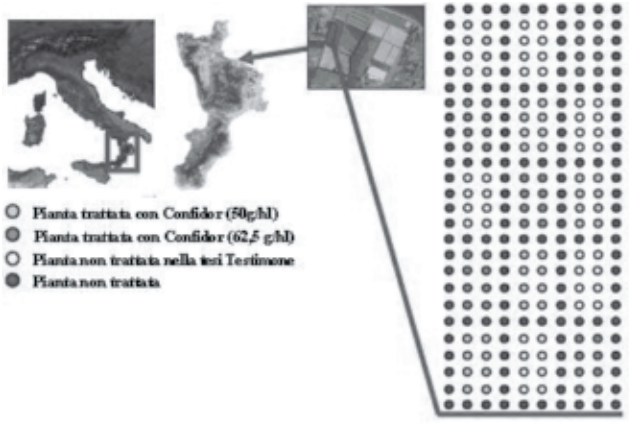

Fig. 1 - Area di studio e disegno sperimentale. [Tesi 1, Confidor® O-TEQ (50g/hl); Tesi 2, Confidor® O-TEQ (62.5g/hl) e Tesi 3, testimone]. N° tesi: 3; N° repliche: 15 (5/tesi); N° piante/replica: 8; N° olive/replica: 20; N° olive/tesi: 100; N° complessivo piante soggette ad analisi: 120.
Fig. 1 - Study area and experimental design. [Thesis 1, Confidor® O-TEQ (50g/hl); Thesis 2, Confidor® O-TEQ (62.5g/hl) and Thesis 3, control]. N° theses: 3; N° replications: 15 (5/thesis); N° trees/replication: 8; N° olives/replication: 20; N° olives/thesis: 100; N° trees analyzed: 120.

* nino.iannotta@entecra.it

laboratorio per valutare l'andamento dei livelli di infestazione, espressi sia in termini di infestazione attiva che totale. I dati sono stati sottoposti ad analisi della varianza seguita dal test post-hoc LSD.

Risultati e discussione

I risultati ottenuti nell'anno 2009, hanno evidenziato un forte effetto larvicida principalmente evidente nei rilievi del 7 ott ($F_{2,12}$ = 4,3000; p = 0,0391) e 22 ott ($F_{2,12}$ = 7,1905; p = 0,0089). Una presenza minore di fori di sfarfallamento si nota nella Tesi 2 in corrispondenza del rilievo effettuato in data 10 nov ($F_{2,12}$ = 3,8929; p = 0,0498) che si riflette in una riduzione della percentuale di infestazione totale ($F_{2,12}$ = 4,0923; p = 0,0441). I risultati ottenuti nell'anno 2010, hanno evidenziato una significativa riduzione dei livelli di infestazione sia in termini di infestazione attiva che totale, principalmente evidente nella Tesi 2. E' stato, inoltre, riscontrato l'effetto larvicida del formulato commerciale particolarmente evidente nel rilievo del 20 ott ($F_{2,12}$ = 20,0000; p = 0,0001) ed una conseguente riduzione della presenza di pupe nei rilievi del 20 ott ($F_{2,12}$ = 4,2608; p = 0,0340) e 4 nov ($F_{2,12}$ = 32,6667; p = 0,00001). È stata, inoltre, riscontrata una significativa riduzione della presenza di fori di sfarfallamento nelle drupe trattate mentre la mortalità delle pupe è risultata significativamente più elevata nelle tesi trattate. Nelle tabelle 1 e 2 sono mostrate in dettaglio le percentuali relative ad ogni singolo stadio in corrispondenza di ogni rilievo negli anni 2009 e 2010, rispettivamente.

Tab. 1 - Dati dettagliati (Media ± DS) relativi ai singoli stadi determinanti le percentuali di infestazione registrate nelle diverse tesi in corrispondenza di ogni rilievo effettuato nell'anno di osservazione 2009. Lettere differenti indicano differenze statisticamente significative tra le tesi: analisisi della varianza ANOVA, post hoc test LSD, lettere minuscole: P≥ 0,05; lettere maiuscole: P≥ 0,01.

Tab. 1 - Detailed data (Mean ± SD) concerning each stage determining percentages of infestation recorded in different theses in every single date in the observation year 2009. Different letters indicate significant differences among theses: analysis of variance ANOVA, LSD post hoc test, small letters: P≥ 0.05; capital letters: P≥ 0.01.

Data	Punture sterili	Uova	Larve	Pupe	Larve morte	Pupe morte	Fori sfarf.	Inf. Attiva	Inf. Totale
C50									
21-Ago	11,00 ± 5,48	3,00 ± 4,47	4,00 ± 5,48	5,00 ± 3,54	0	0	1,00 ± 2,24	12,00 ± 7,58	24,00 ± 8,94
3-Set	11,00 ± 2,24	7,00 ± 2,74	1,00a ± 2,24	2,00 ± 2,74	0	0	0	10,00 ± 3,54	21,00 ± 4,18
15-Set	12,00 ± 5,70	11,00 ± 5,48	7,00 ± 5,70	6,00 ± 6,12	0	0	0	23,00 ± 5,70	35,00 ± 5,00
24-Set	18,00 ± 7,58	10,00 ± 3,54	2,00 ± 2,74	4,00 ± 4,18	0	0	0a	16,00 ± 2,24	34,00 ± 6,52
7-Ott	17,00 ± 6,71	15,00 ± 3,54	5,00a ± 3,54	10,00 ± 5,00	0	1,00 ± 2,24	4,00 ± 4,18	30,00 ± 6,12	52,00 ± 2,74
22-Ott	5,00 ± 3,54	6,00 ± 4,18	14,00A ± 5,48	15,00 ± 6,12	2,00 ± 2,74	1,00 ± 2,24	12,00 ± 6,71	35,00 ± 0	55,00 ± 6,12
29-Ott	2,00 ± 2,74	3,00 ± 2,74	15,00 ± 6,12	11,00a ± 5,48	1,00 ± 2,24	1,00 ± 2,24	17,00 ± 5,70	29,00 ± 7,42	50,00 ± 10,61
10-Nov	0	6,00 ± 4,18	10,00 ± 9,35	22,00 ± 6,71	1,00 ± 2,24	4,00 ± 5,48	16,00ab ± 4,18	38,00 ± 9,08	59,00ab ± 11,40
C62,5									
21-Ago	9,00 ± 2,24	2,00 ± 2,74	2,00 ± 2,74	1,00 ± 2,24	0	0	0	5,00 ± 3,54	14,00 ± 4,18
3-Set	7,00 ± 2,74	7,00 ± 4,47	2,00a ± 2,74	8,00 ± 5,70	0	0	1,00 ± 2,24	21,00 ± 7,42	29,00 ± 7,42
15-Set	12,00 ± 5,00	11,00 ± 7,91	7,00 ± 4,18	5,00 ± 5,00	0	0	1,00 ± 2,24	23,00 ± 11,94	35,00 ± 9,35
24-Set	18,00 ± 6,71	10,00 ± 2,74	2,00 ± 2,74	4,00 ± 3,54	0	0	1,00a ± 2,24	16,00 ± 3,54	34,00 ± 8,22
7-Ott	10,00 ± 7,07	14,00 ± 5,48	6,00a ± 2,24	11,00 ± 2,24	1,00 ± 2,24	0	11,00 ± 6,52	31,00 ± 7,42	53,00 ± 8,37
22-Ott	1,00 ± 2,24	5,00 ± 5,00	9,00A ± 6,52	18,00 ± 5,70	6,00 ± 5,48	0	12,00 ± 10,37	32,00 ± 10,37	51,00 ± 10,25
29-Ott	1,00 ± 2,24	4,00 ± 5,48	7,00 ± 5,70	14,00a ± 8,94	2,00 ± 4,47	1,00 ± 2,24	31,00 ± 8,22	25,00 ± 13,23	60,00 ± 5,00
10-Nov	0	7,00 ± 5,70	15,00 ± 6,12	15,00 ± 3,54	2,00 ± 4,47	2,00 ± 2,74	9,00a ± 4,18	37,00 ± 10,37	50,00b ± 3,54
Testimone									
21-Ago	11,00 ± 8,22	1,00 ± 2,24		5,00 ± 3,54	0	0	0	6,00 ± 5,48	17,00 ± 8,37
3-Set	9,00 ± 4,18	10,00 ± 6,12	6,00b ± 2,24	6,00 ± 4,18	0	0	1,00 ± 2,24	18,00 ± 7,58	28,00 ± 7,58
15-Set	10,00 ± 6,12	5,00 ± 5,00	9,00 ± 4,18	9,00 ± 5,48	0	0	3,00 ± 4,47	23,00 ± 10,37	36,00 ± 11,94
24-Set	8,00 ± 6,71	9,00 ± 2,24	4,00 ± 4,18	8,00 ± 4,47	0	2,00 ± 2,74	7,00b ± 5,70	21,00 ± 4,18	38,00 ± 10,37
7-Ott	9,00 ± 8,94	12,00 ± 8,37	12,00b ± 5,70	11,00 ± 4,18	0	1,00 ± 2,24	12,00 ± 5,70	35,00 ± 11,18	57,00 ± 13,96
22-Ott	1,00 ± 2,24	4,00 ± 5,48	23,00B ± 5,70	11,00 ± 7,42	1,00 ± 2,24	2,00 ± 2,74	20,00 ± 9,35	38,00 ± 10,37	62,00 ± 12,55
29-Ott	0	0	11,00 ± 5,48	26,00b ± 9,62	1,00 ± 2,24	3,00 ± 4,47	22,00 ± 13,52	37,00 ± 12,55	63,00 ± 6,71
10-Nov	0	4,00 ± 4,18	14,00 ± 5,48	20,00 ± 5,00	0	4,00 ± 4,18	21,00b ± 10,25	38,00 ± 9,75	63,00a ± 4,47

Tab. 2 – Dati dettagliati (Media ± DS) relativi ai singoli stadi determinanti le percentuali di infestazione registrate nelle diverse tesi in corrispondenza di ogni rilievo effettuato nell'anno di osservazione 2010. Lettere differenti indicano differenze statisticamente significative tra le tesi: analisisi della varianza ANOVA, post hoc test LSD, lettere minuscole: P≥ 0,05; lettere maiuscole: P≥ 0,01.

Tab. 2 – Detailed data (Mean ± SD) concerning each stage determining percentages of infestation recorded in different theses in every single date in the observation year 2010. Different letters indicate significant differences among theses: analysis of variance ANOVA, LSD post hoc test, small letters: P≥ 0.05; capital letters: P≥ 0.01.

Data	Punture sterili	Uova	Larve	Pupe	Larve morte	Pupe morte	Fori sfarf.	Inf. Attiva	Inf. Totale
					C50				
9-Ago	13,00±13,96	1,00 ± 2,24	13,00 ± 9,08	9,00 ± 12,45	6,00 ± 5,48	0	0	23,00 ±2 1,68	42,00 ± 25,64
19-Ago	41,00 ± 8,22	2,00 ± 4,47	3,00 ± 4,47	4,00 ± 4,18	6,00 ± 4,18	2,00 ± 2,74	1,00 ± 2,24	9,00 ± 2,24	59,00 ± 7,42
30-Ago	55,00 ± 5,00	2,00 ± 0	6,00 ± 6,52	4,00 ± 4,18	4,00 ± 8,94	2,00 ± 2,74	5,00 ± 5,00	10,00 ± 9,35	76,00 ± 16,36
10-Set	40,00 ± 16,58	3,00 ±2 ,24	8,00 ± 9,75	15,00 ± 7,07	11,00 ± 5,48	4,00 ± 6,52	12,00 ± 4,47	24,00 ± 8,94	91,00 ± 9,62
21-Set	30,00 ± 13,69	1,00 ± 2,24	9,00 ± 10,84	2,00a ± 2,74	10,00a ± 10,00	2,00 ± 2,74	17,00 ± 12,04	15,00ab ± 10,61	91,00 ± 10,25
1-Ott	61,00 ± 9,62	1,00 ± 2,24	0	5,00 ± 8,66	16,00 ± 8,22	1,00 ± 2,24	16,00 ± 15,57	5,00A ± 8,66	99,00A ± 2,24
20-Ott	52,00b ± 4,47	3,00 ± 0,9	0A	0a	13,00b ± 2,74	10,00A ± 6,12	15,00 ± 3,54	0A	90,00A ± 6,12
04-Nov	58,00C ± 4,47	2,00 ± 2,00	6,00 ± 4,18	0A	5,00AB ± 5,00	7,00 ± 7,58	7,00A ± 5,70	6,00A ± 4,18	83,00A ± 5,70
19-Nov	55,00B ± 17,68	1,00 ± 2,24	13,00B ± 9,08	2,00 ± 4,47	3,00 ± 4,47	1,00 ± 2,24	15,00A ± 10,00	17,00ab ± 11,51	91,00 ± 5,48
30-Nov	49,00 ± 17,82	0	13,00 ± 8,37	0	1,00 ±2,24	0	27,00 ± 17,89	18,00 ± 5,70	95,00 ± 8,94
					C62,5				
9-Ago	19,00 ± 10,84	1,00 ± 2,24	11,00 ± 14,32	5,00 ± 7,07	2,00 ± 2,74	0	1,00 ± 2,24	17,00 ± 19,87	39,00 ± 16,73
19-Ago	33,00 ± 13,96	1,00 ± 2,24	3,00 ± 2,74	10,00 ± 7,91	5,00 ± 5,00	0	6,00 ± 6,52	14,00 ± 9,62	58,00 ± 13,51
30-Ago	48,00 ± 16,05	2,00 ± 1,00	2,00 ± 2,74	9,00 ± 6,52	7,00 ± 7,58	3,00 ± 4,47	9,00 ± 13,42	11,00 ± 8,94	78,00 ± 15,25
10-Set	48,00 ± 16,05	4,00 ± 1,00	2,00 ± 2,74	9,00 ± 6,52	7,00 ± 7,58	3,00 ± 4,47	9,00 ± 13,42	11,00 ± 8,94	78,00 ± 15,25
21-Set	50,00 ± 13,23	1,00 ± 2,24	6,00 ± 8,22	5,00ab ± 6,52	27,00b ± 15,25	1,00 ± 2,24	12,00 ± 13,04	5,00a ± 3,54	90,00 ± 15,41
1-Ott	42,00 ± 21,39	0	2,00 ± 4,47	0	10,00 ± 7,91	4,00 ± 4,18	27,00 ± 20,80	2,00A ± 4,47	85,00B ± 9,35
20-Ott	34,00a ± 17,46	2,00 ± 4,47	0A	0a	4,00a ± 4,18	1,00B ± 2,24	16,00 ± 8,94	0A	55,00B± 20,31
04-Nov	39,00B ± 6,52	2,00 ± 2,00	5,00 ± 6,12	0A	20,00B ± 7,07	2,00 ± 4,47	10,00A ± 6,12	5,00A ± 6,12	76,00A ± 20,24
19-Nov	58,00B ± 9,08	1,00 ± 2,24	4,00A ± 4,18	3,00 ± 2,74	5,00 ± 6,12	3,00 ± 4,47	13,00A ± 8,37	7,00a ± 5,70	86,00 ± 8,94
30-Nov	57,00 ± 14,83	0	12,00 ± 9,75	0	1,00 ± 2,24		24,00 ± 5,48	15,00 ± 10,61	97,00 ± 7,58
					Testimone				
9-Ago	24,00 ± 9,62	1,00 ± 2,07	10,00 ± 11,73	1,00 ± 2,24	7,00 ± 5,70	0	2,00 ± 2,74	15,00 ± 18,37	48.00 ± 24.14
19-Ago	40,00 ± 10,61	1,00 ± 2,24	4,00 ± 2,24	9,00 ± 7,42	9,00 ± 6,52	0	1,00 ± 2,24	14,00 ± 6,52	64.00 ± 10.84
30-Ago	55,00 ± 7,91	2,00 ± 0	0	5,00 ± 6,12	4,00 ± 4,18	0	13,00 ± 13,04	5,00 ± 6,12	77.00 ± 9.75
10-Set	60,00 ± 15,81	4,00 ± 1,00	3,00 ± 4,47	7,00 ± 10,37	11,00 ± 11,40	0	9,00 ± 6,52	14,00 ± 7,42	94.00 ± 4.18
21-Set	55,00 ± 22,36	1,00 ± 2,24	1,00 ± 2,24	11,00b ± 3,54	6,00b ± 10,84	1,00 ± 2,24	24,00 ± 17,10	21,00b ± 8,94	95.00 ± 11.18
1-Ott	46,77 ± 12,38	1,00 ± 2,24	4,08 ± 6,68	12,62 ± 12,11	6,00 ± 5,48	2,00 ± 2,74	20,54 ± 13,46	23,69B ± 11,43	99.00A ± 2.24
20-Ott	31,00a ± 6,52	3,00 ± 0,60	20,00B ± 10,00	7,00b ± 7,58	7,00ab ± 6,71	2,00B ± 2,74	23,00 ± 10,95	27,00B ± 16,81	90.00A ± 7.91
04-Nov	29,00A ± 5,48	2,00 ± 2,00	19,00 ± 13,87	7,00B ± 2,74	3,00A ± 4,47	1,00 ± 1,24	37,00B ± 19,87	28,00B ± 16,43	98.00B ± 4.47
19-Nov	23,00A ± 12,55	2,00 ± 0	20,00B ± 3,54	2,00 ± 0	1,00 ± 2,24	2,00 ± 4,47	44,00B ± 10,84	23,00b ± 7,58	93.00 ± 7.58
30-Nov	34,00 ± 18,84	1,00 ± 0,50	16,00 ± 11,40	0	3,00 ± 4,47	0	44,00 ± 10,84	17,00 ± 12,04	98.00 ± 6.12

Conclusioni

Il formulato commerciale Confidor® O-TEQ, soprattutto nell'anno di indagine 2010, ha mostrato una significativa efficacia nei confronti del testimone in accordo con Lentini *et al.* (2009) e Palmeri *et al.* (2009). I risultati ottenuti appaiono di promettente prospettiva per il controllo di *B. oleae* in olivicoltura convenzionale ed integrata, soprattutto per interventi di tipo curativo (effetto larvicida).

Riassunto

La difesa fitosanitaria dell'olivo dai principali parassiti assume un ruolo di fondamentale importanza soprattutto negli areali caratterizzati da condizioni bioclimatiche favorevoli al loro sviluppo, come le regioni meridionali d'Italia. Pertanto, una razionale difesa fitosanitaria s'impone nell'ottica economica della lotta al principale parassita dell'olivo, *Bactrocera oleae* (Rossi, 1790). Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare l'efficacia del formulato commerciale Confidor® O-TEQ, a base di imidacloprid, recentemente registrato su olivo, per il contenimento di *B. oleae*. I risultati ottenuti appaiono di promettente prospettiva per il controllo di *B. oleae* in olivicoltura convenzionale ed integrata, soprattutto per interventi di tipo curativo (effetto larvicida).

Parole chiave: imidacloprid, olivo, *Bactrocera oleae*, infestazione, Calabria.

Bibliografia

Lentini A., Deliberi S., Delrio G., 2009. *Imidacloprid valida alternativa contro la mosca delle olive*. Inf. Agr., 2, 60-62.

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.* J. Environ. Sci. Heal. B, 44(5), 442-448.

Palmeri V., Campolo O., Algeri G.M., Grande S.B., 2009. *Valutazione dell'efficacia di alcuni formulati commerciali nei confronti di* Bactrocera oleae *in Calabria*. Atti XXII Congr. Naz. Entomologia. Ancona 15-18 giugno: 191.

Uso di un prodotto naturale per il contenimento di *Fusicladium oleagineum* (Cast.) Ritschel & Braun

Rongai D.[1*] e Basti C.[2]
[1] CRA - PAV, Centro di Ricerca per la patologia vegetale, Roma
[2] CRA - OLI Centro di Ricerca per l'olivicoltura, Pescara

Use of a natural product for the control of *Fusicladium oleagineum* (Cast.) Ritschel & Braun

Abstract. This study examines the effects of a Formulation (consisting in a dispersion of Brassicaceae meal in vegetable oil) on *Fusicladium oleagineum*. In the laboratory test the Formulation was tested in comparison to vegetable oil used alone and a chemical fungicide (Dodine). Formulation and Dodine showed a significantly lower conidium germination level (20 and 23% respectively), if compared with the untreated control (56%) and vegetable oil (47%). The results of field trials confirm the efficacy of the Formulation and Dodine with respect to the untreated control. Two applications of natural formulation in spring plus three additional sprays in autumn are able to contain the OLS incidence below the harmfulness threshold especially if applied on cultivar showing a medium-low degree of susceptibility to the disease.

Key words: *Fusicladium oleagineum*, *Brassica carinata*, environmentally-friendly products, glucosinolates, vegetable oil.

Introduzione

L'occhio di pavone (*Fusicladium oleagineum*) è considerato una delle più dannose malattie dell'olivo. In Italia il fungo ha una diffusione endemica ma le anomali condizioni climatiche degli ultimi anni, caratterizzate da inverni umidi e temperati, hanno causato una ampia diffusione in alcune regioni olivicole. Gli ulivi infettati mostrano abscissione fogliare con diradamento della chioma e conseguente indebolimento dell'intera pianta.

Un uso spregiudicato dei prodotti chimici per la difesa delle colture agrarie ha provocato negli ultimi decenni effetti collaterali negativi per l'ambiente e la salute umana. Ciò ha portato nel tempo alla ricerca di nuovi criteri per affrontare la difesa delle piante dalle malattie con crescente interesse verso prodotti *eco-friendly*. Numerosi sono gli autori che descrivono l'efficacia di composti naturali ed estratti vegetali per il contenimento delle malattie delle piante. Horst *et al*. (1992) sostengono che l'oidio presente sulle rose (*Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*) è significativamente ridotto se trattato con una soluzione acquosa di bicarbonato di sodio e olio vegetale al'1%. Estratti di pepe/senape, cassia e garofano, sono in grado di ridurre la popolazione di *Fusarium oxysporum* del 99,96 e 97% rispettivamente (Bowers *et al*., 2000). Wang *et al*. (2004) mostrano come gli estratti di foglie di *Inula viscosa* siano in grado di inibire lo sviluppo di svariati funghi quali la *Plasmopara viticola*, *Pseudoperonospora cubensis*, *Phytophtora infestans*, *Blumeria graminis* e *Puccinia helianhi*. Tegegne *et al*. (2007) riferiscono della attività antifungina mostrata dall'estratto di *Agapanthus africanus* in laboratorio, in serra e in pieno campo. Dagostin *et al*. (2010) evidenziano l'abilità della *Salvia officinalis* nel contenimento della *Plasmopora viticola* in serra e nelle condizioni di pieno campo. Ancora, l'estratto di *Salvia officinalis*, assieme a *Xanthium strumarium*, *Lauris nobilis* e *Styrax officinalis* mostrano in vitro una intensa attività antifungina nei confronti di *Phytophtora infestans* (Yanar *et al*., 2011).

Un formulato naturale (Rongai *et al*., 2006), costituito da una miscela di farina disoleata di *Brassica carinata* (ISCI7) e olio vegetale, preparata come emulsione acquosa, ha già mostrato una buona efficacia verso alcuni funghi patogeni quali l'oidio della barbabietola da zucchero e del melone (Rongai *et al.*, 2009). Scopo del presente lavoro è verificare, in laboratorio ed in pieno campo, l'efficacia del suddetto formulato nei confronti dell'occhio di pavone dell'olivo *Fusicladium oleagineum* (Cast.) Ritschel & Braun.

[*] domenico.rongai@entecra.it

Materiali e metodi

Le prove sono state effettuate nel biennio 2009-2010 su un oliveto di 20 anni della cv Gentile di Chieti (fig. 1) sito nella zona collinare della provincia di Pescara.

Prodotti utilizzati

Sono stati impiegati: "formulato" (DUOLIF-Cerealtoscana spa) alla dose di 2 kg/hl, olio vegetale (estratto da semi di *Brassica carinata*) 2 kg/hl e Dodina (Venturex 35L, Agriphar s.a., Italia) alla dose indicata in etichetta.

Prove di laboratorio

Per ciascuna delle quattro tesi ("formulato", Dodina, olio vegetale e testimone), una sospensione di conidi a concentrazione nota è stata spruzzata sulla pagina superiore di 12 foglie di olivo (3 per 4 repliche) poste in capsule Petri (Ø 90mm). Una volta asciutte le foglie sono state trattate con 50 ml dei diversi prodotti e con acqua per la tesi di controllo . Dopo 48 e 96 h dal trattamento, dalle foglie sono stati asportate piccole porzioni le quali, successivamente, sono state schiarite con una soluzione di acido lattico, glicerolo e fucsina ed esaminate al microscopio per stabilire la germinazione conidica, la formazione dell'appressorio ed il numero di infezioni ifali. Il conidio era considerato germinato se la lunghezza del tubetto superava la metà della lunghezza del conidio.

Prove di campo

Per le prove in campo è stato seguito un disegno sperimentale a blocco randomizzato con tre tesi di 8 piante ciascuna (2 per 4 repliche): "formulato", Dodina e testimone non trattato. E' stato escluso l'olio vegetale risultato in laboratorio poco efficace. Sono stati eseguiti 5 trattamenti (8/04, 6/05, 24/07, 20/08 e 20/10) con il "formulato" e 2 (29/04 e 20/10) con Dodina. Durante i 6 campionamenti fogliari, sono state raccolte 200 foglie per tesi (50 per 4 repliche). L'efficacia dei trattamenti è stata valutata determinando la percentuale di foglie mostranti i sintomi dell'attacco di *F. oleagineum*.

Fig. 1 - Oliveto cv Gentile di Chieti di 20 anni.
Fig. 1 - Olive trees cv Gentile di Chieti of 20 years old.

Analisi statistica

I risultati delle prove sono stati trasformati in valori angolari e sottoposte all'analisi della varianza (ANOVA) a due vie (Fisher LSD method) per testare la significatività della variabile "cultivar" e dell'interazione "cultivar/trattamenti". Per la realizzazione dei grafici è stato utilizzato il programma SigmaPlot versione SPW10, per la statistica Sigma Stat versione SStat3_5.

Risultati e discussioni

Germinazione conidica, formazione degli appressori e infezione ifale di F. oleagineum

In laboratorio, il "formulato" ha dimostrato una efficacia simile a quella riscontrata utilizzando il p.a. Dodina preso come prodotto chimico di riferimento. (tab. 1). La percentuale di conidi germinati è stata significativamente differente tra le foglie non trattate e quelle trattate. In "formulato" e Dodina, solo il 20 e 23% di conidi sono germinati, valori significativamente più bassi rispetto all'olio vegetale (47%) ed il testimone non trattato (56%) (tab. 1). La formazione dell'appressorio è un requisito essenziale per il processo infettivo. Solo il 16 e 13% di appressori sono stati conteggiati per "formulato" e Dodina contro 26 e

Tab. 1 - Percentuale di germinazione conidica, formazione dell'appressorio di *F. oleagineum* 48h dopo il trattamento e numero delle infezioni ifali su 1 mm^2 di superficie fogliare 96h dopo il trattamento. Nella stessa colonna, i valori con lettere differenti sono statisticamente diversi (LSD test, P<0,05).
Tab. 1 - The percentage of conidia germination and appressorium formation of F. oleagineum *48h after treatment and number of infection hyphae on 1 mm^2 of leaf 96h after treatment. The data were arcsine-transformed before the analysis. Values with different letters are statistically different (P < 0.05) based on Fisher's protected least significant difference (LSD).*

Trattamenti	48h post trattamento		96h post trattamento
	Conidi germinati (%)	Formazione appressorio (%)	Infezione ifale (n. di ife/mm^2)
Non trattato	56 a	37 a	14 a
Olio vegetale	47 b	26 b	9 ab
Formulato	20 c	16 c	5 b
Dodina	23 c	13 c	3 b

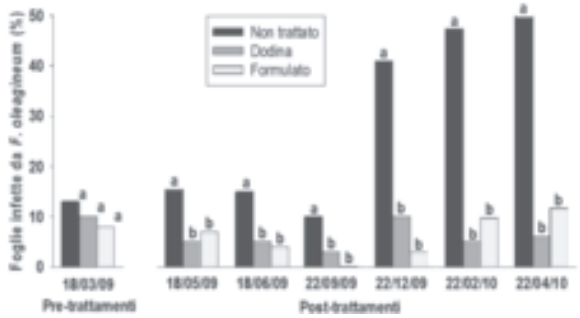

Fig. 2 - Effetto dei trattamenti sull'infezione fogliare provocata da *F. oleagineum*. Valori con lettere differenti sono statisticamente diversi (LSD test, P<0,05).

Fig. 2 - Effects of treatments on F. oleagineum *infection. Values with different letters are statistically different (LSD test, P<0,05).*

37% di olio vegetale e non trattato. Dopo 96h dal trattamento, 14 infezioni ifali per mm^2 di superficie fogliare sono stati contati nel non trattato, contro 5 e 3 in "formulato" e Dodina.

Efficacia del "formulato" in pieno campo

Risultati analoghi a quelli ottenuti in laboratorio si sono riscontrati in pieno campo. Formulato e Dodina hanno ridotto significativamente la percentuale delle foglie infette tanto che il suo valore è rimasto sempre sotto l'11%. L'attività del fungo, bassa durante l'estate, è aumentata in autunno. Nel controllo non trattato il numero delle foglie infette è stato sempre maggiore dell' 11%, raggiungendo il 41% alla fine di dicembre e mantenendosi elevato per tutto l'inverno (51% ad aprile 2010) (fig. 2).

Conclusioni

Le prove fino a qui eseguite hanno dimostrato l'efficacia del "formulato" nei confronti dell'occhio di pavone. Nelle prove di laboratorio entrambe le tesi trattate hanno mostrato una percentuale di germinazione conidica, formazione di appressorio e infezione ifale, statisticamente più bassa della tesi non trattata. A riguardo della relazione esistente tra conidi germinati e infezione ifale, occorre precisare che, mentre nelle foglie trattate col "formulato" il 25% dei conidi germinati erano in grado di produrre infezione ifale, in Dodina la percentuale è stata più bassa, solo il 13%. Tale differenza potrebbe essere spiegata dalla circostanza che il fungicida chimico, avendo maggiore persistenza del "formulato", risulta più efficace nella inibizione delle ife dopo 96h dal trattamento (tab. 1).

Le prove di campo hanno confermato quanto osservato in laboratorio. Tuttavia, nella tesi irrorata con "formulato", sono stati necessari un maggior numero di trattamenti rispetto al prodotto chimico di riferimento a causa della maggiore dilavabilità e più veloce degradabilità del prodotto naturale. Per concludere, i risultati ottenuti in laboratorio ed in campo nonché la considerazione del fatto che dalle prove eseguite non sono emersi fenomeni di fitotossicità, permettono di ipotizzare, trattandosi di un prodotto del tutto naturale, un eventuale impiego del formulato in programmi di lotta biologica e integrata.

Riassunto

Con il presente lavoro sono stati esaminati gli effetti di un Formulato (consistente in una dispersione di farina di brassicacee in olio vegetale della stessa specie) su *Fusicladium oleagineum,* fungo responsabile della malattia nota come occhio di pavone dell'olivo . Nel test di laboratorio i conidi del fungo delle foglie di olivo trattate con Formulato e con il prodotto commerciale di riferimento Dodina hanno mostrato una percentuale di germinazione (rispettivamente del 20 e 23%) statisticamente più bassa rispetto al testimone non trattato (56%) ed alla tesi con il solo olio vegetale (47%). Le prove di campo hanno confermato l'efficacia del Formulato e della Dodina rispetto alla tesi non trattata. Due applicazioni del Formulato in primavera e tre in autunno sono in grado di contenere l'incidenza dell'occhio di pavone nell'oliveto sotto la soglia di danno, specialmente se i trattamenti riguardano cultivar non particolarmente suscettibili alla malattia.

Parole chiave: glucosinolati, occhio di pavone, basso impatto ambientale, *Fusicladium oleagineum.*

Bibliografia

Bowers J.H., Locke J.C., 2000. *Effect of botanical extract on the population density of Fusarium oxysporum in soil and control of fusarium wilt in the greenhouse.* Plant Dis. 84(3): 300-305.

Horst R.K., Kwamoto S.O., Porter L.L., 1992. *Effect of sodium bicarbonate and oil on control of powdery mildew and black spot of roses*. Plant Dis. 76: 247-251.

Rongai D., Cerato C., Lazzeri L., Palmieri S., 2006. *Composition for the treatment and/or prevention of attacks by biological agents*. (Patent number PCT/IB2006/001700).

Rongai D., Cerato C., Lazzeri L., Palmieri S., Patalano G., 2008. *Vegetable oil formulation as biopesticide to control California red scale (*Aonidiella aurantii *Maskell)*. J. Pest Science 81(4):179-185

Tegegne G., Pretorius J.C., Swart W.J., 2007. *Antifungal properties of Agapanthus africans L. extracts against plant pathogens.* Crop Protection 27: 1052-1060.

Wang W., Ben-Daniel B.H., Cohen Y., 2004. *Control of plant disease by extracts of* Inula viscosa. Phytop. 94(10): 1042-47.

Yanar Y., Kadioglu I., Gokce A., Demirtas I., Goren N., Cam H., Whalon M., 2011. In vitro *antifungal activities of 26 plant extracts on mycelial growth of* Phytophthora infestans *(Mont.) de Bary.* Afr. J. Biotech. 10(14): 2625-2629.

Modello biometeorologico per la previsione delle produzioni in olivicoltura

Bonofiglio T., Orlandi F.*, Ruga L., Romano B. e Fornaciari M.
Dipartimento di Biologia Applicata, Università di Perugia

Biometeorology model for the prediction of production in olive growing

Abstract. This work describes a predictive model regarding the potential production of olive fruits in seven provinces of southern Italy. The study was carried out between 1999 and 2010 by monitoring the olive pollen in the atmosphere with a pollen trap (Hirst model), the use of agronomic data, and meteorological observations (precipitation, maximum and minimum temperatures, etc.). The results confirmed the validity and accuracy of volumetric sampler as a tool for predicting the production of olives in areas where this species is widespread. Moreover, the gap between actual and forecast data taking into account all the monitoring stations is always contained within 10%.

Key words: predictive model, pollen, flowering.

Introduzione

Nel corso degli ultimi decenni sono stati sviluppati numerosi modelli per svariate applicazioni in agricoltura come ad esempio per le operazioni di irrigazione, dei trattamenti fitosanitari, delle concimazioni e quelle di raccolta (Coombe 1987; Orlandi *et al*., 2005; Doorenbos e Kassam 1979). Quindi nell'agricoltura moderna sussiste la necessità di utilizzo di questi modelli per ottimizzare le risorse impiegate nei processi produttivi e per raggiungere soddisfacenti obbiettivi ambientali ed economici. Molto utili risultano essere i modelli predittivi delle produzioni finali perché forniscono il tempo necessario per utilizzare strategie per moderare gli effetti della produzione agricola annuale e di pianificare la raccolta, la politica dei prezzi e gestione degli stock. Questa necessità è maggiore nel quadro della politica agricola comune dei paesi CE, le cui norme prevedono quote di produzione, assegnazione di aiuti economici in caso di perdita di produzione, favorire l'insediamento o l'abbandono di alcune colture, e stabilire canali di comunicazione tra paesi produttori per prevenire, in anni di scarsa produzione, una carenza del mercato e aumenti incontrollabili dei prezzi (Minero *et al.*, 1998). Infatti, la disponibilità di dati di previsioni della produzione, diversi mesi prima della raccolta costituisce uno strumento importante sia a livello macro che micro-economico. Presso il laboratorio di Aerobiologia delle Produzioni Agricole è stato ideato ed implementato un modello interpretativo della produzione in olivo attraverso lo studio della fioritura con l'ausilio di tecniche di monitoraggio indiretto (Bonofiglio *et al*., 2008). L'obbiettivo è quello di calibrare un modello predittivo delle produzioni in olivo basandosi sui quantitativi di polline (componente biologica) catturato in atmosfera durante il periodo della fioritura.

Materiali e metodi

Area di Studio

L'area di studio è localizzata in 4 Regioni (Puglia, Calabria, Sicilia e Campania) nella parte sud della penisola italiana compresa tra i 37° e i 42° N di latitudine. In particolare i campionamenti sono stati effettuati in sette aree di particolare rilievo economico ed olivicolo (Agrigento, Messina, Catanzaro, Cosenza, Lecce, Foggia ed Avellino). Il clima è influenzato dalla presenza del mare Mediterraneo ed è caratterizzato da inverni relativamente miti e da estati calde e siccitose. La temperatura media annuale, durante tutto il periodo di studio, è stata di ≈ 19 °C. Le piogge sono distribuite al di fuori della stagione estiva e vanno da un valore minimo registrato nella stazione di Foggia (210 mm nel 2000), ad un valore massimo registrato nella stazione di Avellino (1.056 mm nel 2008).

Monitoraggio Pollinico

I dati aerobiologici sono stati raccolti in un periodo di 12 anni (1999-2010) attraverso campionatori volumetrici tipo Hirst (VPPS 2000 Lanzoni) seguendo le indicazioni dell'Associazione Italiana di Aerobiologia. Alla fine delle operazioni di laboratorio (preparazione dei campioni e analisi microscopiche) sono state ottenute una serie di concentrazioni polliniche giornaliere (n. pollini/m^3 d'aria campionata).

* fabor@unipg.it

Successivamente, le concentrazioni giornaliere sono state elaborate in curve di pollinazione ed indici pollinici necessari per le elaborazioni statistiche ai fini dell'implementazione del modello predittivo. L'approccio seguito ha spinto a considerare la quantità totale di polline emesso durante la fioritura (Ip = indice pollinico), il polline emesso fino al giorno in cui si registra il massimo di emissione (Ipc = indice pollinico contratto) ed il periodo effettivo di pollinazione (PEP), considerando anche le variabili che maggiormente ne determinano il livello, al fine di avere anche una valutazione qualitativa del polline emesso ottenendo un'indagine di "efficienza riproduttiva".

Variabili Meteorologiche

Le variabili meteorologiche utilizzate nelle elaborazioni statistiche sono state le temperature minime, massime, medie e la precipitazione, variabili per le quali è stato possibile ottenere dati continui e validati. Oltre ai dati costruiti (medie decadali e mensili) le informazioni giornaliere delle principali variabili meteorologiche (temperature e precipitazioni) sono state accumulate tramite sommatorie ottenendo trend climatici. In particolare sono state definite le *Chilling units* (CU) (Richardson *et al*., 1974), le *Growing Degree Hours* (GDH) e *Growing Degree Days* (GDD) (Anderson e Richardson, 1986) per avere indicatori della possibile induzione delle gemme a fiore nell'inverno dell'anno precedente a quello di studio (utilizzando le CU) e dello sviluppo degli apparati riproduttori (utilizzando le GDH e GDD) sia nell'anno di studio (t) che in quello precedente (t^{-1}). Inoltre, sono state calcolate sommatorie mensili e cumulate delle temperature max, min e medie nel periodo estivo (giugno-settembre) per avere un indicatore dello stress termico estivo ed indirettamente di quello idrico a cui sono sottoposte le piante.

Analisi Statistiche

I metodi di analisi utilizzati per descrivere e interpretare le relazioni tra variabili dipendenti (Produzioni olivicole) ed esplicative (variabili meteorologiche e biologiche) sono stati i seguenti: Analisi di correlazione, Analisi delle Componenti Principali (ACP) e Analisi di regressione lineare multivariata. Si è quindi provveduto a costruire un modello di regressione che prevedesse l'introduzione tra le variabili indipendenti di quelle maggiormente correlate alle produzioni olivicole annuali (ton) e a parità di valore di quelle che potessero minimizzare i coefficienti di autocorrelazione ottimizzando cosi la percentuale di varianza spiegata dal modello stesso. Per le analisi statistiche è stato utilizzato il software NCSS 2007.

Risultati e discussioni

In tabella 1 sono presentati i risultati riassuntivi delle analisi di regressione, vengono indicate le variabili indipendenti utilizzate nei differenti modelli di regressione, i coefficienti di regressione corrispondenti, i t-value ed i livelli di significatività relativi. Per ogni variabile considerata, il livello di probabilità è

Fig. 1 - Output dei modelli statistici per ogni area olivicola studiata.
Fig. 1 - Output of statistical models for each olive area of study

Località	Variabile indipendente	Coefficente regressione	T-value	Livello probabilità
Agrigento	Intercept	-2.638,50	-1,36	0,31
	Ip	-0,93	-6,03	0,03
	GDD15	27,99	4,80	0,04
	Tmed MagII	215,26	2,96	0,10
	Tmed AprI	-1.137,12	-6,98	0,02
	Tmed SetIII_1	813,17	7,02	0,02
Messina	Intercept	-3.838,88	-5,79	0,0
	Ip	0,01	10,10	0,0
	Tmin AprII	333,34	6,50	0,0
Catanzaro	Intercept	-46.807,31	-2,65	0,12
	Ip	0,03	1,67	0,17
	Tmin AprI	-1.513,81	-3,30	0,08
	Ngpio GiuII	-12.731,74	-2,05	0,18
	Tmax_Tmin No	893,07	2,45	0,13
	Tmax AgoII	1.930,35	3,50	0,07
Cosenza	Intercept	5.700,60	5,65	0,03
	Ip	0,02	3,16	0,09
	Tmed MarI	-1.216,19	-16,66	0,0
	Tmax_Tmin No	1.525,84	18,40	0,0
	Pioggia MarI	-66,83	-6,39	0,02
	Pioggia SetIII	87,49	6,81	0,02
Foggia	Intercept	143.155,38	35,25	0,0
	Ip	0,59	7,96	0,0
	Pioggia OttII_1	1.109,55	9,89	0,0
	Pioggia DicI_1	352,17	7,75	0,0
Lecce	Intercept	-254.258,61	-5,30	0,03
	Ip	2,63	16,21	0,0
	Tmin SetII_1	-6.191,18	-11,32	0,01
	Pioggia GenII	4.671,02	10,60	0,01
	GDD14	-221,52	-9,62	0,01
	Tmin LugIII	19.938,72	8,71	0,01
Avellino	Intercept	21.045,78	3,66	0,07
	EPP	0,04	5,42	0,03
	Tmax GiuI	-243,76	-5,43	0,03
	Tmin NovI_1	-391,40	-2,65	0,12
	Tmin LugI	-868,82	-3,56	0,07
	GDD15	9,14	7,78	0,02

molto soddisfacente, solo in un caso (Catanzaro) alcune variabili hanno livelli di probabilità superiori al 10% con un rischio quindi che la significatività stessa delle variabili introdotte non risulti sufficiente nel poter affermare che la componente casuale possa aver influito sul risultato di previsione.

In figura 2 sono riportate nel dettaglio le produzioni annuali (ton) nel periodo 1999-2010. I risultati dell'analisi evidenziano come le aree olivicole di Lecce, Foggia, Catanzaro e Cosenza presentino un trend più o meno costante. Al contrario nelle altre aree di studio si evidenzino andamenti piuttosto variabili. In termini quantitativi le prime registrano valori nettamente superiori alle altre stazioni. La stazione di Avellino è quella che registra produzioni annue minori delle altre. In figura 2 si evidenza come lo scarto tra dati previsionali e reali tenendo conto di tutte le stazioni di monitoraggio sia sempre contenuto entro il 10%. Le campagne olivicole 1999-2000 e 2000-2001 sono state quelle con gli scarti maggiori, scarti che si sono ridotti negli anni successivi.

Conclusioni

I modelli generati durante questa ricerca utilizzando tecniche statistiche differenti, hanno evidenziato una grande capacità interpretativa, che è stata confermata dagli alti valori di varianza spiegata e di significatività delle variabili. La presenza di una variabile biologica che può portare un considerevole contributo in termini di informazione nei modelli di regressione, permette di attenuare in maniera rilevante la variabilità dovuta ai parametri meteorologici considerati. Inoltre, la variabile pollinica a causa della sua partecipazione diretta al processo riproduttivo, può spiegare gran parte della futura variabilità delle produzioni.

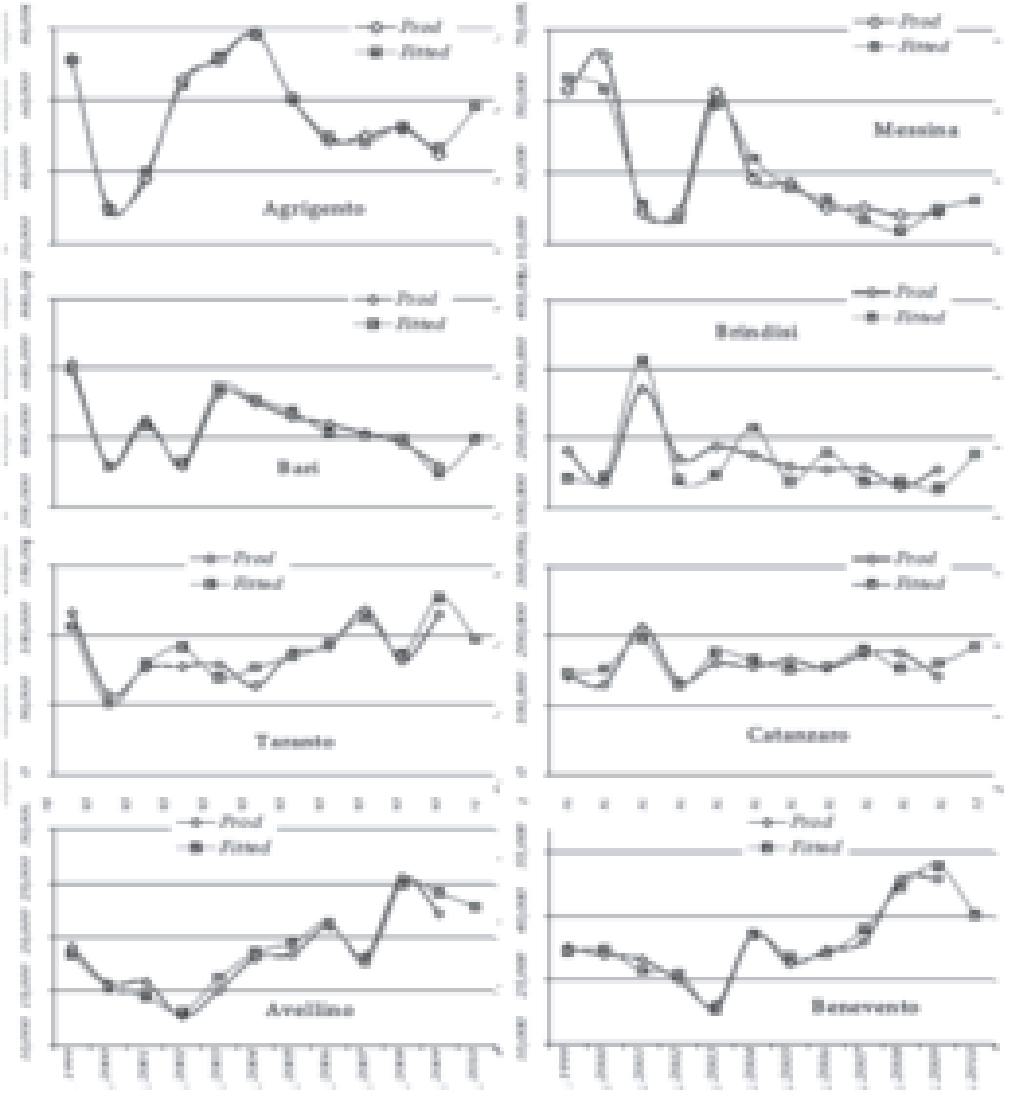

Fig. 2 - Andamenti delle produzioni olivicole reali e previste nelle aree di studio .
Fig. 2 - Forecasted and Real Olive production trends in the study areas.

Una bassa variabilità durante gli anni potrebbe permetterci di integrare questa valutazione indiretta, nei parametri forniti dal polline, e di utilizzarli come variabili indipendenti nell'analisi di regressione.

Riassunto

Questo lavoro descrive un modello predittivo riguardo le potenziali produzioni di olive in sette province del sud Italia. Lo studio è stato effettuato tra il 1999 e il 2010 attraverso il monitoraggio del polline di olivo in atmosfera, con un catturatore pollinico tipo Hirst, l'utilizzo di dati agronomici e osservazioni meteorologiche (precipitazioni, temperature minime e massime, ecc). I Risultati hanno confermato la validità e l'accuratezza del campionatore volumetrico come strumento per la previsione delle produzioni di olive in aree dove tale coltura è molto diffusa. Inoltre, lo scarto tra dati previsionali e reali tenendo conto di tutte le stazioni di monitoraggio risulta sempre contenuto entro il 10%.

Parole chiave: modelli predittivi, polline, fioritura.

Bibliografia

Anderson J.L., Richardson E.A., 1986. *Validation of Chill unit and flower bud Phenology models for "Montmorency" sour cherry*. Acta Hort. 184: 71-78.

Bonofiglio T., Orlandi F., Sgromo C., Romano B., Fornaciari M., 2008. *Influence of temperature and rainfall on timing of olive (*Olea europaea*) flowering in southern Italy*. New Zealand J. Crop Hort. Sci., 36: 59-69.

Colombe B.G., 1987. *Influence of temperature on composition and quality of grapes*. Acta Hort., 206: 23-35.

Doorembos J., Kassam A.H., 1979. *Yield response to water*. F.A.O. Irrig. Drain. Pap. 33, Rome.

Minero F.Jg., Candau P., Morales J., Tomas C., 1998. *Forecasting olive crop production based on ten consecutive years of monitoring airborne pollen in Andalusia (southern Spain)*. Agriculture, Ecosystems & Environment, 69: 201-215.

Orlandi, F., Romano B., Fornaciari M., 2005. *Effective pollination period estimation in olive (*Olea europaea *L.), a pollen monitoring application*. Sci. Hort., 105: 313-318.

Richardson E.A., Seeley S.D., Walker D.R., 1974. *A model for estimating the completion of rest for Redhaven and Elberta peach trees*. HortScience 82: 302-306.

Acta Italus Hortus 10: 225-228

Sensibilità della cultivar di olivo Coratina a nuovi formulati commerciali a base di *Dimethoate*

Buccoliero A.*, Caponero A. e Mennone C.
ALSIA - Az. Sperimentale «Pantanello», Metaponto (MT)

Sensitivity of Olive tree cv Coratina to new products containing *Dimethoate* as active substance

Abstract. A three-year experiment was carried out to evaluate the phytotoxicity of new formulations of dimethoate, normally used to control both *Bactrocera oleae* and *Prays oleae*, but usually reported to be phytotoxic to some other varieties (Coratina). The experimental trials were carried out in Metaponto (MT) on irrigated olive trees (cv Coratina). The insecticide treatments were performed with properly calibrated equipment company, with normal volume at two doses: the maximum label dose (1.0 t ha^{-1}) and double (2.0 t ha^{-1}). The field measurements were performed at 7, 15 and 30 days from treatment, observing the fruits, leaves and twigs of 10 plants for each treatment. The results of the three years experiment indicated that all formulations with dimethoate sprayed at normal volume of solution did not induce any symptoms of phytotoxicity on the organs investigated, both in the pit hardening (treatment against *P. oleae*) and enlargement of the drupe-fruit setting (treatment against *B. oleae*). Conversely, in the treatment in which the solution was applied until dripping the phytotoxicity occurred only on fruits. The results also showed that the currently marketed formulations could be used on varieties called "sensitive" to dimethoate, only if their proper application (sprayers and well-calibrated volumes of solution to avoid drips) is ensured. The new formulations were less phytotoxic than traditional ones, even under the drip, probably due to the elimination or reduction of co-formulants phytotoxic effects. Therefore, the tested products could be used either on coratina or on other cultivars commonly considered sensitive to dimethoate. However, it is important to operate rationally, distributing insecticide with calibrated and efficient sprayers, in adequate doses and avoid dripping.

Key words: olive tree, cv Coratina, dimethoate, phytotoxicity.

* bucantonio@libero.it

Introduzione

Il *Dimethoate* viene comunemente utilizzato nella lotta alla mosca delle olive (*Bactrocera oleae*) ed alla tignola delle olive (*Prays oleae*) per la sua efficacia e convenienza economica ma ne viene sconsigliato l'impiego su alcune cultivar, tra cui la *Coratina*, ritenute sensibili.

L'obiettivo della sperimentazione è stato quello di indagare sulla fitotossicità dei nuovi formulati a base di dimethoate in cui, come dichiarato dalle ditte produttrici, la molecola è stata stabilizzata ed il prodotto commerciale contiene nuovi coformulanti, con una sensibile riduzione o la completa eliminazione dello xilene (Guarnone *et al*., 2010). Di seguito sono riportati i risultati di un triennio di prove (2008-2009-2010) per verificare la fitotossicità di nuovi prodotti commerciali a base della sostanza attiva dimethoate sulla cultivar di olivo *Coratina*, notoriamente sensibile.

Materiali e metodi

Le prove sono state condotte nel biennio 2008-2009 presso l'Azienda Sperimentale "Pantanello" dell'ALSIA (Metaponto, MT), su un oliveto irriguo, cultivar Coratina, di oltre 30 anni di età e nel 2010 su un oliveto della stessa varietà presso un'azienda in agro di Bernalda, distante da quello utilizzato gli anni precedenti circa 2 km. Nell'oliveto sono stati individuati dei parcelloni di 80 piante per ciascuna tesi, secondo un disegno sperimentale che non prevedeva ripetizioni.

I trattamenti insetticidi sono stati eseguiti contro la mosca delle olive (7/10/2008, 18/9/2009 e 23/9/2010) e contro la tignola delle olive (30/06/2009 e 12/7/2010). Le soluzioni insetticide sono state preparate rispettando le dosi massime riportate in etichetta. I formulati utilizzati, le quantità e gli anni di applicazione sono riportati in tabella 1.

Le soluzioni insetticide sono state distribuite mediante irroratrice (atomizzatore) aziendale precedentemente sottoposta a controllo funzionale e taratu-

Tab. 1 - Formulati utilizzati, quantità e anni di applicazione.
Tab. 1 - Type of formulations, amount and years of application.

Tesi	Prodotto commerciale	S.A.	dose	q.tà /ha	Anno		
1	testimone	non trattato		10 ql	2008	2009	2010
2	Danadim 400 (Cheminova)	Dimethoate 37,9	140 ml/ql	10 ql	2008	2009	2010
3	Perfekthion (Basf)	Dimethoate 37,4	150 ml/ql	10 ql	2008	2009	2010
4	Danadim 400 (Cheminova)	Dimethoate 37,9	140 ml/ql	20 ql (gocciolamento)	-	2009	2010
5	Perfekthion (Basf)	Dimethoate 37,4	150 ml/ql	20 ql (gocciolamento)	-	2009	2010
6	Perfekthion (Basf) + Tegoplant (Agricola internazionale)	Dimethoate 37,4 + bagnante	150 ml/ql + 25 ml/ql	10 ql	-	-	2010
7	Perfekthion (Basf) + Tegoplant (Agricola internazionale)	Dimethoate 37,4 + bagnante	150 ml/ql + 25 ml/ql	20 ql (gocciolamento)	-	-	2010
8	Siglato (Cheminova)	Dimethoate 37,9	140 ml/ql	10 ql	-	-	2010
9	Siglato (Cheminova)	Dimethoate 37,9	140 ml/ql	20 ql (gocciolamento)	-	-	2010

ra, con un volume di 10 ql/ha, normalmente utilizzato nell'area metapontina.

Nel 2009 e 2010, sulle tesi 4 e 5 la distribuzione è stata eseguita a dosi più elevate fino a gocciolamento delle piante. Nel 2010 si sono aggiunte altre 4 tesi per testare la nuova formulazione del Danadim e gli effetti del bagnante Tegoplant abbinato al prodotto commerciale Perfekthion. Entrambi i formulati sono stati distribuiti a volume normali (tesi 6, 8) e a gocciolamento (tesi 7, 9).

I rilevi in campo sono stati eseguiti a distanza di 7, 15 e 30 giorni dai trattamenti, osservando i frutti, le foglie ed i rametti di 10 piante per ciascuna tesi.

Dove si è evidenziata fitotossicità sui frutti, per quantificare i sintomi è stato raccolto da 4 piante un campione di 100 drupe. I danni sono stati distinti in 4 classi in base alla intensità di manifestazione del sintomo (classe 0: drupe prive di sintomi; classe I: drupe con depressioni poco estese; classe II: drupe con depressioni estese che non si chiudevano ad anello; classe III: drupe con depressioni che si chiudevano ad anello; classe IV: drupe secche. La gravità dei sintomi è stata espressa con l'indice di Mac Kinney (media ponderale delle diverse classi di danno).

Risultati

Nei tre anni di prova, le piante interessate dall'applicazione di un volume normale di soluzione (10 hl/ha), non hanno manifestato alcun sintomo di fitotossicità su nessuno degli organi indagati, sia in fase di indurimento nocciolo (trattamento contro *P. oleae*) che in ingrossamento drupe-invaiatura (trattamento contro *B. oleae*).

Nelle tesi in cui la soluzione è stata applicata fino a gocciolamento (Tesi 4, 5, 7 e 9) non sono stati osservati sintomi sulle foglie e sui rametti mentre si sono manifestati fenomeni di moderata fitotossicità sulle drupe.

A 7 giorni dal trattamento, i frutti interessati dai fenomeni di fitossicità mostravano sintomi solo nella parte distale, dove si era creata la goccia di soluzione insetticida. Successivamente si manifestava una depressione che coincideva con la parte periferica della goccia e andava a formare una corona circolare non sempre chiusa (figg. 1 e 2). Nell'evoluzione dei

Fig. 1 - Perfekthion irrorato fino a gocciolamento.
Fig. 1 - Distribution of Perfekthion till dripping.

Fig. 2 - Danadim irrorato fino a gocciolamento.
Fig. 2 - Distribution of Danadim till dripping.

sintomi, la parte circoscritta dalla depressione rimaneva vitale mostrando anche dei fenomeni di iperplasia ad inizio invaiatura (fig. 3). Sezionando la drupa in corrispondenza della zona depressa non si sono osservati tessuti necrotici nella polpa.

Nelle tesi con gocciolamento sono state osservate alcune drupe disseccate, solo dopo il trattamento ad indurimento nocciolo (fig. 4).

I risultati dei rilievi effettuati a 7 giorni dal trattamento sono riportati nella tabella 2.

Conclusioni

Manifestazioni di fitotossicità a seguito dell'irrorazione di prodotti a base di dimethoato su piante di olivo della cultivar *Coratina* si sono evidenziate solo sui frutti delle piante trattate, irrazionalmente, con volumi elevati di soluzione insetticida (quantità doppie rispetto alla buona pratica di campo, con gocciolamento).

Fig. 3 - Evoluzione della sintomatologia di fitotossicità ad inizio invaiatura. È evidente la depressione a corona e l'ipertrofia dei tessuti ivi circoscritti.
Fig. 3 - Effect of phytotoxic at the early fruit setting.

Fig. 4 - Danadim + bagnante irrorato fino a gocciolamento.
Fig. 4 - Distribution of Danadim + surfactant till dripping.

Tab. 2 - Effetto della fitotossicità a 7 giorni dal trattamento (Indice di Mac Kinney).
Tab. 2- Effect of phytotoxic after 7 days of treatment (Mac Kinney Index).

Tesi	Data del trattamento			
	7/10/08	18/09/09	12/07/10	23/09/10
1) testimone	0	0	0	0
2) Danadim 400	0	0	0	0
3) Perfekthion	0	0	0	0
4) Danadim 400 (gocciolamento)	Nd	0,96	0,23	0,72
5) Perfekthion (gocciolamento)	Nd	1,58	0,49	0,91
6) Perfekthion + Tegoplant	Nd	Nd	0	0
Perfekthion + Tegoplant (gocciolamento)	Nd	Nd	1,72	1,52
Siglato	Nd	Nd	0	0
Siglato (gocciolamento)	Nd	Nd	0	0,76

I sintomi rilevati sulle drupe, comunque, non sembrano incidere significativamente sulla produzione. Infatti le depressioni osservate in corrispondenza delle gocce hanno interessato solo i tessuti superficiali e non hanno compromesso la vitalità dei tessuti in esse circoscritti che, anzi, hanno manifestato lievi iperplasie.

Anche se Perfekthion, abbinato al bagnante Tegoplant, ha manifestato un maggiore indice di gravità (Indice di Mc Kinney= 1,72) rispetto alle altre tesi, a fini pratici si ritiene che i danni causati non incidano significativamente sulla produttività, anche perché le olive danneggiate non sono cascolate ed hanno completato regolarmente il ciclo di maturazione.

Si ritiene, pertanto, che i prodotti testati possano essere utilizzati anche su *Coratina* (cultivar comunemente ritenuta tra le più sensibili al dimethoate) a condizione di operare razionalmente, distribuendo la soluzione insetticida con irroratrici efficienti e tarate, in dosi adeguate ed evitando il gocciolamento.

Riassunto

E' stata condotta una valutazione triennale per verificare la fitotossicità di nuove formulazioni di dimethoate (s.a. comunemente impiegata contro *Bactrocera oleae* e *Prays oleae* ma riportata come fitotossica per alcune varietà come la Coratina).

Le prove sono state condotte in agro metapontino (MT), in oliveto irrigui, cultivar Coratina, su parcello-

ni in cui sono stati eseguiti trattamenti insetticidi con attrezzature aziendali opportunamente tarate, alle dosi massime di etichetta, a volumi normali (10 ql/ha) e doppi (20 ql/ha).

I rilevi in campo sono stati eseguiti a distanza di 7, 15 e 30 giorni dai trattamenti, osservando i frutti, le foglie ed i rametti di 10 piante per ciascuna tesi.

Nei tre anni di prova, tutti i formulati con dimethoate irrorati a volume normale di soluzione non hanno indotto alcun sintomo di fitotossicità sugli organi indagati, sia in fase di indurimento nocciolo (trattamento contro *P. oleae*) che di ingrossamento drupe-invaiatura (trattamento contro *B. oleae*).

Nelle tesi in cui la soluzione è stata applicata fino a gocciolamento si sono manifestati fenomeni di fitotossicità solo sui frutti.

I risultati del triennio hanno evidenziato che i formulati attualmente in commercio possono essere utilizzati anche su varietà ritenute "sensibili" a dimethoate, a condizione di una loro corretta applicazione (irroratrici ben tarate e volumi di soluzione che evitino il gocciolamento). I nuovi formulati sono risultati meno fitotossici rispetto ai tradizionali, anche in condizioni di gocciolamento, probabilmente grazie alla eliminazione o riduzione di coformulanti con effetti fitotossici.

Si ritiene, pertanto, che i prodotti testati possano essere utilizzati anche su coratina (cultivar comunemente indicata come sensibile al dimethoate) a condizione di operare razionalmente, distribuendo la soluzione insetticida con irroratrici efficienti e tarate, in dosi adeguate ed evitando il gocciolamento.

Parole chiave: olivo, Coratina, dimethoate, fitotossicità.

Bibliografia

Guarnone A., Davì R., Andersen E., Buccoliero A., 2010. *Danadim® 400, nuova formulazione stabilizzata a base di dimetoato: principali caratteristiche ed evidenze sperimentali contro la mosca dell'olivo (Bactrocera oleae)*. In "Atti delle Giornate Fitopatologiche 2010", Cervia (RA) 9-12 marzo: 113-119.

Un consorzio di batteri è coinvolto nello sviluppo della rogna dell'olivo

Moretti C.[1], Hosni T.[1], Devescovi G.[2], Venturi V.[2] e Buonaurio R.[1*]
[1] *Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali, Università di Perugia*
[2] *International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, Padriciano (TS)*

A bacteria consortium is involved in the development of Olive knot disease

Abstract. Olive knot disease, caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (*Pss*), is characterized by knots or galls formation on different parts of the plant, mainly on twigs and young branches, caused by the phytohormones indole-3-acetic acid (IAA) and cytokinins produced by the bacterium. Apart from *Pss*, knots provides a special niche for the development of non-pathogenic bacterial species, and their role in the development of the disease is under investigation. Our attention is point out on *Pantoea agglomerans* (*Pag*), *Erwinia toletana* (*Et*) and *Erwinia oleae* (*Eo*). The co-inoculation of *Pss* with the three bacterial endophytes, causes an increase in the size of knots and the growth of *Pss in planta* is stimulated by *Et* and *Eo* and depressed by *Pag*. We have also demonstrated that *Pss* and the bacterial endophytes possess a quorum sensing (QS) intercellular communication system mediated by N-acyl homoserine lactones (AHL). Using AHL biosensors, we found that the four species possess a conserved AHL profile: *Pss* and *Et* produce C6-3oxo-HSL and C8-3oxo-HSL; *Pag* C4-HSL and C6-HSL; *Eo* C6-HSL and C8-HSL. Using bacterial genomic knockout mutants we found that QS is pivotal for virulence of *Pss* and that the lack of AHL production by *Pss* mutants can be complemented by wild type *Et in planta*. Our finding suggested that in the knot niche a stable consortium between the above mentioned bacteria are established. All *Pag* strains (DAPP-PG 729, 731 and 734) obtained from olive knots bear the *iaaM*, *iaaH* and *iaaL* genes, involved in the IAA metabolism; DAPP-PG 731 strain has the *ptz* gene, involved in the cytokinin synthesis; DAPP-PG 734 strain bears the *hrcC* of the *hrp*/*hrc* cluster. Since *Pag* strains have the same IAA pathway used by *Pss* and one strain bears a gene of the *hrp*/*hrc* cluster, it is possible to hypothesize that *Pag* have acquired these genes from *Pss* by horizontal transfer.

Key words: Olive knot, bacterial community, Quorum sensing, acyl homoserine lactone (AHL).

* buonaurio@unipg.it

Introduzione

La rogna dell'olivo, causata da *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (*Pss*), è una malattia diffusa in molti Paesi olivicoli, che si manifesta con la formazione di tubercoli su branche, rami e foglie. I tubercoli rappresentano una nicchia ecologica ideale non solo per la crescita dell'agente patogeno, ma anche per batteri endofiti come *Erwinia toletana* (*Et*) (Rojas *et al*., 2004), *Pantoea agglomerans* (*Pag*) (Marchi *et al*., 2006), *Erwinia oleae* (*Eo*) (Moretti *et al*., 2011), e altri batteri appartenenti al genere *Burkholderia*, *Hafnia*, *Pseudomonas* e *Stenotrophomonas* (Ouzari *et al*., 2008). Nonostante tali endofiti siano frequentemente associati ai tubercoli, il loro ruolo nello sviluppo della malattia e le loro relazioni intra- e inter-specifiche non sono note. Relativamente a quest'ultimo aspetto, è noto che i batteri Gram-negativi possiedono un sistema di comunicazione detto *quorum sensing* (QS), mediato da acil omoserina lattoni (AHL) (Fuqua *et al*., 1994). Tale sistema consente ai batteri di attivare l'espressione di un set di geni solo quando viene raggiunta una concentrazione-soglia di AHL, che è in stretta relazione con la densità di popolazione del batterio. Il QS-AHL è stato per la prima volta individuato nel batterio bioluminescente *Vibrio fischeri*, che grazie alle proteine LuxI e LuxR emette luce solo quando raggiunge un livello-soglia di popolazione. E' stato successivamente dimostrato che tale sistema è attivo in molti altri batteri, tra i quali alcuni che infettano le piante (von Bodman *et al*., 2003). LuxI di *V. fischeri* e proteine analoghe a LuxI individuate in altre specie batteriche sono enzimi capaci di sintetizzare AHL; gli AHL formano un complesso con la proteina LuxR e con proteine ad essa analoghe, il quale, a sua volta, si lega con il promotore (lux box) di molti geni andando così a modulare la loro espressione (Fuqua *et al*., 2001).

Nel presente lavoro viene riportata una sintesi dei risultati ottenuti in precedenti studi (Hosni, 2010; Hosni *et al*., 2011) e in studi che sono in corso, volti a definire le relazioni esistenti tra gli endofiti *Et*, *Pag* e *Eo* e l'agente responsabile della rogna. Obiettivi specifici di tali studi erano quelli di verificare se:

- *Et*, *Pag* e *Eo* modulano la gravità della rogna (obiettivo 1);
- *Pss*, *Et* e *Pag* possiedono il sistema QS-AHL (obiettivo 2);
- *Pss*, *Et* e *Pag* sono in grado di comunicare tra di loro attraverso il QS-AHL (obiettivo 3);
- alcuni ceppi di *Pag*, isolati da tubercoli di olivo, possiedono i geni coinvolti nel metabolismo dell'acido indol acetico (IAA) e delle citochinine e il cluster genico *hrp*/*hrc* tipico dei batteri fitopatogeni Gram negativi, dato che inducono reazione ipersensibile (HR) quando inoculati in foglie di tabacco (obiettivo 4).

Materiali e metodi

I materiali e metodi relativi agli obiettivi 1 e 3 (vedi introduzione) sono descritti da Hosni (2010) e Hosni *et al*. (2011), mentre quelli per l'obiettivo 4 sono di seguito riportati.

Nel genoma dei ceppi DAPP-PG 729, 731 e 734 di *Pag*, isolati da tubercoli di olivo è stata verificata, mediante PCR, la presenza dei geni: *iaaM* e *iaaH,* coinvolti nella biosintesi dell'IAA; *iaaL*, il cui prodotto coniuga la lisina con l'IAA; *ptz*, coinvolto nella biosintesi delle citochinine; *hrcC* e *hrcJ*, due geni del cluster genico *hrp*/*hrc*. La PCR è stata condotta come descritto da Hosni (2010). Per i geni *hrcC* e *hrcJ* sono stati utilizzati primer disegnati a partire dal genoma del ceppo NCPPB 3335 di *Pss* (Rodríguez-Palenzuela *et al*., 2010), le cui sequenze sono di seguito riportate: *hrcC* (For 5'-TGACTGATGTAGGCCTGCTG-3'; Rev 5'-GCATCGATTTCGATCAGGTT-3'); *hrcJ* (For 5'-GCTGCTGTTGTTTTGCATGT-3'; Rev 5'-GCTCCTGAGACAGGGCATAG-3').

Per scartare l'ipotesi che la morte cellulare indotta in tabacco dai ceppi di *Pag* fosse causata da un principio tossico e non da HR, i brodi colturali dei ceppi batterici, dopo filtrazione su filtri di nitrocellulosa da 0,2 µm, venivano infiltrati nel mesofillo di piante di tabacco, verificando nelle ore successive se provocassero morte cellulare.

Risultati e discussione

Obiettivo 1

Quando alcune piante di olivo (cv Frantoio) venivano co-inoculate con *Pss* e *Et*, *Pag* oppure *Eo*, la gravità della malattia, espressa come volume del tubercolo, incrementava significativamente. La crescita *in planta* di *Pss* veniva stimolata dalla presenza di *Et* e *Eo*, mentre era depressa da *Pag*. Inoltre, la crescita di tutti gli endofiti veniva stimolata dalla presenza di *Pss*. Quindi si può affermare che gli endofiti *Et*, *Pag* e *Eo* esaltano la gravità della rogna.

Obiettivo 2

Tutte le specie batteriche esaminate producono AHL. Infatti, mediante l'utilizzo di biosensori, cromatografia su strato sottile e spettrometria di massa, è stato dimostrato che *Pss* e *Et* producono gli stessi AHL: C6-3-oxo- e C8-3oxo-HSL; *Pag*: C4- e C6-HSL; *Eo*: C6- e C8-HSL (Hosni, 2010; Hosni *et al*., 2011). In *Pss*, *Et* e *Pag* sono stati clonati i geni omologhi di *luxI* e *luxR* (*pssI* e *pssR*; *etoI* e *etoR*; *pagI* e *pagR*) e sono stati ottenuti i relativi mutanti *knock-out*. Tutti i mutanti mostravano una ridotta produzione di polisaccaridi extracellulari; i mutanti *pssI*$^-$ e *pssR*$^-$ di *Pss* mostravano una drastica riduzione della loro virulenza quando inoculati in piante di olivo. Sia *Pss* sia gli endofiti esaminati possiedono il sistema QS-AHL, che nel caso di *Pss* è coinvolto nell'espressione della sua virulenza.

Obiettivo 3

Dalla co-inoculazione in olivo del mutante *Pss*I$^-$ e del ceppo selvatico di *Et* risulta che il mutante era in grado di indurre la formazione di tubercoli che per dimensione non erano differenti da quelli ottenuti con il ceppo selvatico di *Pss*. Quando, invece, la co-inoculazione era effettuata con il ceppo selvatico di *Pag*, *Pss*I$^-$ produceva tubercoli di dimensioni più piccole rispetto al ceppo selvatico di *Pss*. Co-inoculando i mutanti *EtI*$^-$ o *PagI*$^-$ con il mutante *PssI*$^-$ non si aveva nessun effetto sulla formazione del tubercolo confermando che la comunicazione interspecie è mediata dagli AHL.

Il mutante *PssR*$^-$, non veniva complementato da *Et* e *Pag* probabilmente perché tale mutante non risponde agli AHL. *Pss* e *Et* comunicano tra di loro mediante il sistema QS-AHL e lo stesso "linguaggio", considerato che producono i medesimi AHL.

Obiettivo 4

I ceppi DAPP-PG 729, 731 e 734 di *Pag* sono in grado di produrre IAA *in vitro* (Hosni, 2010) e, come riportato in tabella 1, possiedono i geni coinvolti nella sua biosintesi secondo la via dell'indol-3-acetammide, la stessa via utilizzata da *Pss*. Gli stessi ceppi possiedono il gene *iaaL*, il cui prodotto coniuga la lisina con l'IAA e quindi sono in grado di trasformare il fitormone in una forma più stabile. Inoltre, il ceppo DAPP-PG 731 possiede il gene *ptz* necessario per la sintesi delle citochinine, mentre DAPP-PG 734 contiene nel suo genoma il gene *hrcC* del cluster genico *hrp*/*hrc*, che nei batteri fitopatogeni biotrofi Gram

Tab. 1 - Presenza dei geni *iaaM*, *iaaH* e *iaaL*, coinvolti nella metabolismo dell'IAA, del gene *ptz*, coinvolto nella sintesi delle citochinine e dei geni *hrcC* e *hrcJ* del cluster *hrp/hrc* nel genoma di 3 ceppi di *Pantoea agglomerans* isolati da tubercoli di olivo e del ceppo tipo della stessa specie batterica.
Tab. 1 - Presence of iaaM, iaaH *and* iaaL *genes, involved in the IAA metabolism,* ptz *gene, involved in the cytokinin biosynthesis, and* hrcC *and* hrcJ *genes of the* hrc/hrp *cluster in the genome of 3 strains of* Pantoea agglomerans *isolated from olive knots and the type strain of the same species.*

Ceppo	Acido indol acetico			Citochinine	Cluster *hrp/hrc*	
	iaaM	*iaaH*	*iaaL*	*ptz*	*hrcC*	*hrcJ*
DAPP-PG 729	+	+	+	-	-	-
DAPP-PG 731	+	+	+	+	-	-
DAPP-PG 734	+	+	+	-	+	-
CFBP 3845^T	-	-	-	-	-	-

negativi è responsabile della patogenicità e dell'induzione di HR nelle piante non ospiti o resistenti. La morte cellulare indotta dai ceppi di *Pag* in foglie di tabacco sembra essere dovuta a HR in quanto i brodi colturali infiltrati nella solanacea non inducono morte cellulare. Sulla base di questi risultati si può ipotizzare che il ceppo DAPP-PG 734 di *Pag* abbia acquisito per trasferimento orizzontale alcuni tratti genetici di *Pss* e in particolare il gene *hrcC*. Ulteriori indagini sono necessarie per dimostrare questa ipotesi.

Conclusioni

In conclusione si può affermare che nel tubercolo di olivo si forma un consorzio stabile tra *Pss* e i batteri endofiti oggetto di tale studio, che modula la gravità della malattia. In questa particolare nicchia ecologica, i batteri endofiti esaminati potrebbero aver acquisito, per trasferimento orizzontale, tratti genetici di *Pss*. Questa ipotesi sembra essere supportata dal fatto che un ceppo di *Pag* è in grado di indurre HR e possiede il gene *hrcC*.

Riassunto

La rogna dell'olivo, causata da *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (*Pss*), si manifesta con la comparsa di tubercoli su tutte le parti epigee della pianta, generati principalmente dall'acido indol acetico (IAA) e dalle citochinine prodotte dal batterio. Oltre che per *Pss*, i tubercoli rappresentano una nicchia ecologica favorevole per lo sviluppo endofitico di alcune enterobatteriacee non fitopatogene, *Pantoea agglomerans* (*Pag*), *Erwinia toletana* (*Et*) e *Erwinia oleae* (*Eo*), sul cui ruolo nello sviluppo della malattia si è focalizzata la nostra attenzione. Dall'inoculazione di piante di olivo con *Pss* in combinazione con le tre enterobatteriacee è emerso che quest'ultime incrementano la gravità della malattia e che la crescita *in planta* di *Pss* viene stimolata dalla presenza di *Et* e *Eo* e repressa da *Pag*. Inoltre, abbiamo dimostrato che *Pss* e le tre specie endofite in esame possiedono un sistema di comunicazione di tipo *quorum sensing* (QS) mediato da acil-omoserina-lattoni (AHL). Mediante l'impiego di biosensori per AHL, è stato stabilito che: *Pss* e *Et* producono, C_6-3-oxo-HSL e C_8-3-oxo-HSL; *Pag*, C_4-HSL e C_6-HSL; *Eo*, C_6-HSL e C_8-HSL. L'ottenimento di mutanti *knockout* di *Pss* per i geni coinvolti nel QS ha permesso di stabilire che il QS regola la virulenza del batterio e che *Et*, poiché produce gli stessi AHL di *Pss*, è in grado di ripristinare *in planta* la virulenza dei mutanti di *Pss*. Le nostre indagini dimostrano che nella nicchia ecologica del tubercolo il consorzio di batteri esaminato ha instaurato rapporti stabili di cooperazione, basati su un complesso processo di intercomunicazione tra specie batteriche. Tutti i ceppi di *Pag* (DAPP-PG 729, 731 e 734) isolati da tubercoli di olivo possiedono i geni *iaaM*, *iaaH* e *iaaL*, coinvolti nel metabolismo dell'IAA; il ceppo DAPP-PG 731 ha il gene *ptz*, coinvolto nella sintesi delle citochinine; il ceppo DAPP-PG 734 possiede il gene *hrcC* appartenente al cluster *hrp*/*hrc*. Il fatto che i ceppi di *Pag* abbiano la stessa via metabolica di *Pss* per la produzione di IAA e che uno di questi possiede un gene del cluster *hrp*/*hrc*, fa ipotizzare che i ceppi di *Pag* potrebbero aver acquisito per trasferimento orizzontale tratti genetici da *Pss*.

Parole chiave: rogna dell'olivo, comunità batteriche, *Quorum sensing*, acil-omoserina-lattoni (AHL).

Bibliografia

Fuqua W.C., Winans S.C., Greenberg E.P. 1994. *Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell densityresponsive transcriptional regulators*. J. Bacteriology, 176: 269-75.

Fuqua C., Parsek M.R. and Greenberg E.P. 2001. *Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing*. Annual Review of Genetics, 35: 439-468.

Hosni T., 2010. *Interaction between* Pseudomonas savastanoi *pv.* savastanoi, *the casual agent of olive knot, and the endophytic bacterial species associated with the knot.* Tesi di Dottorato.

Hosni T., Moretti C., Devescovi G., Suarez-Moreno Z.R., MBarek F., Guarnaccia C., Pongor S., Onofri A., Buonaurio R., Venturi V. 2011. *Sharing of quorum-sensing signals and role of interspecies communities in a bacterial plant disease*. The ISME Journal, 5: 1857-1870.

Marchi, G., Sisto, A., Cimmino, A., Andolfi, A., Cipriani, M.G., Evidente, A., Surico, G. 2006. *Interaction between* Pseudomonas savastanoi *pv.* savastanoi *and* Pantoea agglomerans *in olive knots*. Plant Pathology, 55 (5): 614-624.

Moretti C., Hosni T., Vandemeulebroecke K., De Vos P., Buonaurio R., Cleenwerck I. 2011. Erwinia oleae *sp. nov., isolated from olive knots caused by* Pseudomonas savastanoi *pv.* savastanoi. Int. J. System. Evol. Microbiol., 61: 2745-2752.

Ouzari H., Khsairi A., Raddadi N., Jaoua L., Hassen A., Zarrouk M., Daffonchio D., Boudabous, A. 2008. *Diversity of auxinproducing bacteria associated to* Pseudomonas savastanoi-*induced olive knots*. J. Basic Microbiol., 48: 370-377.

Rodríguez-Palenzuela P., Matas I.M., Murillo J., López-Solanilla E., Bardaji L., Pérez-Martínez I., Rodríguez-Moskera M.E., Penyalver R., López M.M., Quesada J.M., Biehl B.S., Perna N.T., Glasner J.D., Cabot E.L., Neeno-Eckwall E., Ramos C. 2010. *Annotation and overview of the* Pseudomonas savastanoi *pv.* savastanoi *NCPPB 3335 draft genome reveals the virulence gene complement of a tumour-inducing pathogen of woody hosts*. Environmental Microbiology, 12: 1604-1620.

Rojas A.M., de los Rios J.E.G., Fischer-Le Saux M., Jimenez P., Reche P., Bonneau S., Sutra L., Mathieu-Daude F., and McClelland M. 2004. Erwinia toletana *sp. nov., associated with* Pseudomonas savastanoi-*induced tree knots*. Int. J. Systematic and Evol. Microbiol., 54: 2217-2222.

von Bodman S. B., Bauer W.D. and Coplin D.L. 2003. *Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria*. Annual Review of Phytopathology, 41:455-482.

Young, J.M. 2004. *Olive knot and its pathogens*. Australasian Plant Pathology, 33: 33-39.

Acta Italus Hortus 10: 233-235

Effetto della rogna dell'olivo sulla qualità dell'olio

Keciri S., Tombesi S., Moretti C., Tombesi A. e Buonaurio R.*
Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali, Università di Perugia

Olive knot effect on olive oil quality

Abstract. Although olive knot, caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, is a well studied disease, its effect on olive oil quality, as perceived by consumer, is still unclear. In the present preliminary study, carried out in 2010, the effect of the olive knot disease on the quality of olive oils, obtained from healthy and naturally infected trees (cv. Frantoio) at two disease severity levels (medium and high) and grown in two different Italian locations (Monte Tezio and Monticchio, Perugia), was investigated. The average fruit yield per tree was significantly lower in Monticchio location respect to those recorded in Monte Tezio. Although fruit yield was lower in infected trees with high disease severity respect to healthy trees, the reductions were not statistically significant. Fruit weight and dry matter content did not change among healthy and infected trees. The infection did not provoke change in oil acidity, peroxide number and phenol content. All oil samples resulted of good quality at the panel test. These results suggest that olive knot did not affect olive oil quality as perceived by consumer. However, more studies are needed in order to support this hypotesis both under controlled environment and under field conditions.

Key words: olive knot disease, oil quality.

Introduzione

La qualità è uno dei fattori determinanti il valore commerciale dell'olio di oliva, che può essere influenzata da fattori tecnologici, colturali e fitosanitari (Quesada *et al*., 2010a; Quesada *et al*., 2010b). Lo stato fitosanitario di un oliveto assume particolare importanza in zone di coltivazione dove, a causa di fattori climatici avversi, si registrano notevoli attacchi di agenti di origine biotica (fitofagi, virus, batteri e funghi). Tra le malattie batteriche, quella più importante è la rogna dell'olivo, causata da *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (*Pss*), che si manifesta con escrescenze denominate tubercoli, di forma irregolare, sferoidale e di diametro variabile da pochi millimetri a diversi centimetri. La formazione dei tubercoli è dovuta alla produzione di acido indol acetico e citochinine da parte del batterio (Surico *et al.*, 1985) ed è regolata dal sistema di *quorum sensing* (Hosni *et al*., 2011). Il patogeno, che beneficia di temperature comprese tra 23 e 25 °C ed umidità relativa elevata (Quesada *et al*., 2010), è particolarmente pericoloso in climi freschi e soggetti a nebbie mattutine, quali possono essere quelli umbri, e in caso di varietà di olivo suscettibili. I principali danni causati dal batterio consistono nella defogliazione e disseccamento dei rametti con conseguente perdita di produzione a causa della sottrazione di sostanze nutritive alla pianta.

E' noto che la malattia provoca una riduzione della produzione, ma non è stato sufficientemente dimostrato se incida sulla qualità dell'olio (Schroth, 1973; Osman *et al.,* 1980; Quesada *et al*., 2010b). Per tale ragione, lo scopo del presente lavoro è stato quello di chiarire anche se in via preliminare se la rogna dell'olivo influisce sulla qualità dell'olio, in maniera percepibile dal consumatore.

Materiali e metodi

L'effetto delle infezioni di *Pss* sulla qualità dell'olio di oliva è stato saggiato sulla cv Frantoio, che viene considerata all'interno del panorama varietale umbro tra le più suscettibili a questo patogeno. Sono stati presi in considerazione due impianti situati nella provincia di Perugia: uno presso Monticchio nel comune di Deruta e l'altro presso Monte Tezio, Pieve Petroia, nel comune di Perugia.

Durante il mese di ottobre 2010, per ogni località, sono state scelte 9 piante: 3 sane; 3 con un grado d'infezione intermedio (tubercoli evidenti solo su branchette di grado superiore al 4°); 3 piante con un grado d'infezione elevato (tubercoli evidenti su tutte le parti legnose della pianta). Per ogni pianta è stato raccolto un campione di circa 2 Kg di olive; da questo sono stati prelevati 100 frutti e ne è stata determinata la percentuale di sostanza secca, mediante essiccamento in stufa ventilata a 105° C, fino a peso costante.

L'estrazione dell'olio è stata effettuata entro 24 ore dalla raccolta con un piccolo frantoio composto da un

* buonaurio@unipg.it

frangitore, una gramola a 3 poste e una centrifuga. L'olio è stato filtrato, trasferito in bottiglie di vetro scuro e conservato a circa 7 ° C in attesa delle analisi.

Per valutare la produzione in olive, la raccolta sugli alberi è stata effettuata durante il mese di dicembre e per ogni albero è stata pesata la quantità di olive prodotte. Sugli oli ottenuti sono stati analizzati l'acidità libera, il numero dei perossidi ed i polifenoli totali. I campioni sono stati poi sottoposti a panel test.

Risultati e discussione

La produzione di olive per pianta era più bassa nelle piante con infezioni più gravi, probabilmente a causa dell'effetto debilitante della malattia ed è stata osservata una significativa variazione di produzione nei due siti di coltivazione (fig. 1a). Le minori produzioni registrate nel sito di Monticchio sono da attribuirsi ad un eccessivo vigore delle piante e conseguente defogliazione della parte basale della chioma a causa dell'ombreggiamento reciproco. La parte produttiva della chioma era limitata alla zona apicale con conseguente limitazione delle potenzialità produttive di ciascuna pianta. Per il peso medio delle drupe non si riscontravano differenze significative tra le piante sane e le piante infette nei due siti di produzione (dati non riportati). Nel sito di Monticchio, il contenuto in sostanza secca delle drupe risultava molto simile tra le piante sane ed infette (dati non riportati). Variazioni maggiori sono state invece osservate nel sito di Monte Tezio, dove la presenza di scheletro nel terreno era maggiore e quindi la disponibilità di acqua poteva essere maggiormente variabile.

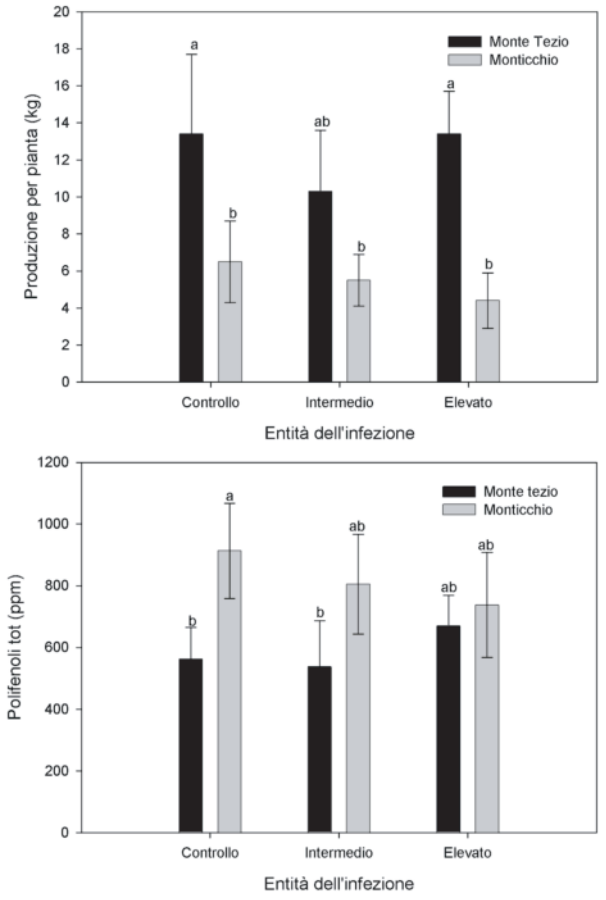

Fig. 1 - Effetto di infezioni intermedie e gravi di *P. savastanoi* pv. *savastanoi* sulla produzione di olive (Kg per pianta) (A) e sul contenuto in polifenoli totali negli oli (ppm) (B) . Medie seguite da lettere differenti sono diverse per P>0,95 (Tukey test).

Fig. 1 - Effect of intermediate and severe P. savastanoi *pv.* savastanoi *infections on olive yield (Kg per tree)(A) and on total phenol content in the oils (ppm) (B). Means with different letters are significantly different at P>0.95 (Tukey test).*

L'acidità libera ed il numero di perossidi degli oli ottenuti non variava significativamente né tra i siti né tra le piante analizzate (tabella 1). Il contenuto in polifenoli è risultato medio-elevato in tutti i campioni (fig. 1b) e non sono state rilevate differenze significative tra i campioni ottenuti da piante infette e da quelle controllo. Da notare che nei campioni prelevati nel sito di Monticchio si registravano contenuti in polifenoli leggermente più elevati probabilmente a causa della minor produzione per pianta.

All'assaggio tutti gli oli erano di buona qualità e abbastanza bilanciati, con forti sentori di amaro e di piccante, caratteristici della cv. Frantoio e dell'epoca di raccolta abbastanza precoce (fig. 2). Nel sito di Monticchio, gli oli ottenuti da piante infette erano leggermente meno amari, ma dotati di sentori di frutta più intensi rispetto agli oli ottenuti da piante non infette. Il contrario emergeva nel sito di Monte Tezio, dove gli oli ottenuti da piante infette erano caratterizzati da sensazioni di amaro e fruttato leggermente più intense rispetto al controllo. Questi dati suggeriscono la forte incidenza del fattore ambientale sulle caratteristiche sensoriali dell'olio.

Tab. 1 - Acidità (% di acido oleico) e numero dei perossidi (meq di O_2 attivo per kg di olio) degli oli ottenuti da piante di olivo (cv Frantoio) infette e non da *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* con grado intermedio ed elevato di infezione e coltivate in due località umbre.

Tab. 1 - Acidity (% oleic acid) an peroxide number (O_2 meq/kg) of oils obtained from infected (high and intermediate) and non-infected olive plants (cv Frantoio).

Località	Grado d'infezione	% di acidità*	N. perossidi*
Monte Tezio	Controllo	0,18 ± 0 a	5,5 ± 0,76 B
	Intermedio	0,2 ± 0 a	5,3 ± 0,33 B
	Elevato	0,23 ± 0,02 a	5,7 ± 0,44 B
Monticchio	Controllo	0,29 ± 0,02 a	5,2 ± 0,44 B
	Intermedio	0,31 ± 0 a	5,8 ± 0,2 B
	Elevato	0,33 ± 0,02 a	6,7 ± 0,33 A

* Ogni valore è rappresentato dalla media di tre ripetizioni (n=3) ± l'errore standard. Medie con lettere differenti sono diverse per P>0,95 (minuscole) o per P>0,99 (maiuscole) (Tukey test).

Fig. 2 - Profilo sensoriale degli oli ottenuti da piante di olivo (cv Frantoio) sane ed infette da *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (grado d'infezione intermedio ed elevato) coltivate in due località. Ogni valore è rappresentato dalla media di tre ripetizioni.
Fig. 2 - Sensory profiles of oils obtained from healthy and infected olive (cv. Frantoio) trees (with high and intermediate severity index) with Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi*. Each value is the mean of 3 replicates.*

Conclusioni

Considerando i principali parametri qualitativi di carattere analitico-sensoriale è possibile concludere che le piante di olivo con sintomi di rogna non mostrano un effetto diretto della malattia sulle caratteristiche dell'olio percepibili dal consumatore. Nel corso delle prove effettuate è risultato che né le principali caratteristiche chimiche (quali acidità libera, contenuto in perossidi e contenuto in polifenoli) né le caratteristiche sensoriali (saggiate tramite panel test) vengono chiaramente influenzate dalla malattia. Ciò non esclude che l'infezione di *Pss* possa influire sul metabolismo di singoli composti coinvolti nella costituzione del profilo sensoriale dell'olio. Ulteriori studi sono necessari per verificare se a livello sensoriale sia possibile rilevare l'effetto dell'infezione sulla qualità dell'olio.

Riassunto

Nonostante la rogna dell'olivo, causata da *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, sia oggetto di molti studi, non è stato ancora chiarito quale sia l'effetto della batteriosi sulla qualità dell'olio potenzialmente percepibile dal consumatore. Nel presente lavoro, condotto in via preliminare nell'annata 2010, è stato investigato l'effetto della malattia sulla qualità dell'olio, ottenuto da piante di olivo (cv Frantoio), coltivate in due località della provincia di Perugia (Monte Tezio e Monticchio), con infezioni naturali di media e grave entità. Nel sito di Monticchio la produzione media di olive per pianta era significativamente più bassa (circa la metà) rispetto al sito di Monte Tezio. Sebbene nelle piante con infezioni più gravi si registrassero produzioni tendenzialmente più basse, queste non erano statisticamente significative rispetto al controllo non infetto. Anche per il peso medio delle drupe e il loro contenuto in sostanza secca non si rilevavano differenze significative tra le piante infette e quelle sane. L'infezione non provocava variazioni dell'acidità, del numero dei perossidi e del contenuto in polifenoli degli oli ottenuti. All'assaggio tutti gli oli risultavano di buona qualità. Sebbene i presenti risultati indichino che la rogna non ha influenzato la qualità dell'olio, altre indagini in ambiente controllato ed in pieno campo sono necessarie per studiare ulteriormente l'effetto.

Parole chiave: rogna dell'olivo, qualità dell'olio.

Bibliografia

Hosni T., Moretti C., Devescovi G., Suarez-Moreno Z.R., Fatmi M., Guarnaccia C., Pongor S., Onofri A., Buonaurio R., Venturi V., 2011. *Sharing of quorum-sensing signals and role of interspecies communities in a bacterial plant disease*. The ISME Journal, 5: 1857-1870.

Osman W.A., Tarabeih A.M., Michail S.H., 1980. *Studies on olive knot disease in Iraq with reference to response of different cultivars*. Mesopotamia J. Agr., 15: 245-261.

Quesada J.M., Penyalver R., Perez-Panades J., Salcedo C.I., Carbonell E.A., Lopez M.M., 2010a. *Comparison of chemical treatments for reducing epiphytic* Pseudomonas savastanoi *pv.* savastanoi *populations and for improving subsequent control of olive knot disease*. Crop Protection, 29:1413-1420.

Quesada J.M., Penyalver R., Perez-Panades J., Salcedo C.I., Carbonell E.A., Lopez M.M., 2010b. *Dissemination of* Pseudomonas savastanoi *pv.* savastanoi *populations and subsequent appearance of olive knot disease*. Plant Pathol., 59: 262-269.

Schroth M.N., Osgood J.W., Miller T.D., 1973. *Quantitative assessment of the effect of the olive knot disease on olive yield and quality*. Phytopathol., 63:1064-1065.

Surico G., Iacobellis N.S., Sisto A., 1985. *Studies on the role of indole-3-acetic acid and cytokinins in the formation of knots on olive and oleander plants by* Pseudomonas syringae *pv.* savastanoi. Physiol. Plant Path., 26: 309-320.