



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CAGLIARI**

*Dipartimento di Biologia Sperimentale*

*Sezione di Fisiologia Generale*

**Dottorato di Ricerca in Scienze Morfologiche  
Ciclo XXIII**

**Utilizzo di tecniche elettrofisiologiche e comportamentali  
indirizzate al controllo eco-compatibile di popolazioni di  
insetti di interesse ambientale, sanitario e agronomico**

Settore scientifico disciplinare di afferenza: BIO/09

Tesi di Dottorato di:  
Dott. Nicola Altea

Tutor:  
Prof.ssa Anna Maria Liscia

Coordinatore del Dottorato:  
Prof.ssa Valeria Sogos

Esame finale anno accademico 2009 - 2010

# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE</b>	pag.	1
1.1.1 Organizzazione morfologica dei chemorecettori negli insetti	pag.	2
1.1.2 Struttura dei chemosensilli	pag.	3
1.1.3 Formazioni cuticolari esterne	pag.	3
1.1.4 Neuroni sensoriali	pag.	4
<b>1.2 CHEMORECEZIONE OLFATTIVA NEGLI INSETTI</b>	pag.	5
1.2.1 Fisiologia dell'olfatto negli insetti	pag.	5
1.2.2 Variazioni di sensibilità nei chemorecettori olfattivi	pag.	6
1.2.3 Meccanismi di trasduzione olfattoria	pag.	7
<b>2. TECNICHE ELETTROFISIOLOGICHE E COMPORTAMENTALI</b>	pag.	8
<b>2.1 TECNICHE ELETTROFISIOLOGICHE</b>	pag.	9
2.1.1 Tecnica di derivazione ad elettroantennogramma (EAG) e ad elettroabdomengramma (EAbG)	pag.	9
2.1.2 Apparato di stimolazione olfattiva	pag.	10
2.1.3 Significato ed interpretazione dell'elettroantennogramma (EAG) e dell'elettroabdomengramma (EAbG)	pag.	11
2.1.4 Tecnica di derivazione a Single Cell (SC)	pag.	12
<b>2.2 STUDI COMPORTAMENTALI</b>	pag.	13
<b>3. INSETTI DI INTERESSE AMBIENTALE (<i>L.dispar</i>), SANITARIO (<i>C. imicola</i>) ED AGRONOMICO (<i>C. capitata</i>) OGGETTO DEL MIO STUDIO</b>	pag.	13
<b>3.1 <i>Lymantria dispar</i> L.</b>	pag.	13
3.1.1 Impatto ambientale del lepidottero <i>L. dispar</i> L. in Sardegna	pag.	13
3.1.2 Il feromone sessuale in <i>Lymantria dispar</i> L.	pag.	15
3.1.3 Ciclo biologico del lepidottero <i>Lymantria dispar</i> L.	pag.	18
<b>3.2 <i>Culicoides imicola</i> K.</b>	pag.	20
3.2.1 Impatto ambientale dell'insetto <i>Culicoides imicola</i>	pag.	20

3.2.2	Ciclo biologico dell'insetto <i>Culicoides imicola</i>	pag.	21
3.2.3	Strategie di controllo attualmente in uso	pag.	22
<b>3.3</b>	<b><i>Ceratitis capitata</i> W.</b>	pag.	23
3.3.1	Impatto ambientale dell'insetto <i>Ceratitis capitata</i>	pag.	23
3.3.2	Ciclo biologico di <i>Ceratitis capitata</i>	pag.	28
3.3.3	Strategie di controllo	pag.	29
<b>4.</b>	<b><i>Lymantria dispar</i> L.</b>	pag.	31
<b>4.1.</b>	<b>SCOPO DELLA RICERCA</b>	pag.	31
<b>4.2.</b>	<b>MATERIALI E METODI</b>	pag.	32
4.2.1	Insetti	pag.	32
4.2.2	Stimoli chimici impiegati	pag.	32
<b>4.3</b>	<b>RISULTATI</b>	pag.	33
<b>4.4</b>	<b>DISCUSSIONE E CONCLUSIONI</b>	pag.	41
<b>4.5</b>	<b>ABSTRACT</b>	pag.	42
<b>4.6</b>	<b>COMUNICAZIONE DEI RISULTATI</b>	pag.	43
<b>5.</b>	<b><i>Culicoides imicola</i> K.</b>	pag.	44
<b>5.1</b>	<b>SCOPO DELLA RICERCA</b>	pag.	44
<b>5.2</b>	<b>MATERIALI E METODI</b>	pag.	44
5.2.1	Insetti	pag.	44
5.2.2	Microscopia Elettronica a Scansione	pag.	45
5.2.3	Soluzioni stimolanti	pag.	45
5.2.4	Esperimenti comportamentali	pag.	46
<b>5.3</b>	<b>RISULTATI</b>	pag.	47
5.3.1	Risultati morfologici	pag.	47
5.3.2	Risultati elettrofisiologici	pag.	48
5.3.3	Risultati comportamentali	pag.	49
<b>5.4</b>	<b>DISCUSSIONE E CONCLUSIONI</b>	pag.	50

<b>5.5 ABSTRACT</b>	pag.	53
<b>5.6 COMUNICAZIONE DEI RISULTATI</b>	pag.	54
<b>6. <i>Ceratitis capitata</i> W.</b>	pag.	54
<b>6.1 SCOPO DELLA RICERCA</b>	pag.	54
<b>6.2 MATERIALI E METODI</b>	pag.	55
6.2.1 Insetti	pag.	55
6.2.2 Stimoli impiegati	pag.	55
6.2.3 Esperimenti comportamentali	pag.	56
<b>6.3 RISULTATI</b>	pag.	56
6.3.1 Risultati morfologici	pag.	56
6.3.2 Risultati elettrofisiologici	pag.	57
6.3.3 Risultati comportamentali	pag.	58
<b>6.4 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI</b>	pag.	58
<b>6.5 ABSTRACT</b>	pag.	59
<b>6.6 COMUNICAZIONE DEI RISULTATI</b>	pag.	60
<b>7. CONCLUSIONI GENERALI</b>	pag.	61
<b>8. BIBLIOGRAFIA</b>	pag.	62
<b>9. FIGURE E TABELLE</b>	pag.	70

# 1. INTRODUZIONE

Nel campo del controllo degli insetti dannosi, particolare interesse assume lo studio e la sperimentazione di strategie innovative di difesa, basate sull'uso di sostanze naturali o derivati sintetici come feromoni, composti semiochimici, bioregolatori, ecc., che consentono di manipolare il comportamento e/o la fisiologia degli insetti bersaglio. Tali strategie hanno il vantaggio di essere altamente specifiche, e di avere un basso impatto ambientale. La messa a punto di tali tecniche risulta complessa e non può prescindere da una conoscenza approfondita dei meccanismi neurali che controllano le risposte comportamentali a differenti stimoli di natura chimica o fisica, che sono alla base di funzioni importanti come la riproduzione (richiamo o ricerca del partner) e l'assunzione di cibo (energia) dall'ambiente da parte dell'insetto bersaglio.

E' noto che le risposte comportamentali degli insetti nei confronti dell'ambiente circostante, come nel caso di altri animali, dipendono in modo determinante dall'input neurale proveniente dai loro sensi chimici. Attività come la ricerca e il riconoscimento di fonti di cibo e di substrati di ovideposizione, ma anche il rilevamento di individui conspecifici in relazione a comportamenti di gruppo o per l'accoppiamento e il rilevamento di potenziali predatori richiedono in diversa misura la mediazione della chemorecezione gustativa e/o olfattiva. Lo studio delle modalità funzionali alla base della chemorecezione negli insetti ha focalizzato l'interesse dei ricercatori su svariati argomenti e con diversi metodi d'indagine: in questo contesto i chemorecettori del sistema olfattivo dei Lepidotteri (Lymantriidi) e dei Ditteri (Calliforidi) si annoverano fra i sistemi chemosensoriali più studiati negli invertebrati in relazione alle strategie di identificazione, scelta e assunzione di cibo e degli individui conspecifici per l'accoppiamento (Hansen, 1978).

Molti di questi studi sono finalizzati all'analisi delle modalità funzionali di tali chemorecettori, con particolare riguardo alla specificità di risposta ed all'ambito di sensibilità a stimoli diversi, con lo scopo ultimo di determinare il codice neurale impiegato per la trasmissione dell'informazione chimica dalla periferia ai centri nervosi in diverse situazioni ambientali ed in diversi stati fisiologici. Infatti, sebbene si sia a lungo ritenuto che l'attività recettoriale dipendesse unicamente dalle caratteristiche dello stimolo, un numero sempre maggiore di studi ha indicato

che esse potevano variare con lo stadio di sviluppo, la storia alimentare e/o lo stato fisiologico dell'insetto. La variabilità di un dato "input" sensoriale verso il SNC, in condizioni costanti di stimolazione, potrebbe infatti dipendere da cambiamenti nell'accessibilità degli stimoli alle cellule recettoriali o da variazioni di sensibilità dei chemorecettori stessi.

### *1.1.1 Organizzazione morfologica dei chemorecettori negli insetti*

I chemorecettori vengono definiti come cellule recettoriali specificamente sensibili a sostanze chimiche e con il termine di chemorecezione si intendono tutti i processi fisiologici prodotti da una stimolazione chimica.

Negli insetti la chemorecezione è un processo sensoriale che evoca per via riflessa un'ampia varietà di risposte comportamentali, come la ricerca delle fonti di cibo, la scelta dell'habitat, la ricerca degli individui di sesso opposto per l'accoppiamento, del luogo adatto per l'ovideposizione, il riconoscimento di individui conspecifici ed eterospecifici, le reazioni alle sostanze attraenti o repellenti sia artificiali che naturali.

I chemocettori vengono classificati fondamentalmente in due categorie:

- ✓ *Chemorecettori olfattivi*, che rispondono a sostanze chimiche in fase gassosa che diffondono nell'aria, dalla sorgente sino a raggiungere la membrana del chemorecettore stesso per diffusione o trasporto in fase liquida (chemorecettori a distanza).
- ✓ *Chemorecettori gustativi*, che rispondono a sostanze in fase liquida o presenti in soluzione acquosa (chemorecettori per contatto).

Negli insetti i chemocettori, olfattori o gustativi, sono contenuti in particolari estroflessioni cuticolari chiamate chemosensilli, che protrudendo nello spazio al di fuori della superficie corporea, facilitano la raccolta di stimoli sia in fase gassosa che liquida.

Tuttavia la distinzione tra chemocettori olfattori e gustativi, fatta tenendo conto della morfologia, del tipo di risposta e della locazione dei sensilli contenenti i chemocettori, non è sempre così netta.

### *1.1.2 Struttura dei chemosensilli*

Un tipico chemosensillo in un insetto risulta costituito da (Fig.1):

- formazioni cuticolari esterne;
- neuroni sensoriali bipolari (cellule chemorecetttrici) in numero variabile;
- cellule di rivestimento o di sostegno (cellule accessorie), di solito 3 o 4;

Tutti questi componenti sono di origine ectodermica (McIver, 1975; Slifer, 1970)

### *1.1.3 Formazioni cuticolari esterne*

All'osservazione superficiale, i chemosensilli si presentano come specializzazioni cuticolari di diversa conformazione: peli, spine, placche, cupole, liberi in superficie o affondati in fossette più o meno profonde.

Queste strutture, se da un lato proteggono i dendriti dei neuroni sensoriali, dall'altro permettono ai dendriti stessi di captare le variazioni della composizione chimica dell'ambiente esterno per mezzo di aperture transcuticolari.

I chemosensilli sono stati dapprima classificati in funzione della forma esterna e delle modalità di inserzione sulla superficie corporea ad esempio sensilli tricoidei, se a forma di pelo talora infossato in un alveolo; sensilli basiconici, se a forma di cono o di paraboloide; sensilli celoconici, se a forma di conoide più o meno alto affondato in una fossetta di modeste profondità; sensilli campaniformi, se a forma di cupola a sesto più o meno rialzato; sensilli placoidei, se a forma di placca variamente sagomata (Fig. 2).

Essi sono stati anche suddivisi in due categorie, che si differenziano per lo spessore e la porosità del rivestimento cuticolare: chemosensilli a parete sottile e chemosensilli a parete spessa (Slifer, 1970).

Mediante la microscopia elettronica, sia a scansione (SEM) che a trasmissione (TEM), si è potuta evidenziare una notevole gradualità di transizioni nella forma, nella struttura interna e nella conformazione esterna dei diversi chemosensilli. Su questa base, una classificazione relativamente semplice è stata proposta da Altner e Zacharuk (1980):

- chemosensilli forniti di un solo poro apicale (TP), che contengono per lo più chemorecettori per contatto (gustativi);

- chemosensilli a più pori (WP), con parete semplice o doppia con funzione principalmente olfattoria;
- chemosensilli senza pori (NP), che contengono igrocettori e/o termocettori.

#### *1.1.4 Neuroni sensoriali*

I chemocettori dei sensilli cuticolari degli insetti sono sempre neuroni sensoriali bipolari, con il soma cellulare situato generalmente nell'epidermide, oppure nei suoi pressi, da cui si prolunga prossimalmente un assone e distalmente un dendrite. In essi si può notare un nucleo grande e rotondeggiante con cromatina finemente dispersa, indice probabile di una intensa attività metabolica, mentre nel citoplasma si evidenziano mitocondri, corpi del Golgi, reticolo endoplasmatico rugoso, ribosomi liberi, vescicole, microtubuli e microfibrille immersi in una matrice densa. Il numero dei neuroni sensoriali presente nel sistema olfattivo non è costante, sia in uno stesso tipo di sensillo, che in tipi diversi. Per esempio, i sensilli TP di solito contengono 3-6 neuroni, uno dei quali è spesso un meccanocettore; esistono inoltre sensilli con un unico neurone chemosensoriale ed uno meccanosensoriale e si possono anche osservare sensilli con dieci neuroni chemosensoriali.

Sulla base delle loro proprietà bioelettriche, tali neuroni bipolari a funzione chemorecettoriale presentano, durante la loro attività, due tipi principali di variazioni elettriche transmembranalari:

- variazioni elettriche graduate (potenziali del recettore o potenziali generatori), si generano nella porzione chemorecettoriale dei dendriti da cui invadono passivamente e con decremento l'asse dei dendriti fino al soma del neurone sensoriale;

- variazioni elettriche "tutto o nulla" (potenziali d'azione o spike), che insorgono nella regione del soma dei neuroni sensoriali e si propagano attivamente senza decremento lungo gli assoni sensoriali diretti ai centri nervosi.

I potenziali elettrici nervosi che insorgono nei dendriti in seguito a stimolazione chimica (potenziali del recettore), determinano direttamente l'insorgenza degli impulsi "tutto o nulla" negli assoni afferenti; in ogni caso, l'attività elettrica

graduata precede nel tempo la scarica dei potenziali d'azione, la cui frequenza varia in funzione dell'ampiezza del potenziale generatore stesso.

Le cellule che costituiscono il sensillo, così come quelle epidermiche circostanti, sono interconnesse da complessi giunzionali che sigillano tutti gli spazi intercellulari tra il lato epidermale e quello emolinfatico. Per questa ragione, le cellule sensoriali dell'epidermide negli insetti si possono considerare dei recettori epiteliali.

## **1.2. CHEMORECEZIONE OLFATTIVA NEGLI INSETTI**

### *1.2.1 Fisiologia dell'olfatto negli insetti*

Tra le molecole in fase gassosa che costituiscono lo stimolo odoroso e il significato che l'organismo legge nel messaggio portato da queste molecole sono interposte strutture e meccanismi quali gli organi recettoriali, il processo di interazione stimolo-recettore e la trasmissione al sistema nervoso centrale (SNC) di un modello di impulsi nervosi che è in relazione con le caratteristiche delle molecole stimolanti. Rimane quasi completamente ignoto il modo in cui l'informazione in ingresso sia confrontata con quella immagazzinata nella memoria o predeterminata geneticamente, per poterne prevedere il significato comportamentale.

In che modo le molecole stimolanti vengono adsorbite sulla membrana delle cellule recettrici a partire dalla fase gassosa? In che modo un dato stimolo viene riconosciuto chimicamente e viene poi tradotto in un segnale nervoso? Con quali modalità l'intensità dello stimolo e le sue variazioni temporali vengono codificate nella risposta ad impulsi nervosi? Come vengono riconosciute complesse miscele di odori e come fa infine l'animale ad orientarsi verso una fonte di odore?

La capacità di rispondere, anche solo parzialmente, a queste domande presuppone la conoscenza di alcuni aspetti di base della fisiologia dell'olfatto degli insetti. Tali problematiche sono state già ampiamente studiate nei vertebrati, negli insetti e più recentemente nei crostacei.

Nel caso dei vertebrati l'aria passa attraverso le narici; la sezione trasversale e la velocità del flusso d'aria durante l'inspirazione determina un volume d'aria per

unità di tempo che può essere analizzata dal naso; l'equivalente delle narici nell'insetto è l'area perimetrale dell'antenna la quale in un lepidottero notturno può essere grande quanto la narice di un cane di piccola taglia (1-2 cm<sup>2</sup>).

L'inspirazione che produce il flusso d'aria corrisponde, nell'insetto, al movimento delle antenne alla velocità relativa del vento che aumenta durante il volo. Infatti alcuni lepidotteri notturni hanno una soglia olfattoria simile a quella riscontrata nei cani (10<sup>3</sup> molecole per cm<sup>3</sup> d'aria per una velocità del vento di circa 50 cm al secondo); l'antenna dei lepidotteri notturni ha però un numero di cellule olfattorie 100 volte inferiore (5x10<sup>4</sup>) rispetto alla mucosa del cane (5x10<sup>6</sup>), tanto da poter distinguere con tale sensibilità al massimo 2 o 3 feromoni sessuali.

Alcuni insetti possiedono una notevole abilità nel distinguere odori complessi oppure producono e/o riconoscono composti inodori all'uomo, come molti dei feromoni, e allo stesso modo riconoscono composti gassosi come la CO<sub>2</sub> e il vapore acqueo.

### *1.2.2 Variazioni di sensibilità nei chemorecettori olfattivi*

Gli apparati chemorecettoriali degli insetti, ed in particolare dei Ditteri e dei Lepidotteri, rappresentano senza dubbio alcuni tra i sistemi sensoriali meglio studiati negli Invertebrati. Gli studi sono prevalentemente mirati alla determinazione di parametri di sensibilità e specificità dei recettori, con lo scopo di comprendere il codice neurale che governa i diversi schemi di comportamento negli insetti in diverse situazioni ambientali e in diversi stati fisiologici.

Sebbene si sia a lungo ritenuto che l'attività recettoriale dipenda unicamente dalle caratteristiche dello stimolo, un numero sempre maggiore di studi indica che essa possa variare con lo stadio di sviluppo, la storia alimentare e/o lo stato fisiologico dell'insetto.

La variabilità di un dato "input" sensoriale al SNC in condizioni costanti di stimolazione può dipendere o da cambiamenti nell'accessibilità dei recettori agli stimoli o da variazioni di sensibilità dei chemorecettori stessi. E' d'altra parte possibile che le stesse cellule sensoriali, gustative od olfattorie, presentino variazioni di sensibilità (Davis, 1980; Omand, 1971; Palaniswamy et al., 1979).

### 1.2.3 Meccanismi di trasduzione olfattoria

Nel corso degli anni, sono stati condotti diversi studi che hanno portato alla costruzione di possibili modelli funzionali che stanno alla base dell'interazione tra i recettori chemosensoriali dei Lepidotteri ed i loro rispettivi feromoni sessuali. Sino al 2001, il modello più accreditato era il "redox model" (modello ad ossido-riduzione), modificato da Kaissling (2001) in "carrier-to-scavenger model" (modello del trasportatore-spazzino). Secondo il primo modello, il feromone presente nell'aria viene adsorbito in uno strato ceroso che ricopre la cuticola della superficie sensillare, penetrando al suo interno per mezzo di strutture "poro-canale". Nel lume del sensillo la molecola del feromone incontra tre possibili partners: le "Proteine Leganti il Feromone" (PBP – Pheromone Binding Proteins), più precisamente le forme ridotte  $PBP_{red}$  e quelle ossidate  $PBP_{ox}$ , e gli "Enzimi di degradazione". La forma ridotta lega circa il 99% delle molecole del feromone, quella ossidata circa lo 0,00001% ed il restante 1% circa delle molecole viene immediatamente degradata.

Solo la frazione di molecole legate alla  $PBP_{red}$  sarebbe in grado di interagire con i recettori; a questo proposito, secondo il modello, il 75% di Ph- $PBP_{red}$  subirebbe una redox verso Ph- $PBP_{ox}$ , dando così al 25% restante, la possibilità di interagire con i recettori. L'enzima in grado di effettuare lo "shift redox" non è stato ancora identificato. Il feromone viene quindi disattivato, sia dagli appositi enzimi degradanti che dal passaggio redox delle PBP dalla forma ridotta a quella ossidata. Inoltre, si ritiene che i complessi Ph- $PBP_{red}$  e Ph- $PBP_{ox}$  vadano incontro ad una metabolizzazione necessaria per rimuovere le molecole stimolanti dai recettori sensoriali. Con tale modello, "carrier-to-scavenger model", Kaissling (2001) propone che le PBP, come dimeri, trasportino le molecole di feromone e che solo successivamente le inglobino al loro interno per disattivarle. Sulla base di esperimenti di "elettroforesi su gel" in *Antheraea polyphemus* (Kaissling, 1986), si ipotizzò che le PBP potessero esistere come dimeri; lo stesso venne suggerito in *Mamestra brassicae* (Campanacci et al., 1999) e *Bombyx mori* (Leal, 2000).

Il meccanismo che sta alla base del legame delle molecole del feromone con le PBP, presuppone due passaggi; inizialmente, la molecola si lega a siti di legame esterni,

per essere solubilizzata nella linfa sensillare e trasportata ai recettori; successivamente, tramite l'enzima, le PBP subiscono un cambiamento conformazionale, che consiste nell'apertura di un sito interno al quale si lega la molecola del feromone. In questo modo, tali molecole vengono disattivate per evitare ulteriori stimolazioni dei recettori sensoriali.

Questo meccanismo, detto "carry and swallow" (trasporta ed ingloba), non differisce dal modello redox, se si assume che le Ph-PBPred e Ph-PBPox rappresentino le molecole del feromone legate, rispettivamente, ai siti esterni ed interni delle PBP. Una volta avvenuto il legame tra la molecola del feromone ed il suo recettore, si attiva una G-proteina, che si trova sul lato interno della membrana plasmatica (Laue et al., 1997; Vosshall et al., 2003). L'attivazione della G-proteina porta a due possibili meccanismi di traduzione (Krieger e Breer, 2003).

1. attivazione della fosfolipasiC (PLC) con successiva produzione di inositolo trifosfato (IP<sub>3</sub>) e diacilglicerolo (DAG), come secondi messaggeri;
2. attivazione dell'adenilato ciclasi, con conseguente aumento dell'adenosinmonofosfatociclico (AMPc), come secondo messaggero.

## **2. TECNICHE ELETTROFISIOLOGICHE E COMPORTAMENTALI**

Considerata l'importanza della produzione e percezione dei segnali chimici nel comportamento degli insetti in relazione alle complesse funzioni volte alla sopravvivenza della specie, quali l'alimentazione e la riproduzione, lo scopo del mio studio era finalizzato ad acquisire dati utili per individuare nuove possibili strategie di controllo biologico e biotecnico, più specifiche e alternative a quelle tradizionalmente impiegate, per mezzo di tecniche elettrofisiologiche e comportamentali, qui di seguito riportate:

## 2.1 TECNICHE ELETTROFISIOLOGICHE

### 2.1.1 *Tecnica di derivazione ad elettroantennogramma (EAG) e ad elettroabdomengramma (EAbG)*

La sensibilità olfattoria sui campioni è stata valutata attraverso le tecniche di derivazione ad elettroantennogramma (EAG) e/o ad elettroabdomengramma (EAbG). Le derivazioni sono state effettuate sulla parte apicale del rachide dell'antenna nel primo caso e sull'addome dell'insetto nel secondo, ad una temperatura di  $25 \pm 1^\circ \text{C}$  e umidità relativa del 60-70%.

In entrambi i casi l'elettrodo di riferimento consiste di una micropipetta di vetro di  $10\mu\text{m}$  di diametro in punta; le micropipette con queste caratteristiche costanti vengono ottenute tramite un tiralettrodi (Kopf mod. 720). L'elettrodo viene riempito di soluzione fisiologica per assicurare la continuità elettrica del circuito e su di esso viene impalata la parte basale dell'antenna o dell'addome; il preparato viene poi posizionato nel campo visivo di uno stereomicroscopio (Wild M5; 200x).

L'elettrodo di derivazione consiste ugualmente in una micropipetta di vetro preparata allo stesso modo della precedente e contenente un filo conduttore di Ag/AgCl. L'elettrodo di derivazione, come già detto, viene appoggiato delicatamente sull'estremità apicale dell'antenna o dell'addome per mezzo di un micromanipolatore: il circuito viene così chiuso ed è possibile registrare gli EAG o gli EAbG evocati dai diversi stimoli presentati in sequenza tramite l'olfattometro di seguito descritto e per una durata variabile a scelta dell'operatore (tipicamente 2 s).

I segnali bioelettrici (EAG/EAbG), che rappresentano la sommatoria dell'attività contemporanea di un grande numero di cellule olfattorie, derivati per mezzo di un elettrometro ad alta impedenza (WPI mod. 707) ed opportunamente amplificati, venivano osservati sullo schermo di un Personal Computer in quanto digitalizzati attraverso un sistema di acquisizione A/D (Axon, Digitata 1200B) ed immagazzinati sul suddetto computer per le successive analisi, tramite il software Axoscope 10.

Si ricorda che la forma dell'EAG/EAbG ottenuta dipende dalla natura chimica della sostanza odorosa impiegata come stimolo e dalle caratteristiche del recettore a cui le molecole si legano; in ogni caso, durante l'attivazione, l'estremità

dell'antenna o dell'addome risultano polarizzate negativamente rispetto alla base. Le differenze statisticamente significative tra i valori EAG/EAbG ottenuti dai diversi campioni sono state calcolate tramite il test "t" di Student, con una soglia di significatività del 5% ( $p \leq 0,05$ ).

### *2.1.2 Apparato di stimolazione olfattiva*

La somministrazione degli stimoli, in fase gassosa, è stata effettuata tramite il sistema olfattometrico illustrato in figura 3 e qui di seguito brevemente descritto.

Un flusso di aria costante (1,0 l/min) generato da una pompa elettrica a membrana ( $P_1$ ) è convogliato mediante tubatura di plastica ad un ugello di vetro (V) posizionato a circa 1 cm dal preparato ( $P_r$ ) e diretto in modo che il flusso investa le antenne o l'addome dell'insetto. Tale aria viene preventivamente depurata mediante un filtro di carbone attivo granulare ( $F_1$ ).

Un secondo flusso d'aria (0,2 l/min) generato da una pompa uguale ( $P_2$ ) viene filtrato ( $F_2$ ) e inviato ad una elettrovalvola a solenoide (E) a tre vie (LEE mod. LFAA 1200113H). Quando la valvola viene azionata dall'operatore tramite un interruttore a tempo programmabile (T), l'aria, invece di ritornare all'ambiente (W), viene fatta passare attraverso una cartuccia facilmente ricaricabile ( $O_d$ ) contenente una striscia di carta da filtro impregnata della sostanza stimolante in esame.

L'aria, saturata dallo stimolo, prosegue lungo un tubo capillare e viene aggiunta al primo flusso d'aria (mantenuto costante) secondo proporzioni variabili a piacere dell'operatore e va quindi ad investire il preparato. Entrambi i flussi d'aria vengono regolati e misurati mediante flussimetri a portata variabile ( $F_x$ ) (Cole-Parmer).

Dopo la stimolazione, l'aria contenente lo stimolo viene rimossa dal preparato mediante una pompa aspirante ( $P_3$ ) ad una velocità di flusso leggermente superiore rispetto a quella di stimolazione. Questa tecnica olfattometrica, che prevede l'aggiunta dell'odore-stimolo ad un flusso d'aria costante che investe continuamente il preparato, permette di minimizzare l'artefatto di stimolazione dovuto al flusso d'aria stesso. In ogni caso, all'inizio di ogni esperimento, una stimolazione mediante aria veniva utilizzata come controllo per misurare la presenza di una possibile componente di risposta del meccanocettore. Quando inutilizzate le cartucce

contenenti gli odori vengono conservate alla temperatura di -20 °C.

### *2.1.3 Significato ed interpretazione dell'elettroantennogramma (EAG) e dell'elettroabdomenogramma (EAbG)*

L'elettroantennogramma (EAG) e l'elettroabdomenogramma (EAbG), come già detto, vengono comunemente considerati come la derivazione elettrofisiologica di più potenziali recettoriali (potenziali lenti e non propagati) sommati, insorgenti in diverse unità sensoriali in seguito ad opportuna stimolazione.

L'evocazione di tali potenziali può avvenire con un andamento temporale non necessariamente simultaneo, ma comunque con un certo grado di sovrapposizione. D'altra parte il potenziale lento, in funzione della qualità dello stimolo e del tipo di unità sensoriale considerata, può risultare sia di tipo eccitatorio (negativo) che di tipo inibitorio (positivo).

Di conseguenza se un dato stimolo eccita la maggior parte della popolazione di recettori, le risposte derivate avranno una risultante (cioè un EAG o un EAbG) con deflessione negativa. Se, invece, la maggior parte delle unità sensoriali di cui si deriva l'attività risulta inibita, l'EAG o l'EAbG avrà deflessione proporzionalmente positiva. Infine, nel caso in cui parte delle cellule sensoriali viene eccitata e parte, numericamente circa equivalente, viene inibita e le risposte delle due popolazioni non sono sincronizzate, l'EAG o l'EAbG può mostrare un andamento definibile come "complesso".

Questa desincronizzazione di popolazioni di recettori coesistenti, ma di risposta antagonista ad un dato stimolo, può essere spiegata ammettendo differenze nelle proprietà bioelettriche dei due o più tipi di recettori presenti, quali una diversa velocità di adattamento e/o di ripolarizzazione.

D'altra parte, rimane tuttora da chiarire la relazione che intercorre tra i parametri che descrivono l'EAG/EAbG (ampiezza, forma, velocità di depolarizzazione e ripolarizzazione) e la localizzazione e densità dei recettori di cui si deriva la risposta sommata.

L'ipotesi più attendibile è comunque rappresentata dalla considerazione che il

contributo elettrico dei recettori di un tipo di sensillo al potenziale sommato (EAG/EAbG) sia direttamente proporzionale alla densità dei sensilli di quel tipo nell'area di derivazione e inversamente proporzionale alla loro distanza dall'elettrodo di derivazione, ammettendo, per semplicità, che la superficie antennale sia elettricamente omogenea.

#### *2.1.4 Tecnica di derivazione a Single Cell (SC)*

La sensibilità olfattoria, inoltre, è stata valutata attraverso la tecnica di derivazione a "single cell" (SC).

In particolare, l'antenna o l'addome venivano recisi vicino alla base e quindi impalati sull'elettrodo di riferimento in corrispondenza dell'estremità prossimale. L'elettrodo in questione consisteva di una micropipetta di vetro di 10  $\mu\text{m}$  di diametro in punta riempito di soluzione fisiologica per assicurare la continuità elettrica del circuito. L'elettrodo di derivazione consisteva anch'esso in una micropipetta di vetro contenente un filo conduttore di Ag/AgCl. Quest'ultimo elettrodo, appoggiato delicatamente sulla punta di un sensillo per mezzo di un micromanipolatore, chiudeva il circuito. L'attività bioelettrica dei sensilli, consisteva sia di potenziali recettoriali (o potenziali lenti e non propagati) che di potenziali d'azione (o spike). I diversi stimoli venivano presentati in sequenza tramite l'olfattometro per una durata variabile a scelta dell'operatore (tipicamente 2 s).

I segnali bioelettrici, che rappresentano l'attività del singolo sensillo su cui è poggiato l'elettrodo di derivazione, derivati per mezzo di un elettrometro ad alta impedenza (WPI mod. 707) ed opportunamente amplificati, venivano osservati sullo schermo di un Personal Computer in quanto digitalizzati attraverso un sistema di acquisizione A/D (Axon, Digitata 1200B) ed immagazzinati sul suddetto computer per le successive analisi, tramite il software Axoscope 10.

Le derivazioni erano state effettuate sui singoli sensilli delle antenne di individui maschi ad una temperatura di  $25 \pm 1^\circ \text{C}$  e umidità relativa del 60-70%.

## **2.2 STUDI COMPORTAMENTALI**

La messa a punto di tecniche comportamentali implica l'utilizzo di trappole che sono necessariamente differenti per dimensioni e forma a seconda della specie di insetto testata. In particolare il mio studio ha previsto l'utilizzo di trappole a luce e/o innescate con molecole specifiche per ciascuno degli insetti oggetto del mio studio. Per ogni prova comportamentale è stato adottato uno schema sperimentale a blocchi randomizzati. I dati sulle catture sono stati successivamente sottoposti all'analisi della varianza ed è stata calcolata la minima differenza significativa ( $p \leq 0,05$ ).

Il fine ultimo dei dispositivi di cattura da me utilizzati, data l'elevata specificità, costituiscono un valido strumento sia per il monitoraggio che per il contenimento dell'espansione delle diverse popolazioni di insetti.

## **3. INSETTI DI INTERESSE AMBIENTALE (*Lymantria dispar*), SANITARIO (*Culicoides imicola*) E AGRONOMICICO (*Ceratitis capitata*) OGGETTO DEL MIO STUDIO**

Le tecniche sopra descritte, largamente impiegate in laboratorio ed in campo sono state da me utilizzate per raccogliere dati su i meccanismi di produzione e percezione di segnali chimici che interagiscono specificatamente con le funzioni vitali di un insetto di interesse ambientale come il Lepidottero *Lymantria dispar*, sanitario come il *Culicoides imicola* ed agronomico come la *Ceratitis capitata*.

### **3.1 *Lymantria dispar* L.**

#### *3.1.1 Impatto ambientale del lepidottero L. dispar L. in Sardegna*

Il lepidottero *Lymantria dispar* L., oggetto del presente studio, è una delle specie dell'entomofauna fitofaga presente in Sardegna e rappresenta uno dei principali agenti dannosi del nostro patrimonio boschivo. Colpisce in particolare le quercete a

sughera (*Quercus suber*), a leccio (*Q. ilex*) ed a roverella (*Q. pubescens*) attraverso un'azione defogliante che può causare una notevole riduzione della biomassa fotosintetica delle piante colpite, con conseguente deperimento o addirittura la morte se in concomitanza con altri fattori ecologici sfavorevoli.

L'impatto ambientale determinato dalla massiccia presenza di questo lepidottero risulta di notevole importanza, ed ingente è il conseguente danno economico legato alla produzione del sughero stesso, ampiamente sfruttata nella nostra regione.

Le osservazioni effettuate nell'arco di diversi decenni hanno dimostrato che le popolazioni di *L. dispar* sono soggette a fluttuazioni che, da uno stato di latenza, ne portano la densità a superare ciclicamente il livello critico, causando come già detto, ingenti danni al patrimonio boschivo (Luciano e Prota, 1982a).

In Sardegna è stato stimato che l'ampiezza del periodo delle fluttuazioni di *L. dispar*, calcolata in base alla conta delle ovature, varia da 5-6 a 11-12 anni in differenti aree dell'isola (Diel, 1975; Gu et al., 1995; Hildebrand, 1996; Hollander e Yin, 1982; Luciano et al., 1982). Alcune zone come il Marghine e il Logudoro sono infatti a rischio frequente; altre a rischio periodico, come Gallura e Mandrolisai; altre ancora a rischio saltuario, ad esempio Nuorese, Goceano, Ogliastra e Iglesiente.

L'andamento ciclico delle popolazioni di *L. dispar* sembra essere controllato da diversi fattori quali il clima, le relazioni fitofago-pianta ospite, le risorse alimentari, la competizione inter ed intra-specifica, la densità delle popolazioni di parassiti e di predatori, l'incidenza delle malattie, il tasso di fecondità riproduttiva (Cerboneschi et al. 1998; Luciano e Prota, 1982a). Inoltre, sembrano avere rilevante influenza anche le variazioni intrinseche alla popolazione stessa del defogliatore, sia quelle di carattere genetico che quelle di carattere fisiologico.

Per tenere sotto controllo le popolazioni di questo lepidottero sarebbe necessario intervenire con accurati programmi operativi e prevedere in anticipo le aree dove si verificheranno le condizioni più favorevoli allo sviluppo dell'insetto e che potranno concorrere alla defogliazione.

Tradizionalmente, questo tipo di previsione si basa su dati storici delle dinamiche di popolazione e sostanzialmente sulla densità e distribuzione della deposizione delle uova o sulle mappe delle aree defogliate negli anni precedenti, e dunque legati alla

fecondità delle femmine.

Più recentemente Cerboneschi et al. (1998) hanno tenuto conto di un'altra variabile nelle dinamiche della popolazione: quella legata agli individui maschi ed alla loro abilità nel riconoscere le segnalazioni di feromone sessuale femminile. Infatti, negli insetti l'olfatto è strettamente collegato a paradigmi comportamentali come la nutrizione, la ricerca del partner per l'accoppiamento e la ricerca di substrati adatti per l'oviposizione, stereotipi che sono tutti indispensabili per la sopravvivenza della specie.

Tutte le risposte comportamentali finalizzate alla riproduzione si realizzano dunque essenzialmente a seguito di informazioni inviate dall'apparato chemosensoriale al sistema nervoso centrale (SNC). In particolare, nelle strategie riproduttive dei lepidotteri notturni in richiamo, la produzione ed il rilascio di feromone da parte delle femmine risulta di vitale importanza. Questo attraente sessuale evoca infatti una strategia di ricerca stereotipata in individui maschi conspecifici (Schneider, 1992) i quali, dopo aver percepito il segnale chimico tramite i loro sensibili recettori olfattivi antennali, rispondono con un comportamento caratteristico: un volo a zig zag sopravento, l'avvicinamento ed il librarsi vicino alla sorgente del feromone nel tentativo di entrare in contatto con la femmina per copulare (Christensen e Hildebrand, 1994; Hildebrand, 1996).

Alla base del successo riproduttivo del lepidottero *L. dispar* esistono dunque due fattori fondamentali: da una parte la regolazione della biosintesi, dell'immagazzinamento e del rilascio del feromone da parte di tessuti specializzati negli insetti di sesso femminile, e dall'altra l'interazione della stessa molecola con i recettori presenti nelle antenne degli esemplari maschili. In questo senso l'elemento di interesse comune è sempre la molecola del feromone.

### *3.1.2 Il feromone sessuale in Lymantria dispar L.*

Si ritiene che la *Lymantria dispar* L., al pari di altre specie di *Lymantria*, utilizzi come feromone, un singolo componente, il 2-metil-7,8-epossi-octadecano, comunemente chiamato "(+)disparlure" (Arn et al., 1992; Masler e Raina, 1993), di cui sono peraltro sconosciute le vie biosintetiche in vivo.

Data l'importanza di questo sistema di comunicazione chimica, molti ricercatori, hanno focalizzato l'attenzione sulle modalità di regolazione della biosintesi del feromone e del suo successivo rilascio negli esemplari femminili, oltreché studiarne l'interazione con i chemorecettori presenti nell'antenna degli esemplari maschili. Inoltre, è tuttora oggetto di disquisizione la modalità attraverso cui la produzione del feromone sia controllata nei diversi insetti.

Ad esempio, alcuni ricercatori hanno dimostrato che le ghiandole del feromone nei lepidotteri Nottuidi *Helicoverpa zea* ed *Heliotis virescens* sono sotto diretto controllo nervoso e che la stimolazione dei nervi che controllano le ghiandole del feromone porta ad un aumento della produzione dello stesso (Christensen et al., 1991).

Per contro, studi condotti su altri lepidotteri suggeriscono che le suddette ghiandole possono essere anche regolate direttamente da fattori presenti nell'emolinfa (Raina, 1993). Per i Lepidotteri Saturniidi alcuni ricercatori ipotizzano un controllo di tipo endocrino (Riddiford e Williams, 1971; Riddiford, 1974; Riddiford, 1978), mentre altri continuano a propendere per un meccanismo di tipo neurale (Hollander e Yin, 1982 e 1985; Itagaki e Conner, 1986 e 1987; Röller et al., 1963; Sasaki et al., 1983; Sasaki e Riddiford, 1984; Tang et al., 1987; Webster e Cardè, 1984). Quest'ultima ipotesi sembrerebbe essere avvalorata dal fatto che l'interruzione della catena gangliare o la rimozione dell'encefalo causerebbero cessazione del richiamo.

Ancora, un importante ruolo nella biosintesi del feromone sessuale viene assegnato al ganglio addominale terminale (TAG) per il quale è stato dimostrato un considerevole grado di autonomia nel controllo del comportamento di richiamo (Crnjar et al., 1988). Il TAG può essere infatti considerato, oltre che come centro di proiezioni nervose e quindi di controllo di numerosi distretti nei segmenti addominali dell'insetto, anche come una centrale di integrazione di input nervosi per produrre output motori e neurosecretori coordinati ed in stretta relazione non solo con il rilascio, ma probabilmente anche con la biosintesi del feromone sessuale durante la fase di accoppiamento.

Le linee di ricerca che affrontano lo studio a livello molecolare del feromone e della sua biosintesi hanno previsto l'impiego di diversi trattamenti allo scopo di stimolarne in vivo la produzione nelle ghiandole specifiche, per poi estrarne i

componenti tramite solventi organici e quindi identificarli e quantificarli.

Per quanto riguarda la biosintesi del feromone è stato proposto un meccanismo secondo cui cellule specializzate chiamate enociti, associate a cellule epidermiche addominali, producono un alchene precursore del feromone (Diel, 1975; Wigglesworth, 1970). Tale molecola verrebbe poi trasportata fino alla ghiandola da una lipoforina, proteina di trasporto multifunzionale (Chino, 1985; Gu et al., 1995; Jurenka e Roelofs, 1993; Pho, 1996) dove verrebbe convertita nella forma attiva finale epossidica attraverso vie biosintetiche ancora non ben conosciute.

Più recentemente si è visto che in altri insetti (Schal, 1998) le ghiandole del feromone non operano la biosintesi dello stesso, ma soltanto il suo immagazzinamento ed il rilascio durante la fase di richiamo.

In *Lymantria* potrebbe avvenire un processo analogo: l'alchene precursore del feromone potrebbe essere prodotto negli enociti e trasportato da una lipoforina fino alla ghiandola del feromone. A questo livello verrebbe raccolto e poi convertito nel “(+)-disparlure” nella sua forma finale epossidica.

Tutte queste notizie disponibili in letteratura suggeriscono la necessità di ulteriori indagini morfo-funzionali, sia per una migliore caratterizzazione delle strutture implicate nella produzione del feromone, sia per chiarire le possibili vie biosintetiche tramite cui questo attraente sessuale viene assemblato a partire dai relativi precursori, negli esemplari femminili.

Tuttavia, l'importanza dell'interazione feromone-recettore non può essere ignorato, soprattutto nell'ambito delle strategie di controllo del defogliatore. Infatti, rivestono una notevole importanza i diversi studi mirati all'individuazione di molecole che possano esercitare un effetto di attrazione più prolungato del feromone naturale sugli esemplari maschili o che possano competere con esso perché più stimolanti. Tali composti potrebbero infatti permettere la messa a punto di trappole “a richiamo sessuale” da utilizzare sia nel monitoraggio delle popolazioni sia nel controllo delle stesse, come d'altra parte già avviene nel caso di diverse altre specie di insetti di interesse agronomico ed ambientale.

### 3.1.3 Ciclo biologico del lepidottero *Lymantria dispar* L.

Il ciclo biologico della *Lymantria dispar* L. (Fig. 4) incomincia tipicamente con l'ovoposizione che avviene subito dopo lo sfarfallamento degli adulti, tra la fine di giugno e la prima decade di luglio. Tale periodo si protrae fino al mese di settembre a quote altimetriche via via crescenti. Questa variabilità è in parte da attribuirsi a quella delle condizioni climatiche generali in anni successivi e, a parità di quota, al diverso microclima nelle varie stazioni considerate. In questa fase le femmine adulte depongono, sui tronchi degli alberi o altri substrati, ovature contenenti da un centinaio a più di un migliaio di uova ricoperte da una peluria corporea bruna che servirà da protezione (Fig. 5A).

Le dimensioni delle ovature ed il numero di uova variano in base alle condizioni della popolazione: nelle popolazioni in decremento sono più piccole rispetto a quelle delle popolazioni in espansione. Lo sviluppo dell'embrione all'interno dell'uovo comincia appena dopo la deposizione, tuttavia le larve non nascono fino alla primavera successiva, ma entrano in diapausa per superare l'inverno. Durante questo periodo possono tollerare brevi esposizioni a temperature molto basse (-35 °C), come ad esempio accade in Nord America, ove la *L. dispar* è stata accidentalmente introdotta nel secolo 19esimo.

Dopo la schiusa (Fig. 5B), che normalmente in Sardegna si verifica all'inizio della primavera, le giovani larve del primo stadio possono rimanere nell'ovatura fino a 24 ore prima di risalire verso la cima dell'albero dove si appendono tramite dei filamenti sericei: se il vento è abbastanza forte i filamenti si rompono e le larve vengono trasportate sugli alberi vicini.

Questo tipo di trasporto è la modalità naturale di diffusione più importante per questa specie, dal momento che le femmine adulte non volano: in questo modo le larve si spostano di solito di poche centinaia di metri, ma in certe condizioni di vento possono arrivare anche più lontano. Lo sviluppo dei bruchi prosegue poi attraverso una serie di stadi larvali (5 o 6 per i maschi, 6 o 7 per le femmine) intervallati da mute in cui l'esoscheletro viene sostituito da uno nuovo più grande (Fig. 5C).

Tra maggio e l'inizio di luglio le larve giungono a maturità e consumano una quantità molto maggiore di fogliame rispetto ai primi stadi: è appunto nel mese di

giugno che si verifica la maggior parte della defogliazione (Figg. 6A, B).

Nelle ore diurne le larve mature sono solite riposarsi sotto lembi di corteccia o nelle fessure dei tronchi degli alberi, mentre di notte si dirigono verso la cima dell'albero e si alimentano. Questa migrazione quotidiana non può verificarsi nelle popolazioni ad alta densità nelle quali le larve, in competizione per le risorse di fogliame, si alimentano giorno e notte.

A completamento dello sviluppo le larve vanno alla ricerca di fessure o lembi di corteccia dove incrisalidarsi: tessono dei filamenti sericei (ma non bozzoli come fanno i bruchi di altre specie) e mutano nello stadio di pupa o crisalide (Fig. 5D). È possibile distinguere le crisalidi femminili da quelle maschili in quanto le prime sono generalmente più grandi. Lo stadio di crisalide dura all'incirca due settimane e lo sfarfallamento dell'adulto comincia con la prima settimana di luglio per continuare fino alla fine del mese con leggere variazioni a seconda del luogo.

Le femmine adulte (Fig. 5E), riconoscibili per il colore bianco marezzato delle ali, sono inette al volo anche perché il loro addome è gonfio di uova. Esse rimangono immobili sui tronchi degli alberi o dovunque possano emergere e rilasciare il feromone sessuale per attirare i maschi che si trovano ad una certa distanza sottovento. Il feromone “(+)*disparlure*”, è stato identificato e prodotto sperimentalmente.

I maschi adulti (Fig. 5F), al contrario delle femmine, hanno livrea bruna ed hanno grandi antenne piumate contenenti diverse migliaia di chemorecettori specifici per il rilevamento del feromone. Dopo lo sfarfallamento i maschi volano secondo traiettorie casuali finché percepiscono la presenza di feromone, dopodiché proseguono il proprio volo controvento per localizzare la femmina e cominciare la fase dell'accoppiamento.

Completata questa fase, la femmina inizia a deporre le uova, mentre il maschio può accoppiarsi più volte. Gli adulti di entrambi i sessi vivono solo pochi giorni.

## 3.2 *Culicoides imicola*

### 3.2.1 *Impatto ambientale dell'insetto Culicoides imicola*

I ditteri appartenenti al genere *Culicoides* (Famiglia: Ceratopogonidae), sono piccoli insetti con un'apertura alare di meno di due millimetri. Essi rivestono un ruolo molto importante in medicina veterinaria in quanto sono vettori di Arbovirus come il virus della lingua blu (BTV) in Europa sub-artica e temperata, nord e sud America, Australia, Africa, tropici e sub-tropici e anche del virus della peste equina (AHSV) in Africa. La maggior parte delle 1400 specie di *Culicoides* conosciute al mondo è ematofaga, ed in tutti i casi è solo la femmina a cibarsi di sangue; diverse specie danneggiano direttamente l'uomo, provocando nei soggetti più sensibili importanti reazioni cutanee.

Del virus della "Blue Tongue" sono conosciuti 24 diversi sierotipi. E' un virus ad RNA, appartenente alla famiglia dei Reoviridae, che agisce a livello degli endoteli capillari con conseguente e seria alterazione della permeabilità e fragilità dei capillari stessi.

Il BT virus è veicolato da *Culicoides* sp, si è rapidamente diffuso nel bacino del Mediterraneo (Mellor et al., 2000), compresa la Sardegna, dove si ritiene sia arrivato attraverso l'importazione di animali malati oppure tramite insetti già infetti trasportati dal vento, probabilmente dalla Tunisia, dove nel 1999-2000, si è verificata un'epidemia di lingua blu con lo stesso sierotipo 2, il primo segnalato in Sardegna. La malattia si è diffusa a partire dal sud dell'isola e ha interessato tutta la costa occidentale, parte di quella orientale e alcune zone interne. Dalla Sardegna l'infezione si è diffusa in Calabria, in Toscana e nel Lazio. In Sardegna il vettore certo della malattia è *C. imicola*, mentre altre specie presenti come *C. obsoletus* e *C. pulicaris* sono ancora considerate sospette o potenziali (Fig. 7).

La rapida diffusione è dovuta al fatto che gli insetti adulti, attivi nelle ore notturne, si infettano pungendo animali malati in fase viremica e rimangono tali per il resto della loro vita; tuttavia la trasmissione verticale del virus, cioè dall'adulto alle successive generazioni, non avviene nell'insetto. L'unica eccezione alla trasmissione tramite gli insetti attualmente nota è costituita dal liquido seminale di

animali infetti con il quale possono essere infettate le femmine, sia tramite l'accoppiamento naturale che con la fecondazione artificiale; anche gli embrioni prelevati da animali infetti possono contribuire alla diffusione dell'infezione.

### 3.2.2 *Ciclo biologico dell'insetto *Culicoides imicola**

Il ciclo vitale dei *Culicoides* include uova, stadio larvale, pupa e adulto. Le larve richiedono elevati livelli di umidità e di acqua e la deposizione delle uova avviene nel fango. Il fango preferito dai *Culicoides* è quello ricco di sostanze organiche e nutrienti, facilmente reperibile nelle aziende zootecniche con sistemi di biosicurezza precari. L'adulto depone le uova nelle pozze stagnanti, dove iniziano e si completano i quattro stadi larvali, lo stadio di pupa e lo sfarfallamento dell'insetto adulto. Quest'ultimo, esce dal fango, punge gli animali per nutrirsi e portare a maturazione le uova. Il nutrimento avuto durante lo stadio larvale permette all'insetto di crescere e di deporre le uova. Se l'animale è infetto, come nel caso dei bovini, ospiti naturali non sensibili, che fungono da "reservoir" o degli ovini malati che possono essere anche serbatoio del virus, il *Culicoides* si infetta anch'esso e può trasmettere il virus ad animali sani. Successivamente si accoppia, depone le uova nel fango e ricomincia il ciclo (Fig. 8).

Gli adulti di *Culicoides* sp. vivono in genere per 10-20 giorni, ma eccezionalmente possono vivere per periodi più lunghi, anche 60-90 giorni. La densità della popolazione decresce per temperature inferiori ai 12 °C, anche se è stato dimostrato che alla temperatura di -1,5 °C il 15% degli esemplari adulti di *C. imicola* sopravvive per oltre 15 giorni. Il virus si moltiplica nell'insetto e dopo un periodo di incubazione di almeno una settimana può essere trasmesso tramite puntura ad animali sani per tutta la durata della vita dell'insetto.

Il periodo d'incubazione della malattia negli ovini è di 5-20 giorni (in media 7 giorni) e può manifestarsi sotto diverse forme cliniche, alcune delle quali ad esito letale. Negli ovini la letalità può variare tra il 2% e il 30%, mentre il numero di capi che si ammalano può variare sensibilmente a seconda del ceppo del virus, della razza ed età degli animali, nonché delle condizioni epidemiologiche dell'area interessata. Il primo sintomo a comparire è la febbre fino a 42 °C che persiste per 6-

8 giorni; in seguito si osserva depressione, inappetenza, rapida perdita di peso, edema delle labbra e della regione sottomandibolare o di tutta la testa. Allo stato attuale, non esiste alcuna terapia in grado di eliminare il virus e far guarire gli animali malati; il controllo della malattia è basato esclusivamente su misure di profilassi preventiva articolate su diversi fronti.

### *3.2.3 Strategie di controllo attualmente in uso*

Sulla base di una ricerca bibliografica preliminare da me condotta, si evince che i metodi attualmente utilizzati per il controllo della trasmissione dell'infezione sono rappresentati da:

1. utilizzo di trappole a luce, già usate con successo in alcuni paesi tra cui Israele, dislocate in prossimità degli animali ospite e progettate per la cattura degli insetti;
2. limitazione del contatto tra gli animali e gli insetti, ricoverando gli animali, ad esempio, in ambienti chiusi durante le ore notturne o limitare lo spostamento degli animali dalle aree infette, poiché, in assenza di vento, l'insetto ha una limitata capacità di spostarsi da un'area all'altra;
3. utilizzo di sistemi di biosicurezza presso le aziende zootecniche;
4. utilizzo di un vaccino vivo e attenuato, la cui efficacia risulta limitata dal fatto che deve essere prodotto col medesimo sierotipo presente nel territorio;
5. sorveglianza sierologia.

In Sardegna, a tutt'oggi, la vaccinazione è la principale strategia utilizzata per combattere il BTV; tuttavia il vaccino presenta diversi effetti indesiderati, come:

1. rialzo febbrile che, di norma dura 7-10 giorni, durante i quali è bene non sottoporre gli animali a stress, alla luce diretta del sole ed altri fattori debilitanti;

2. si possono vaccinare solo gli animali in buone condizioni di salute, di conseguenza quelli che non ricevono il vaccino non possono essere salvati;
3. il vaccino non deve essere somministrato in animali gravidi nella prima metà della gravidanza, perché potrebbe determinare, in un certo numero di casi, aborti e/o malformazioni fetali;
4. diversi studi, sia su bovini che ovi-caprini, mostrano diminuzioni significative nella produzione del latte, anche se solo per pochi giorni.

Rimangono pertanto inesplorate le strategie di controllo dell'insetto vettore, sia allo stadio di larva che di adulto, che prevede, come larva, la localizzazione e distruzione dei focolai larvali. Il controllo dell'insetto vettore adulto impedisce l'utilizzo di insetticidi intramurali e/o extramurali; nel primo caso perché hanno abitudini esofile, nel secondo caso perché la loro elevata capacità di dispersione esclude la possibilità di colpire concentrazioni massive di individui ed i trattamenti esterni abbattenti (spaziali) procurano danni enormi all'altra entomofauna ed all'ambiente.

### **3.3 *Ceratitis capitata* (Wiedemann)**

#### *3.3.1 Impatto ambientale dell'insetto *Ceratitis capitata**

La mosca mediterranea della frutta *Ceratitis capitata* Wiedemann (Fig. 9) è un insetto fitofago, appartenente all'ordine dei Ditteri Brachiceri, la cui larva si sviluppa come carpo-fago e polifago all'interno della polpa di molti frutti.

Nonostante l'origine della specie sia ancora incerta, la letteratura cita come possibili areali di origine l'Africa subsahariana o l'Africa occidentale, da cui, nell'arco di un secolo, si sarebbe insediata nel bacino del Mediterraneo e poi diffusa in tutto il mondo (Gasperi et al., 2002).

Attualmente è una specie cosmopolita, presente tutto l'anno nelle regioni tropicali e subtropicali di tutti i continenti (Nord America, Sudamerica, Asia, Oceania), mentre nelle zone temperate la sua presenza risulta essere stagionale.

La specie è stata eradicata in Nuova Zelanda e nelle Hawaii. È inoltre presente negli Stati Uniti meridionali (California, Texas, Florida) e in Messico. L'eradicazione nel Nord America, avvenuta negli anni 80, è stata temporanea in quanto è documentata la sua ricomparsa in più riprese in California. L'importanza economica di questo insetto è rilevante al punto che in certi Paesi è oggetto di regolamenti fitosanitari che impongono barriere commerciali alla frutta d'importazione per evitare l'introduzione di focolai d'infestazione.

E' ritenuta una delle avversità economicamente più rilevanti per la frutticoltura, a causa del notevole potenziale biologico, dell'estrema polifagia (oltre 300 specie agrarie attaccate), della difficoltà di controllo e dell'entità dei danni che provoca (gli attacchi possono interessare anche il 100% della produzione), inducendo la pianificazione di estensivi programmi di controllo (IAEA, 2000).

In Italia è particolarmente dannosa su alcune drupacee (pesco e albicocco), sul fico, sul fico d'India e sul kakhi e, in annate di gravi infestazioni, si riversa anche sulle pomacee (melo, pero, nespolo del Giappone), sugli agrumi (arancio, clementino), sulla fragola, sul kiwi.

Sugli agrumi gli attacchi si sono in genere rivelati di minore gravità rispetto ad altri fruttiferi, grazie all'azione inibente esercitata dall'olio essenziale contenuto nella flavedo, ma negli ultimi anni i danni si manifestano di maggiore entità, probabilmente per una maggiore diffusione di tipi genetici ad ovopositore più lungo, in grado di deporre le uova a maggiore profondità. In ogni modo gli agrumi costituiscono gli ospiti fondamentali per le generazioni tardive nei paesi del Mediterraneo.

Al pari di altri insetti, in *C. capitata* le strategie comportamentali di aggregazione ("lekking" e "fruit-garding"), di riconoscimento e selezione del partner per l'accoppiamento e di localizzazione della pianta-ospite per l'ovideposizione sono in larga parte condizionati dall'input neurale proveniente dai sensi chimici, olfatto e gusto.

Derivazioni dei segnali bioelettrici (elettroantennogrammi, EAG) hanno dimostrato che i sensilli olfattivi localizzati sull'apice del funicolo antennale delle femmine di *C. capitata* sono notevolmente più sensibili di quelli dei maschi verso alcune sostanze volatili presenti nella scorza di Citrus, quali alcuni oli (Levinson et al., 1990), terpeni ciclici, alcoli a catena corta, aldeidi ed esteri (Light et al., 1988; 1992).

Analogamente, è stato dimostrato che le sostanze volatili (carvone, diidrocarvone e 4-etil-acetofenone) delle arance della varietà Navel evocano segnali bioelettrici di ampiezza maggiore nei sensilli olfattivi delle femmine rispetto ai maschi (Hernandez et al., 1996). L'odore della pera risulta invece insignificante per la localizzazione a breve distanza della pianta-ospite da parte delle femmine (Fèron, 1962). Inoltre, le femmine di *C. capitata* non sono attratte da sostanze volatili presenti nella "flavedo" di arancia (Levinson et al., 1990; Katsoyannos et al., 1997), mentre lo sono dall'odore di guava matura (Jang, 1995). I frutti del caffè maturi (ma non quelli acerbi) esercitano una attrazione particolare con conseguente ovideposizione delle femmine, principalmente a causa della emissione di attraenti volatili (Prokopy and Vargas, 1996; Vargas et al. 1995). Derivazioni elettroantennografiche evocate dalla stimolazione con vari composti volatili (Crnjar et al., 1988) hanno mostrato che sulla superficie dei flagelli antennali di *C. capitata* sono presenti tre differenti morfotipi di sensilli olfattivi: basiconici lunghi, basiconici con scanalature e tricoidei. Butanolo, n-amil alcool, etanolo e 1-esanolo sono risultati, in ordine decrescente, i composti maggiormente stimolanti e le ampiezze EAG variavano in funzione del punto di derivazione con una correlazione, almeno per alcuni composti, tra valori EAG e densità della popolazione dei vari tipi di sensilli olfattivi.

Tuttavia, molti aspetti relativi alla selezione della pianta ospite ed alla ovideposizione risultano ancora poco chiari, anche se è emerso che nelle femmine esiste una gerarchia preferenziale nella scelta della pianta ospite per la ovideposizione e soprattutto che tale gerarchia viene influenzata dall'esperienza pregressa dell'insetto (Joachim-Bravo et al., 2001). E' stato inoltre riportato che alcuni composti sintetici possono influenzare l'accoppiamento nei maschi di *C. capitata*; tra questi il Trimedlure (1,1- dimetiletil 4 (and 5) cloro-2-metilcicloesano-

1- carbossilato), che sembra essere il maggior attraiante noto e, come tale, viene largamente impiegato nel monitoraggio e nei programmi di eradicazione dell'insetto (Shelly et al. 1996). L'effetto di attrazione esercitato dal Trimedlure sui maschi presenta dunque delle analogie con l'azione del feromone sessuale maschile ed il conseguente orientamento per rilevare i siti di aggregazione ("lekking"). Recenti studi hanno suggerito che un'altra molecola, nota con il nome di (-)-Ceralure B1 (etil-*cis*-5-iodo-*trans*-2-metilcicloesano-1-carbossilato), risulta ancora più attrattiva del Trimedlure verso i maschi (Jang et al., 2005), candidando questo composto come un efficace strumento da impiegarsi nelle strategie di controllo della mosca mediterranea della frutta. Inoltre, il  $\alpha$ -copaene, un componente minore degli oli essenziali di varie specie di piante quali arancio, guava e mango, influenza il comportamento di aggregazione dei maschi, inducendo inoltre comportamenti di corteggiamento pseudo-maschile nelle femmine vergini (Nishida et al., 2000).

Per quanto riguarda la fisiologia dei recettori gustativi a contatto della mosca mediterranea della frutta, la letteratura disponibile è decisamente carente. Risultati pionieristici sono stati riportati da Angioy et al. (1978) sulla risposta elettrofisiologica e sulla soglia di sensibilità dei chemosensilli labellari e tarsali di *C. capitata* ai sali. Studi più recenti indicano inoltre che, dopo l'ovideposizione, le femmine di *C. capitata* depositano, sulla superficie del frutto, un feromone deterrente l'ovideposizione associato a materiale fecale, allo scopo di ridurre eccessive infestazioni dello stesso frutto (Arredondo e Diaz-Fleischer, 2006). Questa sostanza o miscela di sostanze, il cui effetto repulsivo è mediato dai chemocettori a contatto, si candida come potenziale agente nei programmi di controllo integrato di questo insetto.

La dinamica di popolazione è apparentemente complessa, in quanto varia a seconda della regione geografica e delle annate. In realtà essa è principalmente determinata da tre condizioni: il decorso termico stagionale, con particolare riferimento alla stagione fredda, la disponibilità alimentare ed il potenziale riproduttivo della specie. Dal momento che il potenziale biologico si accresce di generazione in generazione, la pericolosità della specie dipende dal numero di generazioni che si ripetono nell'arco dell'anno e dalla rapidità con cui si sviluppa la prima generazione. Per questo motivo la pericolosità della specie è strettamente legata alla latitudine. Nelle

regioni tropicali e subtropicali la specie è attiva tutto l'anno e presenta quindi una pericolosità elevata, soprattutto in relazione alla disponibilità alimentare. Nelle regioni caldo-temperate (ad esempio nell'Italia meridionale), l'attività biologica subisce un rallentamento, ma la specie sverna con successo usando come ospiti gli agrumi, fino a compiere 6-7 generazioni l'anno. Nelle regioni temperate (ad esempio nell'Italia settentrionale e centrale) la presenza della specie è solo stagionale in quanto riesce a svernare solo in condizioni microclimatiche particolari. In questo caso i focolai d'infestazione sono costituiti dalla frutta importata dalle regioni meridionali e, in condizioni particolari, dagli adulti che sfarfallano da pupe svernanti in ambienti protetti (come sono i magazzini). In queste regioni la pericolosità è pertanto limitata alle produzioni frutticole in piena estate. A latitudini maggiori di 41 °C la *Ceratitis* svolge al massimo 3-4 generazioni l'anno e l'entità dei danni dipende soprattutto dal decorso stagionale e dall'epoca di comparsa dei primi adulti.

Nell'Italia meridionale le infestazioni iniziano con un'intensità marcata dopo la metà di giugno e con una variabilità che dipende da fattori ambientali, come ad esempio la vocazione agrumicola della regione, e stagionali (inverno mite e primavera calda). In Sardegna, in genere, le cultivar precoci di pesco e albicocco riescono a sfuggire agli attacchi dell'insetto, mentre quelle che maturano dalla seconda metà di giugno in poi sono suscettibili di gravi danni che, in assenza di strategie di controllo, possono giungere anche al 100% della produzione. In ogni modo, a seconda della regione, l'epoca di comparsa varia da aprile agli inizi di luglio.

Alle alte temperature il deterioramento di un frutto colpito si verifica in pochi giorni. Inizialmente, i sintomi dell'infestazione sono poco visibili, ma ben presto la parte del frutto circostante la puntura diventa più scura e, in seguito allo sviluppo larvale, la polpa imbrunisce e diventa marcescente. In particolare, negli agrumi si forma un alone intorno alla puntura, mentre sui frutti verdi si nota una leggera decolorazione in corrispondenza dell'alone, che tende poi a invaiare più precocemente delle zone non punte.

In genere i danni alle arance sono solo di natura estetica perché le larve neonate muoiono prima di raggiungere la polpa, mentre risultano più sensibili il mandarino e le clementine.

Tuttavia, negli ultimi anni si sta verificando una maggiore incidenza dei danni anche alle arance ed il fatto sembra sia correlato, come già detto, ad una aumentata frequenza di femmine dotate di un ovopositore più lungo.

### 3.3.2 *Ciclo biologico di Ceratitis capitata*

Mediamente in Italia lo sfarfallamento degli adulti avviene nel periodo compreso tra maggio e giugno. La femmina, dopo essersi accoppiata, depone le uova preferibilmente su frutti ad alto tenore in zuccheri, a basso grado di acidità e con polpa tenera (Fig.10 A). Esiste perciò una scala di preferenza che orienta le infestazioni con il procedere della stagione. Ad esempio, nell'Italia meridionale, in piena estate, gli attacchi s'indirizzano preferibilmente sul pesco, sull'albicocco, sul fico e sulle varietà precoci di pero, mentre in genere viene evitato il susino. Nella tarda estate gli attacchi si estendono anche ad altre varietà di pero, al melo, talvolta al susino e all'uva, ma soprattutto al fico d'India e alle varietà precoci di khaki. In autunno gli attacchi proseguono sul fico d'India e sul khaki per passare infine agli agrumi, in particolare le clementine e gli aranci precoci del gruppo Navel (*Naveline*).

All'atto dell'ovideposizione la femmina incurva l'addome, estroflette l'ovopositore e penetra l'epicarpo del frutto, deponendo più uova nella cavità (Fig.10 B,C). In genere vengono deposte 4-6 uova per puntura, fino ad un massimo di una decina. Dal momento che una femmina può praticare anche diverse punture sullo stesso frutto, questo può arrivare a contenere anche diverse decine di uova. Inoltre, dal momento che nel corso della sua vita una femmina può deporre da poche centinaia fino ad un migliaio di uova, può arrivare ad infestare centinaia di frutti.

Le larve si sviluppano all'interno della polpa provocandone il disfacimento (Fig.10 D). A maturità fuoriescono dal frutto, si lasciano cadere e s'impupano nel terreno (Fig.10 E). Lo stadio di pupa si svolge sempre fuori dal frutto attaccato.

In condizioni favorevoli, le deposizioni possono protrarsi fino al mese di ottobre. L'attività degli adulti prosegue fino a novembre, cioè fino a quando le temperature medie scendono stabilmente sotto i 10° C (Fig.10 F,G). Dopo questo periodo essi rimangono inattivi e sopravvivono sino ai primi freddi intensi, generalmente tra dicembre e gennaio. Le larve invece, che hanno comportamento gregario, continuano ad accrescersi fino all'inizio di dicembre all'interno dei frutti.

La durata del ciclo di sviluppo, dalla deposizione dell'uovo allo sfarfallamento dipende strettamente dalla temperatura, variando da un minimo di 2 settimane (a 29 °C in laboratorio) fino ad un massimo di 3 mesi (a 10-12 °C). In condizioni ordinarie, la durata di una generazione estiva è dell'ordine di 20-30 giorni; per contro, sotto i 9 °C l'attività biologica si arresta completamente.

Nelle regioni a inverno mite la specie sverna soprattutto allo stadio di pupa nel terreno, ad alcuni centimetri di profondità. Nelle zone agrumicole sverna anche come adulto o come larva negli agrumi. Temperature inferiori ai 2 °C per una settimana provocano la morte delle pupe. Nelle regioni tropicali le generazioni si susseguono ininterrottamente per tutto l'anno.

### 3.3.3 Strategie di controllo

La difesa dei fruttiferi nei confronti della *Ceratitis* si è sempre rivelata molto problematica.

- Il controllo chimico infatti richiede l'impiego di principi attivi ad azione citotropica, in grado di penetrare nel frutto e svolgere la sua azione preventiva o curativa nei confronti delle larve neonate. Di nessuna utilità è il trattamento larvicida nei confronti delle larve che hanno già intrapreso lo sviluppo in quanto il danno si è ormai già verificato.
- Il controllo biologico non offre molte prospettive di successo. Pur avendo diversi antagonisti naturali, il potenziale biologico di questa specie è assai alto e solo in contesti particolari gli ausiliari possono esercitare un'efficace azione di controllo. Nel bacino del mediterraneo non esiste un vero e proprio antagonista ausiliario che possa svolgere un ruolo significativo nel controllo biologico. Contribuiscono al

contenimento delle popolazioni alcuni microrganismi e alcuni predatori occasionali. Fra i parassitoidi è stata segnalata l'azione di *Opius concolor* (Hymenoptera Braconidae) e di *Pachyneuron vindemmiae* (Hymenoptera Pteromalidae) nel Nord Africa e in Medio Oriente. La prima specie è stata peraltro impiegata in programmi di controllo biologico.

- Il controllo biotecnologico può essere condotto con la tecnica del maschio sterile e con il “*mass trapping*”.

La tecnica del maschio sterile o SIT (“*Sterile Insect Technique*”) consiste nella liberazione di un numero elevato di maschi allevati in cattività e sterilizzati con raggi gamma, lasciati attivi nella loro competitività con i maschi naturali (definiti *selvatici*). Una femmina si accoppia in genere una sola volta, perciò l'elevato numero di maschi sterili riduce nel complesso la fecondità della popolazione e, quindi, il potenziale riproduttivo. Affinché la competizione sia efficace, il rapporto numerico fra maschi sterili e maschi selvatici deve essere di almeno 20:1. La liberazione degli insetti si pratica con irrorazioni da mezzi aerei oppure da terra.

Questo è il metodo di controllo che ha dato i migliori risultati in assoluto, giungendo anche a casi di eradicazione “temporanei” della specie (California, Florida) o definitivi (Hawaii).

Il “*mass trapping*” si pratica con la dislocazione di trappole, in numero di una per pianta, innescate con attrattivi chimici. In generale il “*mass trapping*” non offre gli stessi risultati del SIT e probabilmente la sua efficacia è subordinata al verificarsi di condizioni contestuali particolari. Va perciò citato come mezzo ausiliario per il contenimento delle popolazioni anche se in determinate condizioni può rivelarsi un'alternativa efficace.

L'uso delle trappole a scopo di monitoraggio è utile in particolare per il controllo chimico guidato. Gli attrattivi impiegabili per la *Ceratitis* sono i seguenti:

- Paraferormoni. Si tratta di principi attivi sintetici che svolgono un'azione di attrazione nei confronti dei maschi. Il più usato è il t-butil-2-metil-4-clorocicloesancarbossilato, più comunemente noto con il nome commerciale “Trimedlure”;

- Esche proteiche. Si tratta di proteine idrolizzate che attirano gli adulti e svolgono un'azione di attrazione alimentare;
  - Sali ammoniacali. Si tratta per lo più di fosfati o carbonati di ammonio che svolgono, al pari delle esche proteiche, un'azione di attrazione alimentare.
- Il controllo integrato alla *Ceratitis capitata* è indispensabile per potenziare i vari metodi di difesa, in particolare quelli basati sul controllo biotecnologico. L'azione più efficace consiste nell'adozione di misure di profilassi tese a impedire la formazione di focolai d'infestazione da cui possono propagarsi le infestazioni stesse. Esempi di tali misure sono i seguenti:
- Costituzione di barriere commerciali. È attuata in alcuni paesi (es. Giappone, Corea del Nord) con embarghi che impediscono l'importazione di frutta proveniente da Paesi che non applicano un efficace controllo. Negli Stati Uniti è stata adottata in passato nei confronti di cultivar di clementine spagnole dopo l'eradicazione della mosca in California.
  - Costituzione di barriere fisiche nei siti d'importazione. È adottata ad esempio in Nuova Zelanda per mezzo del “*mass trapping*” nei porti allo scopo di catturare gli adulti che sfarfallano dalla frutta importata.

## 4. *Lymantria dispar* (L.)

### 4.1. SCOPO DELLA RICERCA

E' noto che la *Lymantria dispar* (L.) utilizza, come feromone sessuale, il 2-metil-7,8-epossi-octadecano, il cosiddetto (+)disparlure, biosintetizzato a partire da composti di natura idrocarburica e dalla loro successiva epossidazione. Il mio studio era indirizzato alla identificazione di analoghi sintetici dotati di maggior potere attrattivo sui maschi e/o di maggiore stabilità rispetto al feromone naturale, allo scopo di mettere a punto trappole a richiamo sessuale, peraltro già estesamente

utilizzate per diverse specie di lepidotteri di interesse agronomico ed ambientale sia nel monitoraggio delle popolazioni che nel controllo delle stesse.

Allo scopo, la ricerca è stata così articolata:

- a) valutazione dell'efficacia stimolante, mediante tecnica di derivazione ad elettroantennogrammi (EAG), di analoghi di sintesi del feromone;
- b) analisi del meccanismo d'azione degli analoghi mediante tecnica di derivazione da singole cellule sensoriali ("single-cell recording");
- c) analisi comportamentale comparata dell'efficacia degli analoghi rispetto al feromone mediante l'utilizzo di trappole innescate con un "dispenser" inerte e di uno a rilascio graduale quale il PVC;
- d) analisi comportamentale in campo sull'efficacia a lungo termine degli analoghi del feromone mediante utilizzo di un "dispenser" a PVC, effettuata in una sughereta.

## **4.2. MATERIALI E METODI**

### *4.2.1 Insetti*

Tutte le analisi olfattometriche sono state condotte su esemplari adulti di *Lymantria dispar* L. provenienti dagli allevamenti della Otis Air Base (Massachusetts, U.S.A.) e da quelli della Stazione Sperimentale del Sughero (Tempio Pausania), ricevuti in uno stadio larvale di pre-impupamento. I campioni hanno completato il loro ciclo biologico presso i laboratori della Fisiologia Generale dell'Università di Cagliari, all'interno di celle climatizzate ad una temperatura di 24-25 °C, fotoperiodo di 16h luce/8h buio ed umidità relativa pari a circa il 60%, fino all'emergenza dell'adulto. Maschi e femmine sono stati tenuti separati per evitare ogni esposizione dei maschi al feromone sessuale femminile.

### *4.2.2 Stimoli chimici impiegati*

Nell'ambito di questo studio sono stati utilizzati, come analoghi del feromone sessuale, un certo numero di ossaspiropentani di cui non era mai stata testata l'attività sui maschi di *L. dispar*. Questa classe di composti, dotata di buona

reattività e basso costo, è stata scelta per verificare come la sostituzione di una delle catene alifatiche del (+)disparlure con il radicale ciclico più semplice, il ciclopropile, potesse modificare l'attività biologica della molecola.

Tra i diversi ossaspiropentani presi in considerazione in questo studio, due analoghi sono risultati di rilevante interesse: il 2-decil-1-ossaspiro[2,2]pentano (di seguito chiamato **OXP-01**) e il 4-(1-ossaspiro[2,2]pent-2-il)-1-butanolo (di seguito chiamato **OXP-04**). Questi composti sono stati testati sia puri che in associazione con il feromone sessuale naturale in un ambito di diluizione ( $10^{-1}$ - $10^{-3}$ ) 1:10 - 1:1000 in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .

Tutte le soluzioni stimolanti sono state somministrate secondo una sequenza a diluizioni crescenti; all'inizio ed alla fine di ogni esperimento una stimolazione con aria veniva utilizzata come controllo per misurare la presenza di una possibile componente di risposta dei meccanocettori.

### 4.3 RISULTATI

*a) Valutazione dell'efficacia stimolante di analoghi di sintesi del feromone mediante tecnica di derivazione ad elettroantennogramma (EAG).*

Prendendo in considerazione il primo analogo di sintesi, il 2-decil-1-ossaspiro[2,2]pentano, pur non avendo di per sé un effetto stimolante, si è dimostrato in grado di inibire la risposta al feromone naturale quando testato in associazione con esso. In particolare, alla concentrazione più alta testata, l'analogo diminuiva quasi totalmente il potere stimolante del feromone. Il grafico in figura 11A mostra il valore medio  $\pm$  errore standard (ES) degli elettroantennogrammi (EAG) relativi alle stimolazioni con il feromone naturale "(+)disparlure" e OXP-01, puri o miscelati tra loro nel rapporto 1:1 alle diluizioni di 1:10, 1:100 ed 1:1000. Gli istogrammi indicano un valore medio  $\pm$  errore standard (ES) di  $0,12 \pm 0,04$  mV,  $0,22 \pm 0,03$  mV e  $0,01 \pm 0,04$  mV alle diluizioni 1:1000, 1:100 ed 1:10, rispettivamente, in seguito a stimolazione con OXP-01. Questi valori sono significativamente inferiori a quelli ottenuti dopo stimolazione con "(+)disparlure";

infatti, questi sono  $0,84 \pm 0,09$  mV,  $1,30 \pm 0,18$  mV e  $2,64 \pm 0,33$  mV alle tre diluizioni (1:1000-1:10, rispettivamente). L'effetto più sorprendente è quello evocato dalla miscela dell'analogo con il feromone alla diluizione 1:10, rispetto al feromone puro. Infatti le risposte dei recettori antennali sono  $0,30 \pm 0,03$  mV e  $2,64 \pm 0,33$  mV, rispettivamente, mentre la stessa diminuzione non si osserva alle altre due diluizioni; gli EAG sono in questi casi pari a  $0,78 \pm 0,11$  mV e  $0,81 \pm 0,17$  mV alle diluizioni 1:1000 ed 1:100, rispettivamente. In altre parole, l'effetto stimolante del feromone alla diluizione più alta è ridotto dalla presenza dell'analogo.

Il secondo, il 4-(1-ossaspiro[2,2]pent-2-il)-1-butanolo, ha invece mostrato, alla diluizione 1:100, una efficacia stimolante maggiore rispetto a quella di una pari diluizione di feromone naturale. Inoltre, quando testato in associazione con il (+)disparlure, l'analogo ha comportato un incremento di risposta rispetto al feromone puro. In altre parole questa molecola sembra possedere un effetto stimolante sugli esemplari maschili superiore a quello del feromone naturale e quindi sembra soddisfare uno dei requisiti richiesti nell'ambito di questo studio. Nella figura 12A vengono mostrati gli istogrammi dei valori medi  $\pm$  errore standard (ES) relativi alle risposte EAG con (+)disparlure, con OXP-04, puri o miscelati tra loro, in un ambito di diluizione 1:10-1:1000.

In dettaglio, l'effetto stimolante dell'analogo risulta trascurabile alla diluizione più bassa testata, mentre alla diluizione più elevata (1:10) produce una risposta pari a  $0,55 \pm 0,06$  mV. Tuttavia, tale valore risulta statisticamente non dissimile da quello riscontrato per una diluizione di feromone cento volte inferiore ( $0,39 \pm 0,08$  mV).

Ma l'effetto più sorprendente è quello evocato dall'analogo di sintesi alla diluizione intermedia. Infatti, la risposta EAG è più elevata rispetto alla pari diluizione di feromone naturale. Nel primo caso la risposta dei recettori antennali è di  $1,32 \pm 0,12$  mV, mentre quella al feromone è di appena  $0,89 \pm 0,12$  mV.

L'analisi dei dati ottenuti in seguito all'aggiunta dell'analogo al feromone mostra che non esiste una differenza statisticamente significativa tra la miscela ed il feromone puro alla diluizione più alta testata ( $2,10 \pm 0,16$  mV e  $2,15 \pm 0,17$  mV, rispettivamente). Viceversa, alle diluizioni 1:1000 e 1:100 la miscela produce degli EAG pari rispettivamente a  $1,04 \pm 0,10$  e  $1,82 \pm 0,14$  mV, con un chiaro effetto

additivo tra le risposte dei componenti testati singolarmente.

*b) Valutazione della efficacia stimolante ed analisi del meccanismo d'azione degli analoghi mediante tecnica di derivazione da singole cellule sensoriali (“single-cell recording”).*

Allo scopo di evidenziare l'esistenza di analogie e/o differenze nei meccanismi d'azione degli analoghi di sintesi rispetto al feromone naturale, in questo studio si è inoltre voluto testare, tramite la tecnica di derivazione a “single cell”, l'effetto degli analoghi OXP-01 ed OXP-04 sui sensilli tricoidei delle antenne dei maschi. In accordo con i dati in letteratura, si osservano “spike” di due tipi, uno con un'ampiezza maggiore (spike A) ed uno più piccolo (spike B), come mostrato in figura 13b, e si possono associare alle cellule A e B, rispettivamente. La figura 11 B mostra i valori medi  $\pm$  ES delle frequenze di scarica a potenziali d'azione evocati in risposta alla stimolazione con “(+)*disparlure*”, il 2-decil-1-ossaspiro(2.2)pentano (OXP-01), puri o miscelati tra loro. I risultati mostrano che le frequenze di scarica della cellula A relative ad OXP-01 ed alla sua miscela con il (+)*disparlure* sono statisticamente inferiori ( $p \leq 0,05$ ) rispetto a quelle ottenute con il feromone naturale puro, a tutte le diluizioni testate. Al contrario, le frequenze di scarica della cellula B al feromone, sono statisticamente inferiori ad OXP-01 (1:1000), alla miscela con OXP-01 (1:1000 ed 1:10), ma superiori ad OXP-01 ed alla miscela nella diluizione 1:100. Infatti i valori corrispondenti alle frequenze di scarica della cellula A (espressi come numero di spike/400 msec), sono di  $3,89 \pm 0,50$  (1:1000),  $4,39 \pm 0,76$  (1:100) e  $5,11 \pm 0,92$  (1:10), di  $2,22 \pm 0,75$  (1:1000),  $2,17 \pm 0,63$  (1:100) e  $2,78 \pm 0,75$  (1:10) ed infine di  $2,22 \pm 0,53$  (1:1000),  $2,17 \pm 0,67$  (1:100) e  $2,14 \pm 0,77$  (1:10), in risposta, rispettivamente, al feromone naturale, all'analogo di sintesi ed alla loro miscela; mentre, quelli relativi alla cellula B (espressi come numero di spike/400 msec), in risposta, rispettivamente, al feromone naturale, ad OXP-01 ed alla loro miscela sono di  $0,50 \pm 0,22$  (1:1000),  $1,39 \pm 0,41$  (1:100) e  $1,61 \pm 0,44$  (1:10), di  $1,39 \pm 0,49$  (1:1000),  $0,67 \pm 0,26$  (1:100) e  $1,33 \pm 0,36$  (1:10)

ed infine di  $1,44 \pm 0,37$  (1:1000),  $0,78 \pm 0,31$  (1:100) e  $2,33 \pm 0,71$  (1:10). Le differenze statisticamente significative sono state calcolate mediante il test “t-Student” ( $p \leq 0,05$ ).

I risultati mostrano quindi che l’analogo OXP-01, puro o in miscela con il feromone, non evoca alcuna risposta da parte della cellula A, indicata in letteratura come il neurone “da (+)disparlure”, mentre stimola la cellula B, il neurone che risponde al suo antagonista “(-)disparlure”. Ciò spiegherebbe sia la mancanza di potere stimolante e di attrattività dell’analogo da solo che l’inibizione esercitata sulla miscela con il feromone riscontrati nelle derivazioni EAG e nelle successive prove in campo.

Per contro, la figura 14 mostra gli esempi di scarica dei potenziali d’azione in risposta al (+)disparlure, all’ OXP-04 e alla loro miscela. Anche in questo caso i sensilli dai quali si è derivato sono di tipo T, per cui abbiamo ottenuto due tipi di spike, A e B. La figura 12 B mostra i valori medi  $\pm$  ES delle frequenze di scarica a potenziali d’azione evocati in risposta alla stimolazione con “(+)-disparlure”, OXP-04 puri o miscelati tra loro, sia per la cellula A che per la cellula B. I risultati mostrano che le frequenze di scarica della cellula A relative ad OXP-04 sono statisticamente inferiori ( $p \leq 0,05$ ) rispetto a quelle ottenute con il feromone naturale puro, a tutte le diluizioni testate, mentre non ci sono variazioni statisticamente significative rispetto alla miscela dei due. Al contrario, le frequenze di scarica della cellula B sono statisticamente superiori per la miscela alle diluizioni 1:1000 ed 1:10 e per OXP-04 alla diluizione 1:1000, rispetto al feromone. Infatti, i valori corrispondenti alle frequenze di scarica della cellula A (espressi come numero di spike/400 msec), sono di  $3,89 \pm 0,50$  (1:1000),  $4,39 \pm 0,76$  (1:100) e  $5,11 \pm 0,92$  (1:10), di  $2,06 \pm 0,60$  (1:1000),  $2,39 \pm 0,73$  (1:100) e  $2,39 \pm 0,66$  (1:10) ed infine di  $3,61 \pm 0,58$  (1:1000),  $5,06 \pm 0,93$  (1:100) e  $5,83 \pm 1,00$  (1:10), in risposta, rispettivamente, al feromone naturale, all’analogo di sintesi ed alla loro miscela. Mentre, per la cellula B, i valori delle frequenze di scarica (espressi come numero di spike/400 msec), sono di  $0,50 \pm 0,22$  (1:1000),  $1,39 \pm 0,41$  (1:100) e  $1,61 \pm 0,44$  (1:10), di  $1,50 \pm 0,50$  (1:1000),  $1,00 \pm 0,26$  (1:100) e  $1,44 \pm 0,48$  (1:10) ed infine di

1,22 ± 0,39 (1:1000), 1,17 ± 0,28 (1:100) e 2,56 ± 0,82 (1:10), in risposta, rispettivamente, al feromone naturale, all'analogo di sintesi ed alla loro miscela. Le differenze statisticamente significative sono state calcolate mediante il test "t-Student" ( $p \leq 0,05$ ).

Questi dati suggeriscono quindi che l'analogo OXP-04 ha provocato, puro o aggiunto al (+)disparlure, una risposta della cellula A simile a quella del feromone, anche se con un probabile meccanismo di azione differente in accordo ai diversi profili di scarica dei potenziali d'azione evocati dai due composti.

Nell'insieme, il confronto tra le risposte ai due analoghi e quella ottenuta con il feromone sessuale suggerisce che: a) i due neuroni sensoriali contenuti nei sensilli tricoidei di *L. dispar* sono in grado di legare, oltre al (+)disparlure, anche molecole strutturalmente modificate rispetto al feromone stesso, come i due analoghi di sintesi testati; b) il meccanismo d'azione attraverso cui l'analogo agonista interagisce con gli stessi recettori del (+)disparlure appare differente da quello del feromone.

Questa indagine contribuisce dunque alla comprensione del meccanismo d'azione degli analoghi, elemento indispensabile per la messa a punto di nuove molecole in grado di competere efficacemente con il feromone naturale.

*c) Analisi comportamentale comparata dell'efficacia degli analoghi rispetto al feromone mediante l'utilizzo di trappole innescate con un "dispenser" inerte e di uno a rilascio graduale quale il PVC.*

Per testare in campo l'attività degli analoghi di sintesi sono state realizzate delle trappole adesive del tipo "Delta Trap closed". Queste sono state innescate con il (+)disparlure, con il 4-(1-ossaspiro[2.2]pent-2-il)butan-1-olo (OXP-04), con il 2-decil-1-ossaspiro[2.2]pentano (OXP-01) e con una miscela degli stessi, in rapporto di 1:1, con il (+)disparlure. Con ciascuna delle sostanze, diluite 1:100 per OXP-04 e 1:10 per OXP-01, sono state innescate sei trappole. Le stesse sono state appese, a circa 1,5 metri dal suolo, ad alberi di sughera, distanziati di 55-60 metri e disposti in

tre file parallele, di sei piante ciascuna, orientate in direzione ESE - WNW. I punti stabiliti per il posizionamento delle trappole sono stati localizzati sul terreno con l'ausilio del sistema GPS. Sono state inoltre utilizzate come controllo sei trappole prive di esca. E' stato adottato uno schema sperimentale a blocchi randomizzati. I dati sulle catture dei maschi, rilevati a 48-96 ore dall'esposizione delle trappole, sono stati sottoposti all'analisi della varianza ed è stata calcolata la minima differenza significativa ( $p \leq 0,05$ ). Sono stati inoltre stimati i valori medi dei parametri climatici presenti durante la prova.

Le molecole sono state testate sia in condizioni di adsorbimento su "dispenser" inerte (una striscia di carta bibula come substrato), che su un dispenser a rilascio graduale, quale il polivinilcloruro (PVC). Quest'ultimo infatti, già impiegato con successo nel controllo di questo ed ad altri insetti di interesse agronomico, viene descritto in letteratura come un substrato in grado di ottimizzare il rilascio nell'aria delle molecole, rendendole più stabili ed opponendosi, ad esempio, all'elevata volatilità che comporta il rapido decadimento della loro attività biologica sull'insetto.

Le prove comportamentali hanno dimostrato da una parte che il potere attrattivo dell'analogo 4-(1-ossaspiro[2.2]pent-2-il)butan-1-olo (OXP-04), alla diluizione intermedia 1:100, è superiore a quello del feromone naturale alla stessa diluizione e dall'altra, che il potere attrattivo del (+)disparlure è ridotto quando miscelato con l'analogo 2-decil-1-ossaspiro[2.2]pentano (OXP-01), alla diluizione 1:10.

Infatti, la figura 15A mostra i valori medi  $\pm$  errore standard (ES) relativi al numero di maschi di *Lymantria* catturati con OXP-01, il feromone naturale e la miscela dei due, nell'arco temporale di 48 h. Questi dati indicano quindi che OXP-01 è di per sé poco attrattivo e che il potere attrattivo del feromone è statisticamente diminuito quando si trova in miscela con l'analogo. Infatti, i valori (espressi come catture/trappola) sono di  $1,50 \pm 0,50$  per OXP-01,  $8,50 \pm 1,50$  per OXP-01 + (+)disparlure e di  $42,50 \pm 9,50$  per il feromone naturale. Le conte del numero di maschi catturati con le trappole innescate con l'analogo OXP-01, dotato di potere inibitorio sul feromone, indicano che questa molecola conserva la capacità di contrastare l'effetto attrattivo del feromone sui maschi per tutto l'intervallo temporale considerato (48 h).

I risultati mostrati in figura 15B rappresentano invece i valori medi ( errore standard (ES) del numero di insetti catturati con l'analogo di sintesi OXP-04, nell'arco temporale di 48h, confrontati con il numero di insetti catturati con il (+)disparlure e con la loro miscela. Questi valori (espressi come catture/trappola) sono di 6,83 ( 1,19 per il feromone naturale, di 11,00 ( 0,93 per l'analogo di sintesi OXP-04 e di 12,50 ( 1,59 per la miscela dei due.

Non sono state riscontrate differenze significative riguardo al tipo di “dispenser”.

Per contro, i risultati indicano che l'utilizzo di un substrato a PVC ottimizza, almeno nell'ambito delle 96 h testate, il rilascio dell'analogo OXP-04. In questo modo viene contrastata l'elevata volatilità di questa molecola, in modo tale che il suo maggior potere attrattivo rispetto al feromone non sia limitato a tempi brevi, come accade quando la molecola viene dispensata sul substrato inerte, ma venga prolungato nel tempo.

Inoltre, sulla base dell'aumentato numero di catture osservato alle 96 h con l'analogo OXP-04 rispetto al feromone, si può ipotizzare che le prestazioni della molecola vengano ulteriormente potenziate da un rilascio di tipo PVC-controllato. In altre parole è possibile ipotizzare un protocollo sperimentale in cui i rapporti di concentrazione analogo/PVC possano essere ottimizzati.

*d) Analisi comportamentale sull'efficacia a lungo termine degli analoghi del feromone mediante utilizzo di un “dispenser” a PVC, effettuata in una sughereta.*

Per ottenere ulteriori dati circa la possibilità di potenziare l'attività degli analoghi del feromone mediante un rilascio graduale di tipo PVC - dipendente per tempi di esposizione ancora più lunghi rispetto a quelli considerati nei precedenti esperimenti, è stata realizzata una nuova prova comportamentale in campo nel mese di Luglio 2008 e luglio 2009 nella Sughereta Sperimentale di Cusseddu in agro di Tempio. Allo scopo sono state impiegate, per la prima volta, delle trappole acquistate dalla ditta americana “GEMPLER'S®” del tipo “SCENTRY Milk Carton

Gypsy Moth TRAP”, già utilizzate con successo, come riportato in letteratura, nel controllo del lepidottero defogliatore.

Il basso numero di catture rilevate durante le prove, 37 insetti nell'intero periodo di osservazione, non ha consentito di ottenere dati sufficienti per fare confronti statisticamente significativi tra l'attività delle diverse sostanze. Ciò può essere dovuto alle avverse condizioni meteorologiche che hanno certamente limitato l'attività di volo e quindi la capacità di spostamento dei maschi adulti dell'insetto, come peraltro dimostrato dall'analisi dei parametri climatici, secondo cui nel corso dei quindici giorni di esposizione delle trappole all'insetto si sono avute temperature inferiori alla media del periodo e giornate di vento.

Nel corso delle prove comportamentali effettuate in campo si è osservato che il (+) disparlure ha conservato la propria attività per tutto l'intervallo temporale considerato (15 giorni). Inoltre, l'analogo OXP-04 è risultato attivo almeno fino al nono giorno di esposizione all'aria. Quindi un substrato a rilascio graduale quale il PVC ha apportato, nell'intervallo di tempo considerato, notevoli vantaggi sul rilascio di questa molecola, facendo in modo che il suo maggior potere attrattivo rispetto al feromone non fosse limitato a tempi brevi, come accade quando la molecola viene dispensata su substrati inerti.

La prova effettuata è stata utile anche in quanto ha evidenziato come diversi fattori possono influire sull'attività in campo delle molecole testate. Tali fattori sono rappresentati principalmente da parametri ambientali e da parametri legati alla densità della popolazione adulta del lepidottero. Infine particolare attenzione deve essere rivolta alla tecnica di preparazione ed utilizzo dei dispensers anche in relazione ai tempi di esposizione.

Per quanto riguarda il funzionamento delle nuove trappole testate, si è osservato che alcuni individui erano in grado, dopo la cattura, di abbandonare la trappola, per cui potrebbe essere opportuno apportare delle modifiche ad esempio inserendo all'interno una sostanza abbattente o delle superfici adesive. Si dovrebbe inoltre verificare se l'insetto ha difficoltà ad entrare nella trappola stessa. In definitiva bisognerebbe accertare se questi dispositivi di cattura, ampiamente utilizzati negli Stati Uniti, sono efficaci nei nostri ambienti (vedi giorni di maestrale), come anche in relazione alla densità di popolazione adulta dell'insetto bersaglio.

#### 4.4 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il lepidottero *Lymantria dispar* L. è causa di un elevato impatto sull'intero ecosistema e rende necessaria l'applicazione di continui programmi di monitoraggio delle popolazioni dell'insetto per prevedere dove si verificheranno le condizioni più favorevoli al suo sviluppo e per intervenire in modo selettivo quando la densità del defogliatore supera i livelli critici.

Come già detto, il sistema olfattivo antennale è di vitale importanza per il successo riproduttivo della *L. dispar*; Infatti, grazie a questo sistema, può essere richiamato dalle femmine, mediante l'emissione nell'ambiente del feromone sessuale. In accordo con i dati presenti in letteratura (Shabang et al., 1999), i sensilli di tipo T, che presentano due o più neuroni chemosensoriali, dovrebbero essere specifici per la chemorecezione olfattoria del feromone sessuale. Tuttavia come dimostrano i risultati ottenuti con gli esperimenti elettrofisiologici, nei due neuroni contenuti nei sensilli di tipo T, sono presenti recettori in grado di legare anche altri tipi di molecole, come il 2-decil-1-ossaspiro[2.2]pentano (OXP-01) ed il 4-(1-ossaspiro[2.2]pent-2-il)butan-1-olo (OXP-04), ovvero i due analoghi di sintesi testati.

I risultati elettrofisiologici indicano che, nei maschi adulti di *Lymantria*, i due analoghi del feromone OXP-01 ed OXP-04, interferiscono con il feromone sessuale (+)disparlure. Infatti, nelle derivazioni EAG sebbene l'OXP-01 abbia mostrato di per sé un effetto stimolante trascurabile sui recettori antennali del maschio, diminuiva fortemente la risposta al (+)disparlure quando la miscela veniva presentata alla diluizione più bassa (1:10). Invece, l'OXP-04 alla diluizione intermedia (1:100), evocava una risposta più forte della corrispondente concentrazione di (+)disparlure e, alle due diluizioni maggiori la miscela evocava una risposta di tipo additivo.

I dati in letteratura indicano che i sensilli olfattivi degli insetti contengono tipicamente 2-4 neuroni recettoriali; in *Lymantria*, ciascun sensillo tricoideo sembra contenere due neuroni olfattivi, ciascuno dei quali risponde al disparlure (+) e (-), e che sono generalmente indicati come cellule A e B (Keil, 1982).

Da questi sensilli tricoidei ho derivato due tipi di spike, distinguibili in base alla forma d'onda, per i quali ho mantenuto la nomenclatura (A e B) della letteratura.

Entrambe le cellule rispondevano al feromone e/o a ciascuno dei due analoghi in diversa misura con la cellula A normalmente a frequenza più alta della B. I valori di frequenza delle scariche a spike della cellula A erano tipicamente maggiori in risposta al (+)disparlure rispetto all'uno o all'altro degli analoghi, ma non variavano apprezzabilmente per la cellula B. La miscela feromone + OXP-01 produceva una forte riduzione nella frequenza di A, ma quasi nessun effetto nella frequenza di B. Invece, l'aggiunta di OXP-04 produceva un effetto additivo delle risposte di entrambe le cellule.

In accordo con i dati elettrofisiologici i risultati comportamentali in campo hanno mostrato che una diluizione 1:10 di OXP-01 evocava un livello trascurabile di attrazione sui maschi di *Lymantria*, mentre diminuiva fortemente il potere attrattivo del feromone quando i due composti erano presentati in miscela. Alla diluizione 1:100, OXP-04 mostrava un maggior livello di attrattività di quello evocato dal solo feromone alla stessa diluizione. Le trappole innescate con la miscela portavano ad un più alto numero di catture di maschi, risultando cioè più attrattive di quelle innescate col feromone.

In conclusione, i risultati ottenuti dal confronto dei due analoghi con il feromone suggeriscono che l'attivazione della cellula A e/o il rapporto delle risposte delle cellule A e B sembrano essere in qualche modo in relazione con la percezione del feromone come risulta dai diversi effetti prodotti dai due analoghi in relazione alle osservazioni comportamentali.

Inoltre la tecnica ad EAG ha reso possibile l'utilizzo dell'apparato olfattivo antennale dei maschi di *L. dispar* quali "sensori" del rilascio in tempo reale del feromone sessuale da parte delle femmine. In questo, questa tecnica ha permesso di studiare il coinvolgimento delle amine biogene (octopamina e serotonina) nel complesso meccanismo di liberazione del feromone sessuale ("calling behaviour"; risultati non mostrati).

## **4.5 ABSTRACT**

The female gypsy moth *Lymantria dispar* produces a single-component sex pheromone, called (+)-disparlure (2-methyl-7,8-epoxy-octadecane), for upwind

attraction of conspecific males for mating. A number of oxaspiropentane derivatives (OXPs) were tested as potential (+)-disparlure analogues, with the aim of identifying any possible interaction of these compounds, be it additive, synergetic, or inhibitory, with the pheromone response in the male gypsy moth *Lymantria dispar*. As assessed by male electroantennograms, 2 OXPs, 2-decyl-1-oxaspiro[2.2]pentane (OXP-01) and 4-(1-oxaspiro[2.2]pent-2-yl)butan-1-ol (OXP-04), were found to be effective. OXP-01 had no stimulatory effect but strongly decreased the response to (+)-disparlure in a blend in a 1:1 ratio. By contrast, OXP-04 proved to be more stimulating than (+)-disparlure and also had an additive effect in the blend. Single-cell recordings from the sensilla trichoidea showed the activity of 2 cells, one of which responded to (+)-disparlure. OXP-01 reduced the stimulating effectiveness of pheromone by silencing the pheromone-responding unit when the 2 compounds were presented in blend, whereas OXP-04 mimicked the pheromone response, evidenced by exciting the pheromone-responding neuron when tested alone. Behavioral observations are in agreement with electrophysiological results.

Moreover, by using the male EAG as a biosensor of real-time release of sex pheromone from whole calling females I found that this process time coupled with extension movements of the ovipositor (calling behaviour) is modulated by Serotonine (5-HT) and Octopamine (OA).

## 4.6 COMUNICAZIONE DEI RISULTATI

**A. Carboneschi, R. Crnjar, A. Frongia, A. Liscia, C. Masala, F. Secci, P.Solari, G. Sollai (2010).** A sex pheromone analogue as a tool for biological control of *Lymantria dispar* L. populations. *OILB. (ARTICLE IN PRESS)*. *Ringraziamenti per lavoro tecnico: N.Altea.*

**N. Altea, R. Crnjar, C. Masala, P. Solari, G. Sollai, A.Liscia (2009).** Analysis of the spike activity from nerves involved in the control of the “calling behavior” in the female gypsy moth *Lymantria dispar*: role of the biogenic amines octopamine and serotonin. *III Riunione Nazionale dei Dottorandi di Fisiologia, Bertinoro (FC)*.

## **5. *Culicoides imicola* (Kieffer)**

### **5.1 SCOPO DELLA RICERCA**

Lo scopo della mia ricerca è stato quello di sviluppare nuove neurobiotecnologie per il controllo razionale dell'entomofauna di interesse veterinario ed ambientale. Per far questo ho verificato in *C. imicola* (Kieffer), in laboratorio ed in campo, la capacità di stimolazione e di attrazione di alcune molecole, note in letteratura per attrarre altre specie di *Culicoides* (Blackwell et al., 1996; Bhasin et al., 2001; Mordue, 2003; Mands et al., 2004).

Pertanto, tenendo conto degli studi di Liscia et al. (1982) e Crnjar et al. (1989), il mio lavoro di tesi è stato articolato secondo i seguenti punti:

1. verificare l'esistenza di chemosensilli nella regione addominale delle femmine di *C. imicola*, studiarne la morfologia per ottenere informazioni sulla loro funzione. Infine studiare il ruolo eventuale di questi chemosensilli sia nella scelta dei siti di ovideposizione che nella localizzazione dell'animale ospite;
2. indagine olfattometrica dei sensilli dell'ovipositore in risposta ai kairormoni presenti nella pelle e nelle urine dell'animale ospite e verso l'olio di sesamo, confrontati con le risposte olfattometriche ottenute dai sensilli antennali in seguito a stimolazione con gli stessi stimoli;
3. testare in campo se queste sostanze sono in grado di competere con l'animale-ospite e quindi utilizzarle per contenere la popolazione di insetti.

### **5.2 MATERIALI E METODI**

#### **5.2.1 Insetti**

Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti su femmine adulte, non in cattività, provenienti dall'agro di Samassi, località Pimpisu (Sardegna) e precisamente dai

terreni di proprietà della cooperativa agricola 27 Febbraio. Questi insetti sono stati catturati utilizzando trappole a luce la cui efficacia è stata ben dimostrata da Acuff (1976) e Braverman et al. (1977). Gli esemplari sono stati tenuti in gabbie e nutriti con una soluzione di zucchero fino al raggiungimento del laboratorio di Fisiologia generale, e fino al loro impiego per gli esperimenti.

### 5.2.2 *Microscopia Elettronica a Scansione*

La microscopia elettronica a scansione ad alta definizione (HRSEM) è stata eseguita su dodici femmine di *C. Imicola*. I campioni sono stati immersi in acqua bollente e tetraclorometano per 7-8 minuti e poi lavati 4-5 volte nella stessa soluzione raffreddata, secondo la stessa procedura utilizzata da Cuperus (1985) per pulire la superficie dei sensilli, che solitamente è coperta da impurità. Tutti i *Culicoides* sono stati poi asciugati all'aria e posizionati al microscopio elettronico sul lato ventrale per osservare al meglio i sensilli. L'acquisizione delle immagini è stata ottenuta dal software Quartz PCI versione 5 (Quartz Imaging Corporation, Vancouver, Canada).

### 5.2.3 *Soluzioni stimolanti*

Sull'ovopositore di *C. imicola* sono stati testati i seguenti composti:

- L-(+)-lactic acid e 1-octen-3-ol (kairormoni presenti nella pelle dell'animale ospite; Bhasin et al. 2000; Mands et al. 2004)
- 3-ethyl-phenol e 4-propylphenol (kairormoni presenti nelle urine dell'animale ospite; Bhasin et al. 2001)
- Olio di semi di sesamo (un potente attrattivo per *C. imicola*; Sollai et al. 2007).

Ogni composto è stato prima solubilizzato (100 µg/ml) in diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), e dopo una soluzione a 50 µl di volume è stata prelevata e deposta su una striscia di carta da filtro ripiegata (80x50 mm), fino ad ottenere un dosaggio di 5 µg. Per ottenere concentrazioni minori, con diluizioni decadiche, dal preparato di diclorometano precedentemente preparato sono stati prelevati 50 µl; questi sono

stati deposti su carta da filtro fino a ottenere un dosaggio di 0,5 µg. Ogni composto è stato testato in sequenze crescenti.

Faccio presente che il diclorometano è stato utilizzato perché evapora prima che gli esperimenti abbiano inizio. Studi elettrofisiologici preliminari hanno dimostrato che “di per sé” la carta da filtro non ha un effetto stimolante quando il diclorometano sia evaporato. Prima di ogni stimolazione, in ciascun esperimento, viene testata la risposta all’aria ed il valore ottenuto viene usato come controllo e sottratto dal valore dello stimolo testato.

#### *5.2.4 Esperimenti comportamentali*

Gli esperimenti comportamentali sono stati effettuati in una azienda zootecnica, localizzata a Samassi. La scelta di questa azienda è stata dettata dalle sue caratteristiche: a) un ovile completamente o parzialmente chiuso, dove vengono ricoverate le bestie; b) presenza di pozze d’acqua stagnante nelle vicinanze, dove inizia e si completa il ciclo vitale dell’insetto. Nell’ovile sono state posizionate delle trappole a luce in tre diversi punti appese a 1,4 m dal livello del suolo e distanziate per minimizzare le interferenze reciproche (Fig.16 A e B):

1. all’interno dell’ovile, nella zona di stazionamento del gregge durante il ricovero (trappola #1);
2. all’interno dell’ovile, lontano dalla zona di stazionamento del gregge (trappola #2);
3. all’esterno dell’ovile (trappola #3).

Il monitoraggio delle catture degli insetti è stato effettuato da aprile 2008 a settembre 2010 per tre volte la settimana, quando la popolazione degli insetti era relativamente abbondante (maggio-ottobre). La cattura è stata eseguita durante la notte, dal tramonto all’alba; questi venivano raccolti vivi nel fondo di una maglia appesa al di sotto della trappola a luce. Al mattino, dopo il recupero, gli insetti erano in parte trasferiti in una gabbia per gli studi di elettrofisiologia ed in parte congelati. I campioni esaminati elettrofisiologicamente sono stati successivamente congelati e la somma dei due lotti ha prodotto il numero totale delle catture. Altri

insetti di specie differenti da *C. imicola* sono stati scartati. Quando venivano raccolti pochi o nessun *Culicoides*, a causa di condizioni metereologiche avverse o del malfunzionamento della trappola, la raccolta era eseguita la notte successiva.

Durante le tre prove settimanali le trappole erano innescate a rotazione. Il protocollo sperimentale prevedeva un doppio controllo: a) una fase iniziale in cui tutte le trappole non erano innescate (che rappresentava il primo controllo, per valutare la dinamica di popolazione); b) una delle tre trappole sempre non innescata (secondo controllo), le altre due erano innescate con uno degli stimoli in esame (olio di semi di sesamo, kairomone), inserendo in ognuna di esse due strisce di carta da filtro (1 x 3 cm/ognuna).

Lo schema utilizzato era il seguente:

- trappola #1 innescata con olio di semi di sesamo e 1-octen-3-ol;
- trappole #2 e #3 con olio di semi di sesamo, 1-octen-3-ol, 3-ethylphenol e 4-propylphenol.

Nel caso delle trappole #2 e #3, le sostanze venivano testate in sequenza randomizzata. I test comportamentali sono stati eseguiti in modo tale che le occasioni di cattura fossero le stesse per ciascun dei composti testati.

Per mettere in relazione il potere attraente dei kairomoni con lo stato fisiologico degli insetti di sesso femminile, abbiamo contato il numero di insetti femmina e verificato l'eventuale presenza di sangue e/o lo stato di maturazione degli ovari.

## **5.3 RISULTATI**

### *5.3.1 Risultati morfologici*

Come mostrato nella Fig.17a, l'addome delle femmine di *C. imicola* comprende otto segmenti di cui l'ultimo è l'ovopositore, che termina con una coppia di strutture laminari chiamate valve. Sia l'addome che l'ovopositore sono coperti da microtrichia e sensilli tricoidei (Fig.17a-h), che possono essere raggruppati in 3 differenti classi:

- sensilli lisci non porosi di diversa lunghezza e disposti in file sulla superficie dell'ovopositore (circa 10 per lamina); al centro dell'ovopositore sono presenti due di questi sensilli più lunghi (NP<sub>1</sub>, Fig.17b).
- sensilli dotati di una superficie solcata da coste longitudinali (circa 10-12 per lamina; NP<sub>2</sub> in fig.17b e nel relativo ingrandimento).
- sensilli con uno stelo spinoso a coste, multiporosi e con superficie rigata, che li inquadra tra i sensilli di tipo chetico, per i quali è stato suggerito un ruolo olfattivo (Dey et al., 1995).

Come mostrato in fig.17b-h, questi sensilli possono essere divisi ulteriormente in due morfotipi differenti, che sono chiamati:

- di tipo 1 (Fig.17b-d)
- di tipo 2 (Fig.17e-h)

I sensilli di tipo 1 sono presenti sia nell'ovopositore che nell'addome (2-4 per segmento), mentre quelli di tipo 2 sporgono nel primo dei 4 segmenti addominali dalle pieghe della membrana intersegmentale (2 per segmento).

### 5.3.2 Risultati elettrofisiologici

Lo scopo della mia ricerca era quello di verificare elettrofisiologicamente la capacità dei sensilli dell'ovopositore di rispondere a molecole chimiche in fase gassosa e di confrontare le risposte di questi con quelle ottenute dai chemosensilli olfattivi (Sollai et al., 2007), riportati nelle figg.18 e 19.

La figura 20 A mostra alcuni esempi di potenziali sommati derivati dai chemosensilli olfattivi addominali in risposta all'aria (controllo) e ai kairormoni L-(+)-lactic acid, 1-octen-3-ol, 3-ethylphenol e 4-propylphenol. Avendo queste risposte forma ed andamento temporale simili a quelle olfattive tipiche dell'elettroantennogramma, per analogia sono state chiamate derivazioni ad "elettroabdomengramma" (EAbG).

Gli istogrammi in figura 20 B mostrano che i sensilli addominali hanno prodotto una risposta al L-(+)-lactic acid di  $0,82 \pm 0,14$  e  $0,91 \pm 0,11$  mV e al 1-octen-3-ol di  $0,72 \pm 0,10$  e  $0,79 \pm 0,08$  mV a 0,5 e 5  $\mu$ g, rispettivamente.

La stessa figura mostra che la risposta più elevata è stata ottenuta in seguito a stimolazione con entrambi i kairomoni presente nell'urina: 3-ethylphenol ( $0,95 \pm 0,14$  e  $1,44 \pm 0,20$  mV, a 0,5 e 5  $\mu\text{g}$ ) e 4-propylphenol ( $0,84 \pm 0,16$  e  $1,52 \pm 0,25$  mV, a 0,5 e 5  $\mu\text{g}$ ). Indipendentemente dai composti e dai dosaggi testati, le risposte erano sempre significativamente maggiori rispetto a quelle ottenute con il controllo (aria;  $0,20 \pm 0,10$  mV). Mediante la tecnica di derivazione a "single sensillum", la funzione olfattiva dei sensilli di tipo 1 a coste spinose è stata confermata, nonostante lo studio sia ancora preliminare per la difficoltà di derivare dai singoli sensilli localizzati tra le pieghe della membrana intersegmentale.

Le analisi mostrano che almeno due cellule chemosensoriali rispondono al L-(+)-lactic acid (Fig. 21) che, ricordiamo, rappresenta uno stimolo attraente per molti insetti ematofagi e anche un componente della pelle dell'animale ospite (Bhasin et al., 2000).

### 5.3.3 Risultati comportamentali

Gli esperimenti in campo hanno dimostrato che tutte le trappole luminose (#1 - #3) innescate con uno dei composti test 1-octen-3-ol, olio di semi di sesamo, 3-ethylphenol e 4-propylphenol, esercitano un effetto attrattivo sulle femmine di *C. imicola* statisticamente maggiore rispetto alle trappole non innescate (Fig. 22).

In particolare, la trappola #1, situata nelle immediate vicinanze degli ovini e quindi in competizione con la fonte di attrazione naturale rappresentata dalle pecore stesse, catturava comunque un numero di insetti statisticamente maggiore rispetto a quella non innescata.

Infatti, questa trappola ha catturato una percentuale di insetti pari a  $155,17\% \pm 27,88$  e  $339,22\% \pm 103,93$  rispetto ai controlli ( $103,18\% \pm 27,94$  insetti, posto come 100% di insetti catturati) quando è stata innescata rispettivamente con 1-octen-3-ol, un kairomone presente nella pelle dell'animale ospite (Bhasin et al., 2000; Mands et al., 2004) e olio di semi di sesamo, un potente attrattivo per *C. imicola* (Sollai et al., 2007).

Per quanto riguarda la trappola #2, posta dentro l'ovile ma lontana dalle pecore, il potere attrattivo di questi composti aumentava fortemente fino a raggiungere il suo

massimo quando la trappola veniva innescata con 4-propylphenol o con olio di semi di sesamo. Infatti, la cattura è stata di  $1240,91\% \pm 227,52$  e di  $1374,85\% \pm 221,66$  rispetto al controllo ( $8,46\% \pm 3,44$  insetti = 100% degli insetti catturati). Il 1-octen-3-ol ed il 3-ethylphenol hanno catturato delle percentuali di insetti pari a  $709,09\% \pm 59,09$  e  $392,95\% \pm 36,86$  rispetto al controllo.

Il numero di insetti catturati con la trappola #3, posizionata all'esterno dell'ovile e quindi anch'essa lontana dalle pecore, è quantitativamente simile a quello della trappola #2, con un picco per il 4-propylphenol  $1059,05\% \pm 133,98$  rispetto al controllo ( $8,75\% \pm 2,10$  insetti, 100% di catture).

Per quanto riguarda la correlazione tra attrattività dei kairomoni e stato fisiologico delle femmine, la figura 23 mostra che, indipendentemente dalla posizione della trappola, il 1-octen-3-ol ha attirato un numero di femmine gravide più elevato rispetto a quello delle trappole non innescate o innescate con gli altri composti testati.

Sulla base dei nostri risultati non può essere stabilita una correlazione tra l'attrattività dei kairomoni rispetto alle femmine sazie di sangue, poiché quest'ultimo era presente solo in cinque insetti su 2226 esemplari catturati.

Infine, è interessante notare che, nell'ambito di tutte le catture effettuate, è stato ritrovato un solo esemplare di *C. imicola* di sesso maschile, coerentemente con quanto suggerito da Braverman (1977), secondo cui il sito di accoppiamento è lontano dal luogo di stazionamento dell'animale ospite, presso cui sono state posizionate le trappole.

## **5.4 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI**

Come in altri insetti ematofagi, i kairomoni presenti nel respiro, nella pelle e nell'urina delle pecore rappresentano i principali stimoli olfattivi utilizzati dagli insetti per localizzare i loro ospiti (Bhasin et al., 2000, 2001; Mands et al., 2004). Il presente lavoro fornisce la prova che nell'insetto *C. imicola* non solo le antenne ma anche l'intero addome sono dotati di sensilli olfattivi sensibili a un certo numero di kairomoni. Questi dati nel loro insieme suggeriscono un ruolo di queste strutture

nella scelta del sito di deposizione delle uova ed eventualmente nella localizzazione dell'animale ospite.

I risultati morfologici dimostrano la presenza di sensilli addominali multiporo a sensibilità olfattiva e suggeriscono il loro coinvolgimento nella ricerca del sito di ovideposizione e nella localizzazione dell'animale ospite.

Il ruolo di chemorecettori olfattivi dei sensilli chetici è confermato anche dai risultati elettrofisiologici qui riportati. Infatti, L-(+)-lactic acid, 1-octen-3-ol, 3-ethylphenol e 4-propylphenol hanno evocato una risposta ad elettroabdomengramma simile alle risposte ad elettroantennogramma ottenute in seguito a stimolazione dei sensilli antennali. Inoltre, il ruolo olfattivo dei sensilli di tipo 1, che si trovano sull'ovopositore dell'insetto, è ulteriormente sostenuto da registrazioni a "single sensillum" che mostrano la presenza di unità chemosensoriali che rispondono al L-(+)-lactic acid; questo stimolo rappresenta un tipico attrattante olfattivo per molti insetti ematofagi (Bhasin et al., 2000), utilizzato per studiare la funzione olfattiva ed è anche un componente dell'odore delle pecore.

I dati elettrofisiologici supportano l'ipotesi che il 1-octen-3-ol, 3-ethylphenol e 4-propylphenol, componenti della pelle dell'animale ospite e/o delle urine, sono kairomoni anche per *C. imicola*, come precedentemente indicato per altri *Culicoides* sp. (Bhasin et al., 2000, 2001; Mordue Luntz, 2003; Mands et al., 2004).

I risultati morfologici e quelli elettrofisiologici sono confermati dalle prove comportamentali. Infatti, gli esperimenti in campo hanno mostrato che tutte le trappole a luce (#1 - #3), innescate con ciascuno dei composti testati, in tutti i casi hanno evocato un grado di attrazione maggiore su femmine di *C. imicola* rispetto alle relative trappole non innescate (di controllo). Il numero di insetti catturati è stato significativamente più alto, indipendentemente dalla posizione della trappola, sia quando erano situate in vicinanza delle pecore (trappola # 1), sia quando posizionate all'interno dell'ovile, ma lontane dagli ovini (trappola #2) che quando posizionate fuori dall'ovile e lontane dalle pecore (trappola #3). Le trappole a luce sono comunemente utilizzate per monitorare le popolazioni di insetti attirati dalla luce (Braverman e Linley, 1993; Bishop et al., 2000; Gerry et al., 2009); nel nostro caso, il ruolo della luce sembra essere irrilevante, dal momento che tutti i trattamenti sono risultati significativamente superiori ai controlli, così che l'effetto

attraente sulle femmine di *C. imicola* sia dovuto sostanzialmente al kairomone utilizzato.

I risultati ottenuti con le trappole #2 e #3, lontane dalle pecore, in cui gli insetti dovrebbero essere meno numerosi, sono una prova del fatto che tutte le molecole testate, ma specialmente il kairomone 4-propylphenol, sono potenti attrattivi per l'insetto *C. imicola*.

Braverman e collaboratori (2000) hanno dimostrato che *Culicoides sonorensis* non è attratto dal 1-octen-3-ol da solo, tranne che a concentrazione molto elevata (11,5 mg/h) e questo suggerisce l'esistenza di differenze specie specifiche.

I composti da me testati si sono dimostrati più efficaci del potente attrattivo naturale, rappresentato dalle stesse pecore; infatti la trappola #1, che si trova in prossimità delle pecore, catturava un numero più elevato di insetti rispetto al controllo quando veniva innescata con ciascuno dei composti testati.

Inoltre, in accordo con i nostri dati, si può affermare che il 1-octen-3-ol è un buon candidato come kairomone per l'ovideposizione di *C. imicola*, dato il suo enorme potere attrattivo sulle femmine gravide rispetto agli altri composti testati (Fig. 23). I risultati della presente ricerca mostrano anche che nell'insetto *C. imicola* tutto l'addome, compreso l'ovopositore, è dotato di un gruppo di sensilli multiporo che presentano una sensibilità olfattiva ai kairomoni presenti nella pelle (L-(+)-lactic acid e 1-octen-3-ol) e nelle urine (3-ethylphenol e 4-propylphenol) dell'animale ospite, così come al potente attrattivo olio di semi di sesamo.

È ben noto che l'input olfattivo medi una varietà di comportamenti riproduttivi negli insetti, come la scelta dei siti di ovideposizione, la localizzazione dell'animale ospite, la ricerca del partner, ecc.

Alla luce dei miei risultati, vista la capacità dei chemosensilli addominali di rispondere ai kairomoni dell'animale ospite, è possibile attribuire un ruolo olfattivo al sistema chemorecettoriale addominale in grado di mediare le funzioni riproduttive dell'insetto, in aggiunta al contributo dato dall'attività antennale.

Il presente studio su *Culicoides imicola* ha dimostrato che le trappole innescate con composti presenti nel vello, nel fiato e nelle urine dell'animale ospite, quali il L-(+)-lactic acid, 1-octen-3-ol, 3-ethylphenol e 4-propylphenol, e innescate con l'olio di sesamo, sostanza che era risultata essere un potente attrattivo per *C. imicola* (Sollai

et al., 2007), sono in grado di attrarre un numero di insetti maggiore dello stesso animale. Inoltre il 1-octen-3-ol si è dimostrato in grado di attirare un numero di insetti femmine gravide in quantità maggiori degli altri composti, candidandolo come un kairomone da ovideposizione.

Questo studio ha anche individuato le strutture chemorecettoriali coinvolte nella localizzazione dei suddetti composti. Queste sono risultate essere dei sensilli multipori (olfattori), presenti nell'intero addome dell'animale, incluso l'ovopositore. La loro localizzazione è coerente con il loro ruolo di indicatori del sito di ovideposizione (Sollai et al., 2010).

Sulla base di quanto esposto, si suggerisce l'utilizzo di trappole a luce del tipo ad accumulo di energia solare (che non necessitano quindi di una fonte di energia elettrica nell'ovile), innescate con le sostanze da noi testate ed in particolare l'olio di sesamo ed il 1-octen-3-ol, la cui reperibilità sul mercato ed il costo irrisorio rendono possibile il controllo delle popolazioni di *Culicoides* ad un costo sostenibile.

## **5.5 ABSTRACT**

A vast amount of literature has become available regarding electrophysiological and behavioural identification of host kairomones as olfactory cues detected by antennal receptors in different *Culicoides* spp., but no data are available on the presence of chemosensilla in the abdominal structures also as detectors of possible cues involved in oviposition site selection. The aim of the present study was to examine the presence and the possible role of abdominal olfactory sensilla in *Culicoides imicola*, vector of the blue tongue virus (BTV) disease for sheep, mediating the search for potential hosts and oviposition sites, by means of a morphological, electrophysiological and behavioural approach. The results reported here show that in the midge *C. imicola* the whole abdomen, comprising the ovipositor, are endowed with three morphotypes of multiporous sensilla that display olfactory sensitivity towards kairomones related to the host-animal skin such as L: -(+)-lactic acid and 1-octen-3-ol, to the host-animal urine such as 3-ethylphenol and 4-

propylphenol, and to the potent attractant sesame seed oil. Electrophysiological and behavioural data for the first time suggest in the midge the involvement of abdominal olfactory structures in the choice of the oviposition sites and allow in discussing their possible role in the host-animal localisation. Field experiments showed that light traps baited with the aforementioned compounds elicited a stronger degree of attractiveness on midges with respect to the unbaited traps (control), although to a different extent. Our results, while implying a number of considerations concerning the role of molecules tested as kairomones, also suggest their use in the control of the midge *C. imicola* population.

## **5.6 COMUNICAZIONE DEI RISULTATI**

**Sollai G, Solari P, Loy F, Masala C., Crnjar R, Liscia A (2010).** Morpho-functional identification of abdominal olfactory receptors in the midge *Culicoides imicola*. *J. Comp. Physiol. A, Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*. Ringraziamenti per lavoro tecnico: N. Altea.

## **6. *Ceratitis capitata* (Wiedemann)**

### **6.1 SCOPO DELLA RICERCA**

Nonostante la gran mole di dati esistenti in letteratura riguardanti la chemorecezione olfattiva negli insetti, poche notizie sono attualmente disponibili sulla sensibilità olfattiva della mosca mediterranea della frutta.

Il mio lavoro di tesi si inserisce in uno studio più ampio teso all'indagine morfo-funzionale degli organi olfattivi di *C. capitata* implicati nelle interazioni insetto/pianta ospite e nel comportamento riproduttivo.

Sulla base delle suddette considerazioni lo scopo della mia ricerca è stato quello di:

- a) acquisire ulteriori conoscenze sulla tipologia e topologia dei chemosensilli olfattivi su entrambe le superfici - mediale e laterale - delle antenne in insetti di sesso maschile e femminile,
- b) indagare, nei chemosensilli antennali, la sensibilità olfattiva in relazione al sesso, allo stato fisiologico (vergini o accoppiati) e alla diversa provenienza (insetti di laboratorio o “wild”) verso il frutto e il fogliame di alcune piante-ospite mediante l’uso della tecnica di derivazione ad elettroantennogramma (EAG) e mediante esperimenti comportamentali.

## **6.2 MATERIALI E METODI**

### *6.2.1 Insetti*

Gli esperimenti sono stati eseguiti sia su una colonia di insetti adulti di età compresa tra i 3 e 5 giorni, ricevuti allo stadio di pupa dai laboratori del Dipartimento di Biologia Animale dell’Università degli Studi di Pavia, e sia su esemplari selvatici provenienti dall'agro di Uta (Sardegna) con la collaborazione dell’ Agenzia AGRIS Sardegna (Regione Autonoma della Sardegna). Entrambe le colonie venivano successivamente allevate in condizioni standardizzate presso l’insettario della Sezione di Fisiologia Generale dell’Università degli Studi di Cagliari. Tutti gli insetti adulti sono stati alimentati con acqua, lievito e zucchero, a una temperatura di  $26 \pm 1^\circ \text{C}$  ed umidità relativa pari al 60-70 %.

### *6.2.2 Stimoli impiegati*

Sulle antenne di *Ceratitis capitata* sono stati testati frutti e fogliame di alcune piante-ospite quali arancia (*Citrus sinensis* L.), limone (*Citrus limon* L.), mela (*Malus domestica* Borkh.) e fico d’india (*Opuntia ficus indica* L.).

### *6.2.3 Esperimenti comportamentali*

Per gli esperimenti comportamentali di “scelta doppia” sono state usate due gabbie cubiche di 1 m di lato, una per gli individui di sesso maschile e una per quelli di sesso femminile. In ciascuna di tali gabbie sono stati introdotti, all’inizio di ogni giornata di osservazione, 100 esemplari vergini, cui sono state presentate, a intervalli regolari, coppie di frutti, appesi lungo la diagonale della gabbia, a circa 20 cm dal soffitto, in modo da risultare alla massima distanza consentita. Si è dunque proceduto a rilevare il numero di individui posatisi su ciascuno dei due frutti, sia durante i primi secondi di esposizione, sia dopo 2-3 minuti. Tramite prove preliminari si è stabilito che un’esposizione temporale breve costituisce il miglior metodo di osservazione, dato che esposizioni più prolungate sembrano creare fenomeni di adattamento e/o condizionamento negli insetti. La coppia di frutti veniva poi rimossa, si aspettava qualche minuto affinché eventuali adattamenti indotti dai frutti precedentemente testati cessassero e si esponevano gli insetti ad una successiva coppia di frutti.

Gli esperimenti sono stati condotti in condizione d’illuminazione naturale e uniforme, in ambiente non direttamente irraggiato.

In analogia con gli esperimenti elettrofisiologici, durante le prove comportamentali ho utilizzato i seguenti stimoli: arancia, limone, mela e fico d’india.

## **6.3 RISULTATI**

### *6.3.1 Risultati morfologici*

La figura 24 (A e B) mostra una micrografia a scansione elettronica della superficie dorsale della testa di un adulto di *C. capitata* in cui sono presenti le antenne. Ogni antenna, nell’insetto adulto, è formata da tre divisioni: la prima, quella basale a forma arrotondata, attraverso la quale l’antenna s’inserisce nella testa, prende il

nome di scapo; la seconda divisione, il pedicello, ed infine il flagello, formato da due pagine, una superiore ed una inferiore, sulla cui superficie cuticolare sono inseriti i sensilli olfattivi (Fig. 25), il cui numero, forma e distribuzione sono molto importanti per la diversa sensibilità olfattiva. In particolare, è stato possibile distinguere 4 tipi di sensilli, distribuiti su tutta la superficie dell'antenna in modo omogeneo:

- a) *sensilli tricoidei*: sono spiniformi con scanalature lungo la parete cuticolare, probabilmente privi di poro apicale, come dimostra l'estremità appuntita e quindi non identificabili in chemocettori da contatto (Fig. 25 A);
- b) *sensilli basiconici corti* a parete singola (SW): caratterizzati dalla presenza di un gran numero di pori lungo la superficie cuticolare che conferisce loro un aspetto bucherellato (Fig. 25 B);
- c) *sensilli basiconici clavati* caratterizzati da un'espansione terminale del sensillo (Fig. 25 C)
- d) *sensilli fiammati*: hanno una forma conica, punta arrotondata, parete scanalata nella porzione apicale e s'infossano nella cuticola all'interno di alveoli (Fig. 25 D);

### 6.3.2 Risultati elettrofisiologici

Le risposte EAG ottenute in seguito a stimolazione con frutti e foglie delle piante-ospite sono sempre state di tipo depolarizzante, cioè con una deflessione della curva verso il basso rispetto alla linea di base, come mostrano alcuni esempi di derivazioni EAG in fig. 26.

I grafici in fig. 27 mostrano i valori medi  $\pm$  errore standard (ES) delle risposte EAG dei sensilli antennali di maschi e femmine ai frutti (mandarancio, arancia, fico d'india, limone, mela) e alle foglie. Questi risultati indicano che:

- a) la sensibilità olfattiva dei maschi accoppiati allevati in laboratorio è statisticamente maggiore rispetto a quella delle femmine, mentre un risultato opposto si è ottenuto per gli insetti "wild";
- b) non sono state rilevate sostanziali differenze tra maschi e femmine vergini sia per quanto riguarda quelli allevati in laboratorio che quelli "wild";
- c) nell'ambito della categoria degli insetti accoppiati, i maschi allevati in

laboratorio mostrano una sensibilità statisticamente maggiore rispetto ai maschi “wild”, mentre un risultato opposto si è ottenuto per le femmine;

d) all'interno della popolazione degli insetti “wild”, i maschi vergini risultano più sensibili dei maschi accoppiati mentre le femmine vergini allevate in laboratorio sono più sensibili di quelle accoppiate appartenenti alla stessa popolazione.

### 6.3.3 Risultati comportamentali

In questa fase sono stati effettuati esperimenti comportamentali su esemplari adulti vergini di *C. capitata* di entrambi i sessi mediante la tecnica di “scelta doppia”, in seguito a stimolazione con arancia (*Citrus sinensis* L.), limone (*Citrus limon* L.), mela (*Malus domestica* Borkh.) e fico d'india (*Opuntia ficus indica* L.).

I dati evidenziano una chiara esistenza di gerarchie preferenziali nella scelta dei frutti da parte dell'insetto. In particolare, per quanto riguarda gli esemplari maschi (Fig. 28A), l'arancia è risultata più attrattiva sia del limone che del fico d'india. Similmente, anche la mela ha attirato un numero di maschi significativamente maggiore sia del limone che del fico d'india, mentre non sono state riscontrate differenze quando l'arancia veniva contrapposta alla mela. Tra i frutti meno attrattivi, il fico d'india è risultato comunque più attrattivo del limone, che costituisce dunque, tra quelli testati, il frutto di minore interesse per l'insetto.

Gli esperimenti comportamentali effettuati sulle femmine vergini (Fig. 28B) ripropongono la stessa gerarchia di preferenza verso i frutti appena descritti per i maschi, anche se le femmine vengono solitamente attratte in numero proporzionalmente superiore rispetto a quello dei maschi.

Nell'insieme, dalle prove comportamentali emerge che, in entrambi i sessi vergini, la gerarchia preferenziale verso la pianta ospite è: arancia = mela > fico d'india > limone.

## 6.4 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

In conclusione, questo studio mi ha permesso di testare la sensibilità olfattiva della mosca mediterranea della frutta *C. capitata* verso alcuni stimoli, quali mandarancio,

arancia, limone, mela e fico d'india, ossia i frutti delle piante-ospite più rappresentative ed implicati nelle interazioni insetto/pianta ospite e nel comportamento riproduttivo.

Nel complesso, i risultati da me raccolti sono in accordo con l'opinione corrente, secondo cui, in entrambi i sessi di *C. capitata*, il riconoscimento delle piante-ospite costituisce un'esigenza ecologica comune a maschi e femmine, necessaria per un adeguato "output" comportamentale che comprende le interazioni dell'insetto con la piante-ospite e/o il comportamento riproduttivo.

In particolare, i risultati EAG indicano che i maschi vergini presentano una maggiore sensibilità al mandarancio e al limone rispetto alle femmine, mentre non sembrano esistere differenze legate al sesso nelle risposte all'arancia, alla mela e al fico d'india.

Infine, le prove comportamentali suggeriscono che, in entrambi i sessi vergini, la gerarchia preferenziale verso la pianta ospite sia: arancia = mela > fico d'india > limone.

I risultati di questo lavoro apportano dunque utili informazioni sulla sensibilità olfattiva di questo insetto che possono costituire elementi importanti nella messa a punto di strategie di controllo biologico dello stesso, specifiche ed alternative a quelle tradizionalmente impiegate.

## **6.5 ABSTRACT**

The Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* Wied., is a worldwide pest for horticulture because of its high biological potential, the difficulty of control and the broad polyphagy, mainly addressed, in Southern Europe, to pomaceous (apples and pears) and citrus (oranges) cultures. Information in the literature on the olfactory sensitivity in the medfly is still incomplete and only a few data are reported on the responses to alcohols, aldehydes, esters and acids, but with no reference to the physiological state (Light et al., 1988).

Aim of the present work was to obtain further knowledge on the typology and topology of olfactory chemosensilla on both - medial and lateral - antennal surfaces in males and females. In addition, their electrophysiological activity has been

evaluated in response to extracts of fruits and foliage from various host-plants and their primary compounds in two different -wild and lab reared- medfly populations, also in relation to the sex and to the physiological (virgin vs. mated) state of the insects.

HRSEM morphological analysis has highlighted the presence of 4 different olfactory chemosillum types on both the medial and lateral antennal surface which may be classified as basiconic, clavate, trichoid and grooved sensilla. No difference in number and distribution has been observed between sexes, except for the female lateral surface, where a statistically higher number of clavate sensilla was detected.

The EAG responses show that 1) the male olfactory sensitivity of lab reared medflies to headspace collected from fruits of lemon, orange, clementine, prickly pear, apple and their relative foliage was higher than that of females, while an opposite situation was found for wild insects; 2) same results were obtained when virgin and mated insects were considered; 3) virgin males and females displayed a higher sensitivity than the mated ones in the wild and lab populations, respectively; 4) within each population, the olfactory sensitivity was higher in mated males than mated females in lab population, while the opposite was found for wild insects.

The olfactory sensitivity of the medfly to host-plant fruits and foliage in relation to physiological state and rearing conditions is discussed.

## **6.6 COMUNICAZIONE DEI RISULTATI**

**Altea N., Sollai G., Masala C., Loy F., Liscia A., Crnjar R., Solari P. (2010).** EAG responses of the medfly *Ceratitis capitata* to fruit and foliage headspace of host-plant: a comparison between wild and lab reared insect populations. *European Chemoreception Research Organization (ECRO), Avignon, France, 14-19 Settembre 2010.*

## **7. CONCLUSIONI GENERALI**

In conclusione, considerata l'importanza della produzione e percezione dei segnali chimici nel comportamento degli insetti in relazione alle complesse funzioni volte alla sopravvivenza della specie, quali l'alimentazione e la riproduzione, il mio lavoro di tesi ha previsto la raccolta di dati su tali meccanismi e sui sistemi di regolazione degli stessi, nonché su possibili fattori capaci di interferire con tali funzioni. In riferimento a questo, la mia ricerca, finalizzata ad acquisire dati utili per individuare nuove possibili strategie di controllo biologico e biotecnico più specifiche e alternative a quelle tradizionalmente impiegate e a valutarne le possibilità di impiego per il contenimento delle popolazioni di queste diverse specie di insetti, ha dimostrato la assoluta utilità delle tecniche elettrofisiologiche e comportamentali da me impiegate nel controllo eco-compatibile di popolazioni di insetti di interesse ambientale, sanitario e agronomico.

## 8. BIBLIOGRAFIA

**Altner H., Prilinger L. (1980).** Ultrastructure of invertebrate chemo-, thermo-, and hygroreceptors and its functional significance. *Int. Rev. Cytol.* 67: 69-139.

**Campanacci V., Longhi S., Nagnan-Le Meillour P., Cambillau C., Tegoni M. (1999).** Recombinant pheromone binding protein 1 from *Mamestra brassicae* (MbPBP1). *Eur. J. Biochem.* 264: 707-716.

**Davis E.E., Takahashi F.T. (1980).** Humoral alteration of chemoreceptor sensitivity in the mosquito. *Olfaction and Taste VII.* Pp. 139-142.

**Hansen K. (1978).** Insect chemoreception. Ser B Vol 5 Chapman and Hall London, pp. 232-292.

**Kaissling K.E. (2001).** Olfactory perireceptor and receptor events in moths: a kinetic model. *Chem Senses.* 26: 125-150.

**Kaissling K.E. (1986).** Chemo-electrical transduction in insect olfactory receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 9: 121-141.

**Krieger J., Breer H. (2003).** Transduction mechanisms of olfactory sensory neurons. In *Insect Pheromone Biochemistry and Molecular Biology.* (eds. GJ Blomquist and RG Vogt), pp. 593-607. Elsevier Academic Press, London.

**Laue M., Maida R., Redkozubov A. (1997).** G-protein activation, identification and immunolocalization in pheromone-sensitive sensilla trichoidea of moths. *Cell Tissue Res.* 288: 149-158.

**Leal W.S. (2000).** Duality monomer-dimer of the pheromone-binding protein from *Bombyx mori*. *Biochem. Biophys Res. Commun* 268: 521-529.

**McIver S.B. (1975).** Structure of cuticular mechano-receptors of arthropods. *Ann. Rev. Entomol.* 20:382-397.

**Omand E. (1971).** A peripheral sensory basis for behavioural regulation. *Comp. Biochem. Physiol. (A)* 38:265-278.

**Palaniswamy P., Seabrook W.D., Sivasubramanian P. (1979).** Effect of a juvenile hormone analogue on olfactory sensitivity of eastern spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae) *Ent. Exp. Appl.* 26: 175-179.

**Slifer E.H. (1970).** The Structure of Arthropod Chemoreceptors. *Ann. Rev. Entomol.* 15:121-142.

**Vosshall L.B., Keller A. (2003).** Decoding olfaction in *Drosophila*. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13: 103–110.

**Zacharuk R.Y. (1980).** Ultrastructure and function of insect chemosensilla. *A. Rev. Ent.* 25:27-47.

## ***Lymantria dispar***

**Arn H., Tóth M., Priessner E. (1992).** List of sex pheromones of Lepidoptera and related attractants, 2<sup>nd</sup> Ed. Wadenswil: *International Organization for Biological Control*. 179 p.

**Cerboneschi A., Crnjar R., Liscia A., Majone R., Solari P. (1998).** Influence of microclimatic variations of *Lymantria dispar* (Lepidoptera, Lymantridae) male sex pheromone. *Ital. J. Zool.* 65: 267-272.

**Chino H. (1985).** Lipid transport: biochemistry of emolymph lipophorin. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Oxford: Pergamon Press 115-135.

**Christensen T.A., Mustaparta H., Hildebrand J.G. (1991).** Chemical communication in heliothine moths. *J. Comp. Physiol. A* 169: 259-274.

**Christensen T.A., Hildebrand J.G. (1994).** Neuroethology of sexual attraction and inhibition in heliothine moths. *Fortschritte der zoologie*, Band/vol 39.

**Crnjar R., Angioy A. M., Pietra P., Yin C.-M., Liscia A. and Tomassini Barbarossa I. (1988).** Control mechanisms of calling behaviour in *Lymantria dispar*: an electrophysiological investigation on the role of the terminal abdominal ganglion. *J. Insect Physiol.* 34: 1087-1091.

**Diel P.A. (1975).** Synthesis and release of hydro- carbons by the oenocytes of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *J. Insect Physiol.* 21: 1237-1246.

**Gu X., Quilici D., Juarez P., Blomquist G.J., Schal C. (1995).** Biosynthesis of hydrocarbons and contact sex pheromone and their transport by lipophorin in females of the German cockroach (*Blattella germanica*). *J. Insect Physiol.* 41:257-267.

**Hildebrand J.G. (1996).** Olfactory control of behavior in moths: central processing of odor information and the functional significance of olfactory glomeruli. *J. Comp. Physiol. A* 178: 5-19.

**Hollander A.L., Yin C.M. (1982).** Neurological influences on pheromone release and calling behaviour in the gypsy moth *Lymantria dispar*. *Physiol. Ent.* 7: 163-166.

**Hollander A.L., Yin C.M. (1985).** Lack of humoral control in calling and pheromone release by brain, corpora cardiaca, corpora allata and ovaries of the female gypsy moth, *Lymantria dispar* (L.). *J. Insect Physiol.* 31: 159-163.

**Itagaki K., Conner W.E. (1986).** Physiological control of pheromone release behaviour in *Manduca sexta* (L.) *J. Insect Physiol.* 32: 657-664.

**Itagaki K., Conner W.E. (1987).** Neural control of rhythmic pheromone gland exposure in *Utetheisa ornatrix* (Lepidoptera: Arctiidae). *J. Insect Physiol.* 33, 177-181.

**Jurenka R.A., Roelofs W.L. (1993).** Biosynthesis and endocrine regulation of fatty acid derived sex pheromones in moths. In: Stanley-Samuelson D.W., Nelson D.R., editors. *Insect lipids: chemistry, biochemistry and biology*. Lincoln: University of Nebraska Press 353-388.

**Keil T.A. (1982).** *Tissue and Cell.* 14: 451-462.

**Luciano P., Prota R. (1982a).** La dinamica di popolazione di *Lymantria dispar* L. in Sardegna. II. Osservazioni sul parassitismo nel corso della gradazione. *Mem. Soc. Ent. Ital.* 60: 227-234.

**Luciano P., Prota R. (1982b).** Osservazioni sulla densità di popolazione di *Lymantria dispar* L. nelle principali aree subericole della Sardegna. Studi Sass., sez III. *Ann. Fac. Agr. Univ. Sassari*, XXVIII: 168-179.

**Masler E.P., Raina A.K. (1993).** Pheromonotropic activity in the gypsy moth *Lymantria dispar*: evidence for a neuropeptide. *J. Comp. Physiol. B* 163: 259-264.

**Pho D.B., Pennanec'h M., Jallon J.M. (1996).** Purification of adult *Drosophila melanogaster* lipophorin and its role in hydrocarbon transport *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 31:289-304.

**Raina A. K. (1993).** Neuroendocrine control of sex pheromone biosynthesis in lepidoptera. *Ann. Rev. Entomol.* 38, 329-349

**Riddiford L.M., Williams C.M. (1971).** Role of the corpora cardiaca in the behaviour of the saturniid moth. I. Release of sex pheromone. *Biol. Bull. mar. biol. Lab., Woods Hole* 140: 1-7.

**Riddiford L.M. (1974).** The role of hormones in the reproductive behaviour of the female wild silk moths. In *Experimental Analysis of Insect Behaviour* (Ed. by Barton-Brown L.), pp. 278-285. Springer, New York.

**Riddiford L.M. (1978).** Role of the corpora cardiaca in the sex pheromone release by female saturnid moth. In *Insect Chemoreception, No. 3* (Ed. by Skirkevicius A.), pp 9-16. Lithuanian Academy of Sciences.

**Röller H.H., Pipho H. and Holz I. (1963).** Zum problem der hormone-abhängigkeit des paarungsverhaltens bei insekten. Untersuchungen an *Galleria melonella* (L.). *J. Insect Physiol.* 9: 187-194.

**Sasaki M., Riddiford L.M., Truman J.W., Moore J.K. (1983).** Re-evaluation of the role of corpora cardiaca in calling and oviposition behaviour of giant silk moths. *J. Insect Physiol.* 29: 695-705.

**Sasaki M., Riddiford L.M. (1984).** Regulation of reproductive behaviour and egg maturation in the tobacco hawk moth, *Manduca sexta*. *Physiol Ent.* 9: 315-327.

**Schal C., Sevala V., Cardè R.T. (1998).** Novel and highly specific transport of a volatile sex pheromone by hemolymph lipophorin in moths. *Naturwissenschaften* 85: 339-342.

**Schneider D. (1992).** 100 Years of Pheromone Research. *Naturwissenschaften.* 79: 241-250

**Shabang S.R. et al. (1999).** Atlas of olfactory organs of *Drosophila melanogaster*: types, external organization, innervation and distribution of olfactory sensilla. *Int. Journal of Insect Morphology and Embriology.* 28: 377-397.

**Tang J.D., Charlton R.E., Cardé R.T., Yin C.-M. (1987).** Effect of allatectomy and ventral nerve cord transection on calling, pheromone emission and pheromone production in *Lymantria dispar*. *J. Insect Physiol.* 33: 469-476.

**Webster R.P., Cardè R.T. (1984).** The effects of mating, exogenous juvenile hormone and a analogue on pheromone titre, calling and oviposition in the omnivorous leafroller moth (*Platynota stultana*). *J. Insect Physiol.* 30: 113-118.

**Wigglesworth V.B. (1970).** Structural lipids in the insect cuticle and the function of the oenocytes. *Tissue cell.* 2: 155-179.

### ***Culicoides imicola***

**Acuff VR (1976).** Trap biases influencing mosquito collecting. *Mosq News* 36:173-176

**Bhasin A, Mordue Luntz AJ, Mordue W (2000).** Electrophysiological and behavioural identification of host kairomones as olfactory cues for *Culicoides impunctatus* and *C. nubeculosus*. *Physiol Entomol* 25:6-16

**Bhasin A, Mordue Luntz AJ, Mordue W (2001).** Field studies on efficacy of host odour baits for the biting midge *Culicoides impunctatus* in Scotland. *Med Vet Entomol* 15:147-56

**Bishop AL, McKenzie HJ, Barchia IM, Spohr LJ (2000).** Moon phase and other factors affecting light-trap catches of *Culicoides brevitarsis* Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae). *Aust J Entomol* 39:29-32

**Blackwell A., Dyer C., Mordue A.J., Wadhams J., Mordue W. (1996).** The role of 1-octen-3-ol as a host-odour attractant for the biting midge, *Culicoides impunctatus* Goetghebuer, and interactions of 1-octen-3-ol with a volatile pheromone produced by parous female midges. *Physiological Entomology* 21: 15–19.

**Braverman Y, Boreham PFL, Galun R, Ziv M (1977).** The origin of blood meals of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) and mosquitoes (Diptera: Culicidae) trapped in turkey runs in Israel. *Rhod J Agric Res* 15:101-104

**Braverman Y, Linley JR (1993).** Effect of light trap height on catch of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in Israel. *J Med Entomol* 30:1060-1063

**Braverman Y, Wegis MC, Mullens BA (2000).** Response of *Culicoides sonorensis* (Diptera : Ceratopogonidae) to 1-octen-3-ol and three plant-derived repellent formulations in the field. *J Am Mosq Control Assoc* 16:158-163

**Crnjar R, Scalera G, Liscia A, Angioy AM, Bigiani A, Pietra P, Tomassini Barbarossa I (1989).** Morphology and EAG mapping of the antennal olfactory receptors in *Dacus oleae*. *Ent Exp et Appl* 51:77-85

**Cuperus PL (1985).** Inventory of pores in antennal sensilla of *Yponomeuta* spp. (Lepidoptera: Yponomeutidae) and *Adoxophyes orana* F.v.R. (Lepidoptera: Tortricidae). *Int J Insect Morphol Embryol* 14:347-359

**Dey S, Hooroo RNK, Wankhar D (1995).** Scanning electron microscopic studies of the external morphology of sensilla on the legs of a butterfly, *Graphium sarpedon* (Lepidoptera-Papilionidae). *Micron* 26:367-376

**Gerry AC, Sarto I, Monteys V, Moreno Vidal J-O, Francino O, Mullens BA (2009).** Biting rates of *Culicoides* midges (Diptera: Ceratopogonidae) on sheep in northeastern Spain in relation to midge capture using UV light and carbon dioxide-bated traps. *J Med Entomol* 46:615-624

**Liscia A, Crnjar R, Angioy AM, Pietra P, Stoffolano JG (1982).** Ovipositor chemosensilla in *Tabanus nigrovittatus* (Macq.) *Chrysops fuliginosus* (Wied.), and *Rhagoletis pomonella* (Walsh). *Boll Soc Ital Biol Sper* 58:1325-1329

**Mands V, Kline DL, Blackwell A (2004).** *Culicoides* midge trap enhancement with animal odour baits in Scotland. *Med Vet Entomol* 18:336-342

**Mellor PS, Boorman J, Baylis M (2000).** *Culicoides* biting midges: their role as arbovirus vectors. *Annu Rev Entomol* 45:307-340

**Mordue Luntz AJ (2003).** Arthropod semiochemicals: mosquitoes, midges and sealice. *Biochem Soc Trans* 31:128-133

**Sollai G, Solari P, Masala C, Crnjar R, Liscia A (2007).** Effects of avermectins on olfactory responses of *Culicoides imicola* (Diptera: Ceratopogonidae). *J Med Entomol* 44:656-659

**Sollai G, Solari P, Loy F, Masala C, Crnjar R, Liscia A. (2010).** Morpho-functional identification of abdominal olfactory receptors in the midge *Culicoides imicola*. *J Comp Physiol A* 196:817-824

## ***Ceratitis capitata***

**Angioy A.M., Liscia A., Pietra P., Crnjar R. (1978).** Sensitivity threshold of labellar and tarsal hairs of *Dacus oleae* Gmel. and *Ceratitis capitata* Wied. to NaCl stimulation. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 21:2105-2107.

**Arredondo J., Diaz-Fleischer F. (2006).** Oviposition deterrents for the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) from fly faeces extracts. *Bulletin of Entomological Research*, 96(1):35-42.

**Crnjar R., Liscia A., Angioy A.M., Tomassini Barbarossa I., Bigiani A., Scalera G. and Pietra P. (1988).** The antennal sensilla in two Tephritid flies (*Ceratitis capitata* and *Dacus oleae*): a morpho-functional study. In R. Cavalloro (ed.), *Fruit flies of economic importance* 87. A.A. Balkema, Rotterdam, pp. 211-216.

**Fèron M. (1962).** L'instinct de reproduction chez la mouche mediterraneenne des fruits *Ceratitis capitata*. Comportement sexuel. Comportement de ponte. *Revue de Pathologie Vege tale et d'Entomologie Agricole de France*, 41:1-129.

**Gasperi G., Bonizzoni M., Gomulski L.M., Murelli V., Torti C., Malacrida A.R. and Guglielmino C.R. (2002).** Genetic differentiation, gene flow and the origin of infestations of the medfly, *Ceratitis capitata*. *Genetica*, 116:125-135.

**Hernandez M.M., Sanz I., Adelantado M., Ballach S., Primo E. (1996).** Electroantennogram activity from antennae of *Ceratitits capitata* (Wied.) to fresh orange airborne volatiles. *J. Chem. Ecol.*, 22:1607-1617.

**Jang E.B. (1995).** Effect of mating and accessory gland injections on olfactory-mediated behavior in the female Mediterranean fruit fly, *Ceratitits capitata*. *J. Insect Physiol.*, 41:705-710.

**Jang E.B., Khrimian A., Holler T.C., Casana-Giner V., Lux S. and Carvalho L.A. (2005).** Field Response of Mediterranean Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) to Ceralure B1: Evaluations of enantiomeric B1 Ratios on Fly Captures. *J. Econ. Entomol.*, 98(4): 1139-1143.

**Joachim-Bravo I.S., Fernandes O.A., Bortoli S.A., Zucoloto F.S. (2001).** Oviposition preference hierarchy in *Ceratitits capitata* (Diptera, Tephritidae): influence of female age and experience. *Iheringia*, 91:93-100.

**Katsoyannos B.I., Kouloussis N.A., Papadopoulos N.T. (1997).** Responses of *Ceratitits capitata* to citrus chemicals under semi-natural conditions. *Entomologia experimentalis et applicata*, 82:181-188.

**Levinson H., Levinson A., Muller K. (1990).** Influence of some olfactory and optical properties of fruits on host location by the Mediterranean fruit fly (*Ceratitits capitata* Wied.). *J. Appl. Ent.*, 109:44-54.

**Light D.M., Jang E.B., Dickens J.C. (1988).** Electroantennogram responses of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitits capitata*, to a spectrum of plant volatiles. *J. Chem. Ecol.*, 14: 159-180.

**Light D.M., Jang E.B., Flath R.A. (1992).** Electroantennogram responses of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitits capitata*, to the volatile constituents of nectarines. *Entomologia experimentalis et Applicata*, 63:13-26.

**Nishida, R., T.E. Shelly, T.S. Whittier & K.Y. Kaneshiro (2000).**  $\alpha$ -Copaene, a potential rendezvous cue for the Mediterranean fruit fly, *Ceratitits capitata*? *Journal of Chemical Ecology*, 26: 87-100.

**Prokopy R.J., Vargas R.I. (1996).** Attraction of *Ceratitits capitata* (Diptera: Tephritidae) flies to odor of coffee fruit. *J. Chem. Ecol.*, 22:807-820.

**Shelly T.E., Whittier T.S. and Villalobos E.M. (1996).** Trimedlure affects mating success and mate attraction in male Mediterranean fruit flies. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 78: 181-185.

**Vargas R.I., Walsh W.A., Nishida T. (1995).** Colonization of newly planted coffee fields: Dominance of Mediterranean fruit fly over Oriental fruit fly. *J. Econ. Entomol.*, 88:620-627.

## **9. FIGURE E TABELLE**

***Figura 1***

Sezione longitudinale schematica di un tipico chemosensillo di insetto.

B) Cellula di rivestimento basale

C) Cuticola esterna

CS) Seno ciliare

D) Guaina dendritica

E) Cellula epidermale

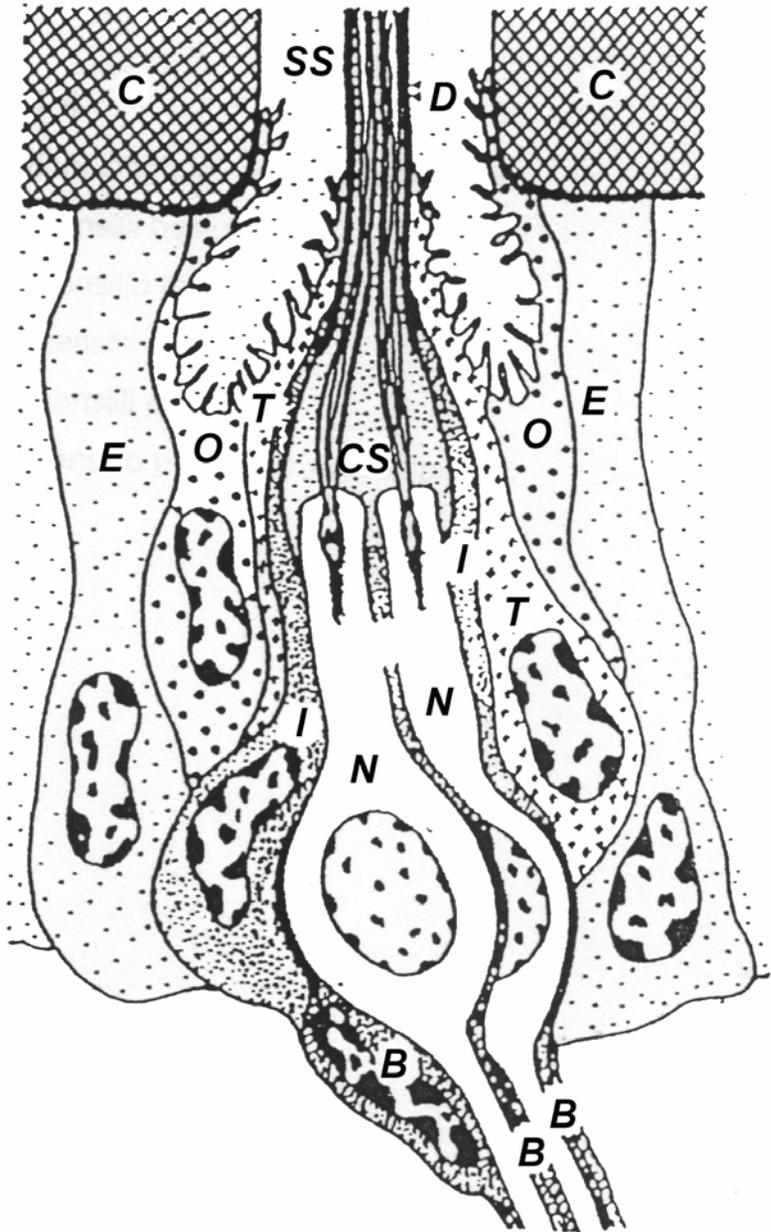
I) Cellula di rivestimento (tricogena)

N) Neurone

O) Cellula di rivestimento (tormogena)

SS) Seno sensillare

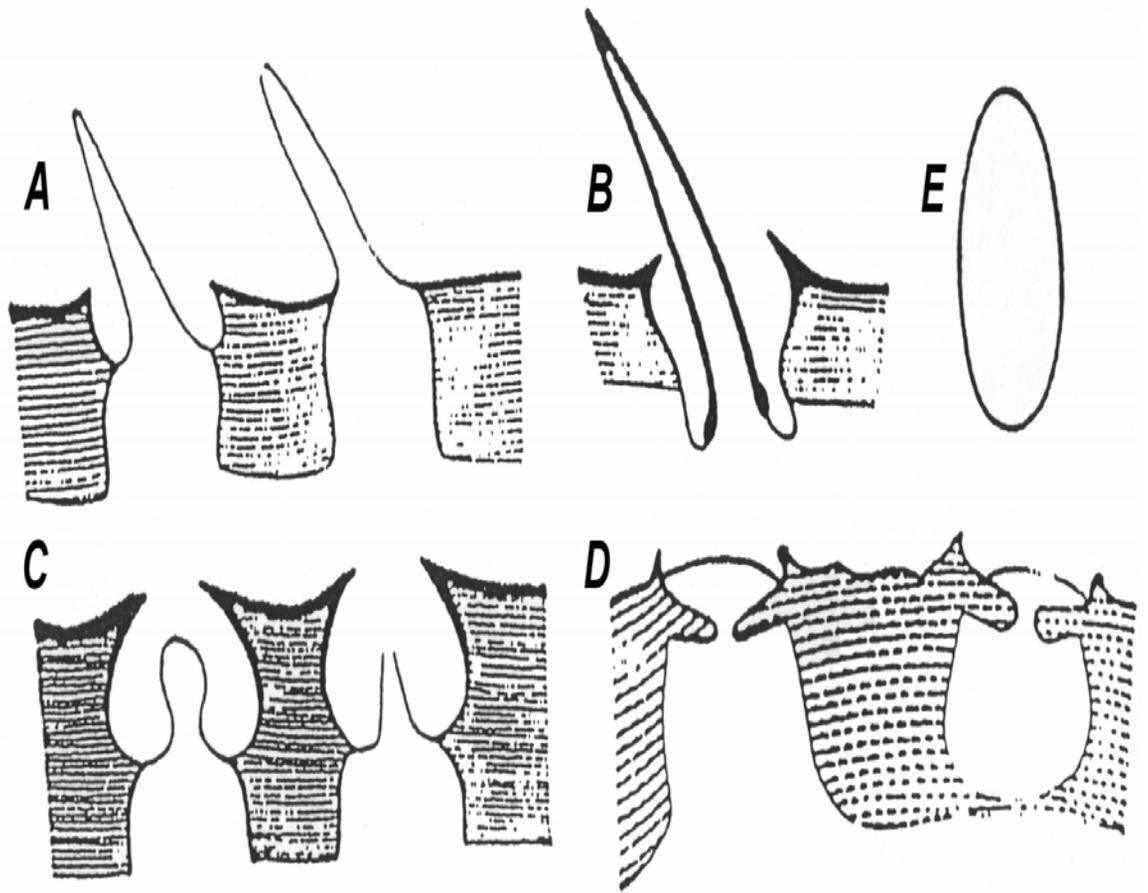
T) Cellula di rivestimento



***Figura 2***

Sezioni longitudinali schematiche di sensilli:

- A) Basiconici
- B) Tricoidei
- C) Celocoonici
- D) Placoidei
- E) Placoidei visti in pianta



**Figura 3**

Schema del sistema olfattometrico:

P1, P2, P3) pompe elettriche a membrana;

F1, F2) filtri di carbone attivo;

Fx) flussometri;

V) tubatura di plastica ad ugello di vetro;

Pr) preparato;

Os) oscilloscopio;

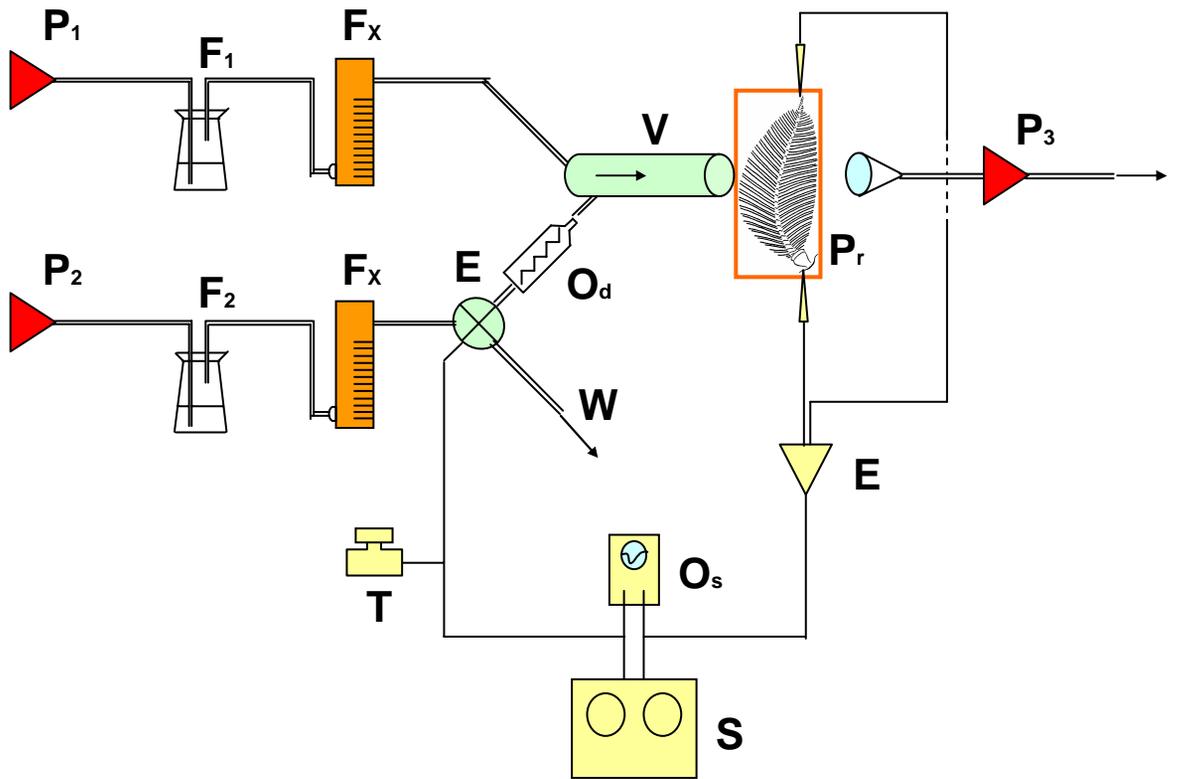
S) sistema di acquisizione del segnale;

T) interruttore a tempo programmabile;

W) ritorno dell'aria all'ambiente;

E) elettrovalvola a solenoide;

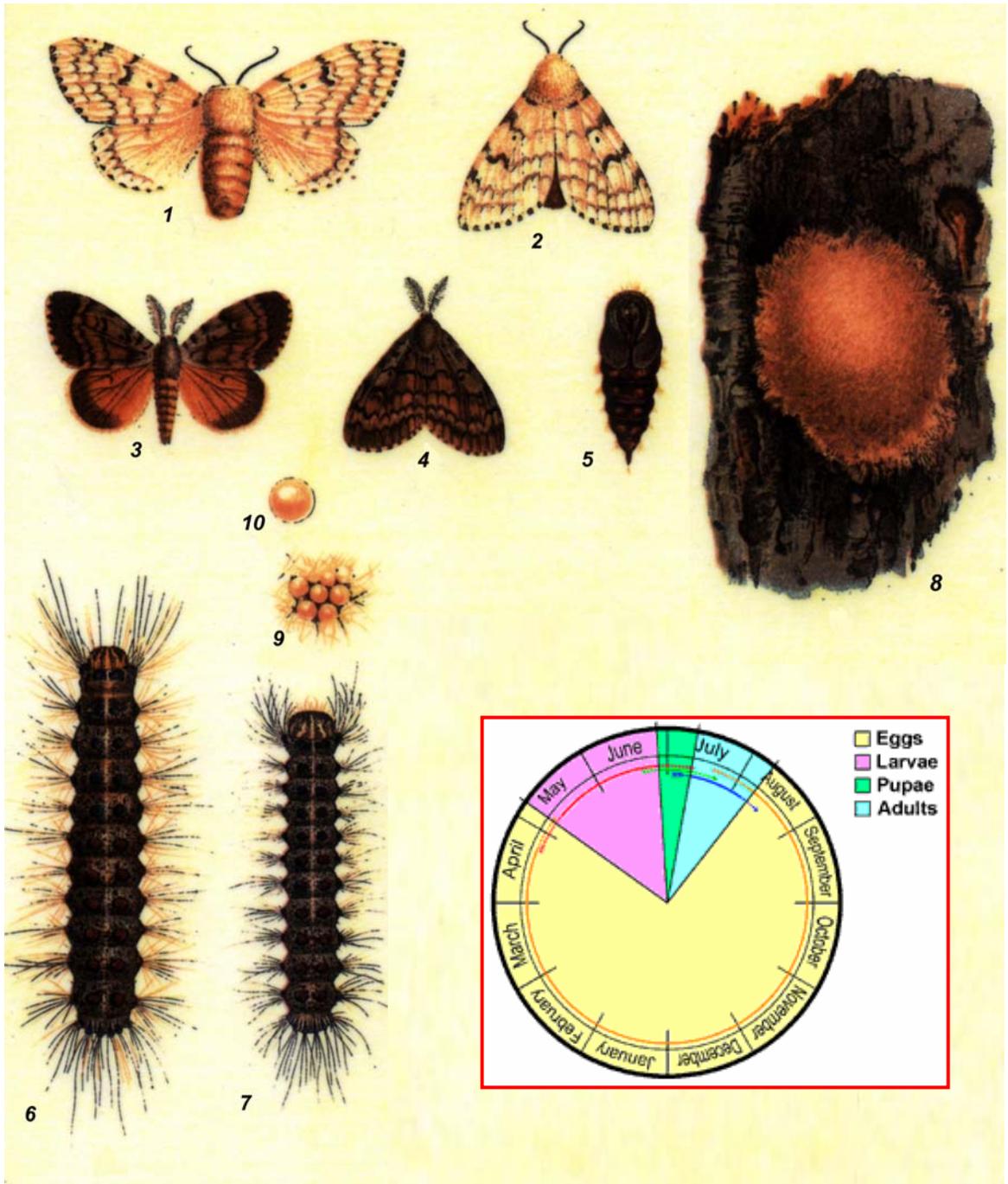
Od) cartuccia ricaricabile contenente lo stimolo.



**Figura 4**

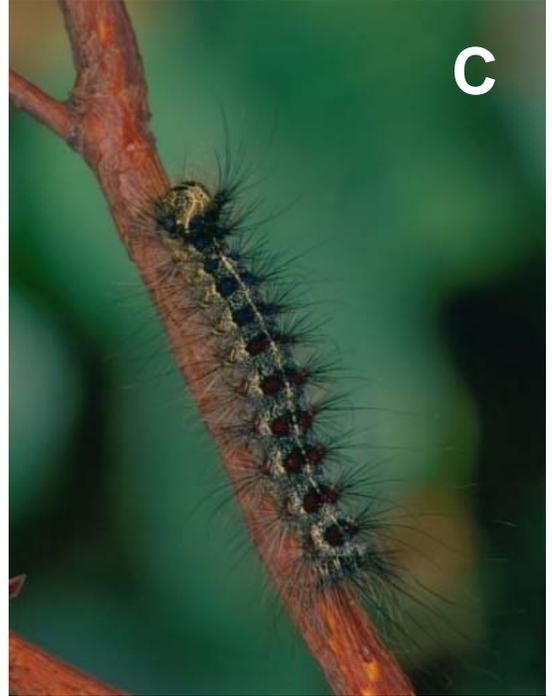
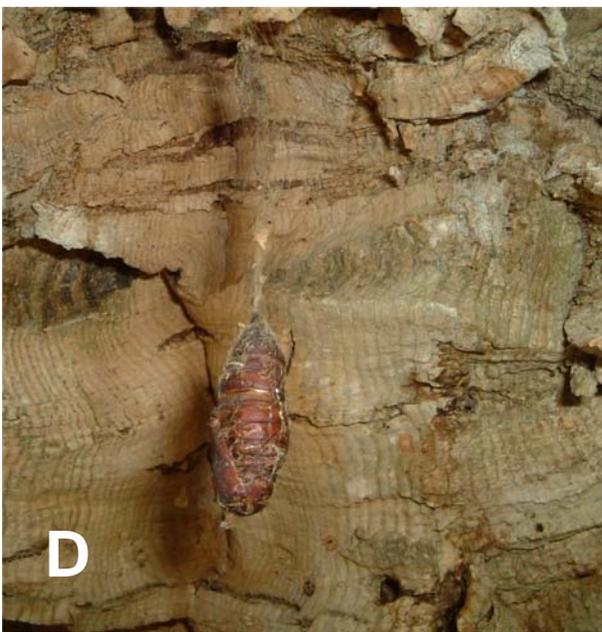
Ciclo biologico della *Lymantria dispar* L.:

- 1) Femmina con ali aperte
- 2) Femmina con ali chiuse
- 3) Maschio con ali aperte
- 4) Maschio con ali chiuse
- 5) Crisalide
- 6) Stadio larvale
- 7) Stadio larvale
- 8) Ovatura sulla corteccia da sughero
- 9) Ingrandimento di alcune uova
- 10) Singolo uovo ingrandito
- 11) Distribuzione del ciclo biologico nell'arco dell'anno



***Figura 5***

- A) Femmina che depone le uova sulla corteccia di un albero
- B) Schiusa delle uova
- C) Larva
- D) Crisalide
- E) Femmina adulta
- F) Maschio adulto



***Figura 6***

A, B) Esempi di defogliazione causata da *L. dispar* su una sughereta dell'iglesiente



***Figura 7***

Esemplari adulti femmine di tre diverse specie di *Culicoides*:

A) *C. imicola*

B) *C. obsoletus*

C) *C. pulicaris*

**A**



**B**



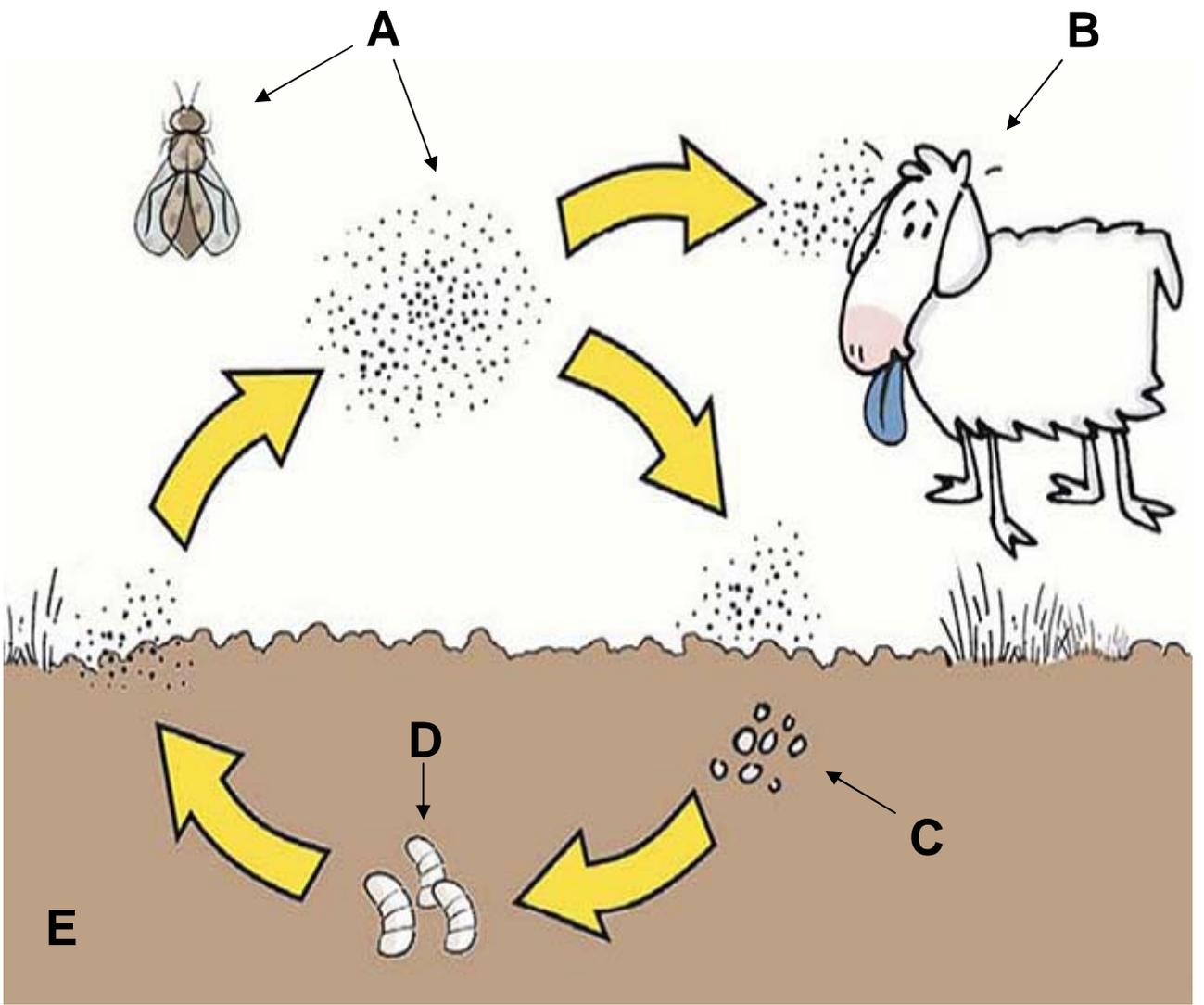
**C**



***Figura 8***

Rappresentazione schematica del ciclo vitale di *Culicoides imicola*:

- A) Adulto
- B) Animale ospite
- C) Uova
- D) Larve
- E) Sito di ovideposizione



***Figura 9***

Esemplare adulto femmina di *Ceratitis capitata* W.



***Figura 10***

Rappresentazione schematica del ciclo vitale di *Ceratitis capitata*:

- A) Accoppiamento
- B) Ovideposizione
- C) Uova
- D) Larve
- E) Pupa
- F) Femmina adulta
- G) Maschio adulto

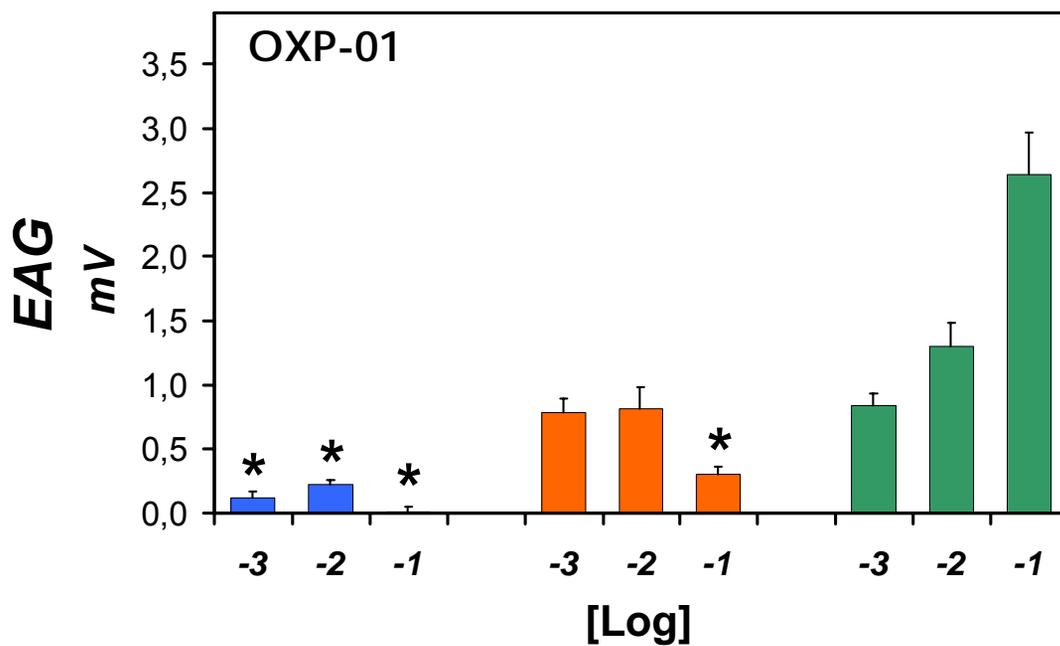


***Figura 11***

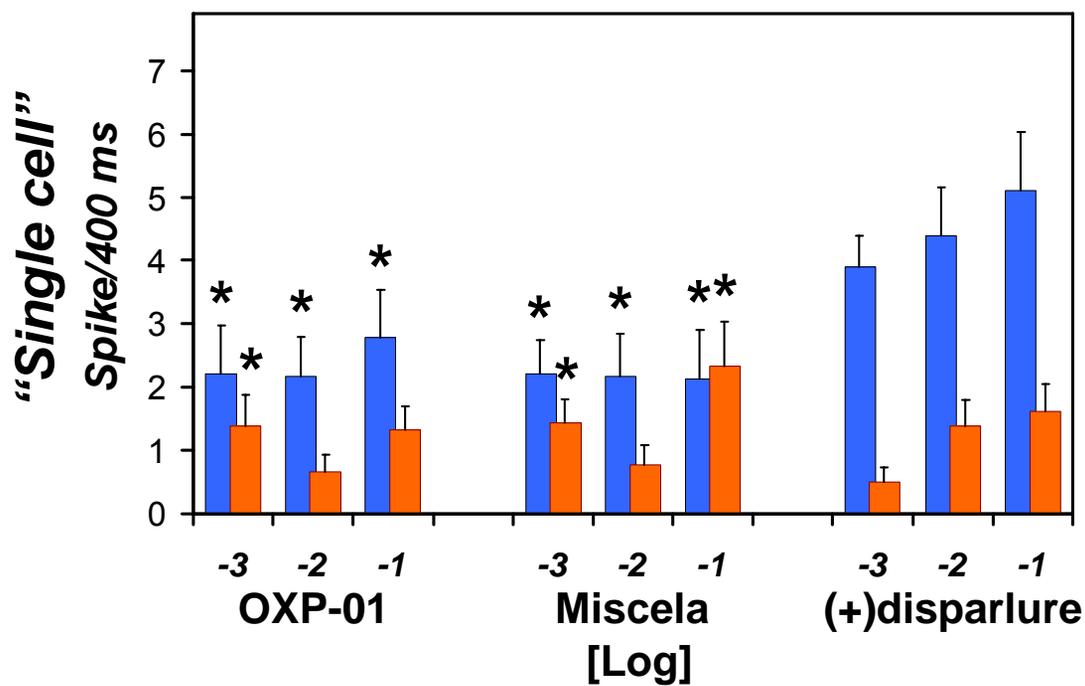
Istogrammi dei valori medi  $\pm$  errore standard (ES) degli EAG (A) e delle frequenze dei potenziali d'azione (B) in risposta al (+)disparlure, all'analogo OXP-01 ed alla miscela, alle diluizioni 1:1000, 1:100 e 1:10.

(\*) differenze statisticamente significative ( $p \leq 0,05$ ).

**A**      ■ Analogo      ■ Analogo + (+)disparlure      ■ (+)disparlure



**B**      ■ Cellula A      ■ Cellula B

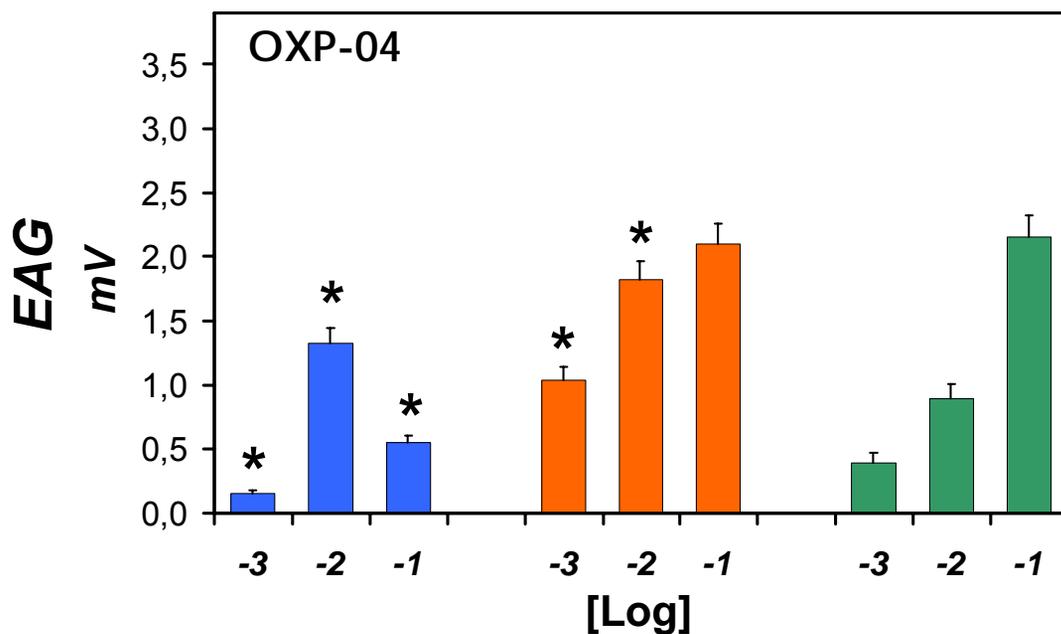


***Figura 12***

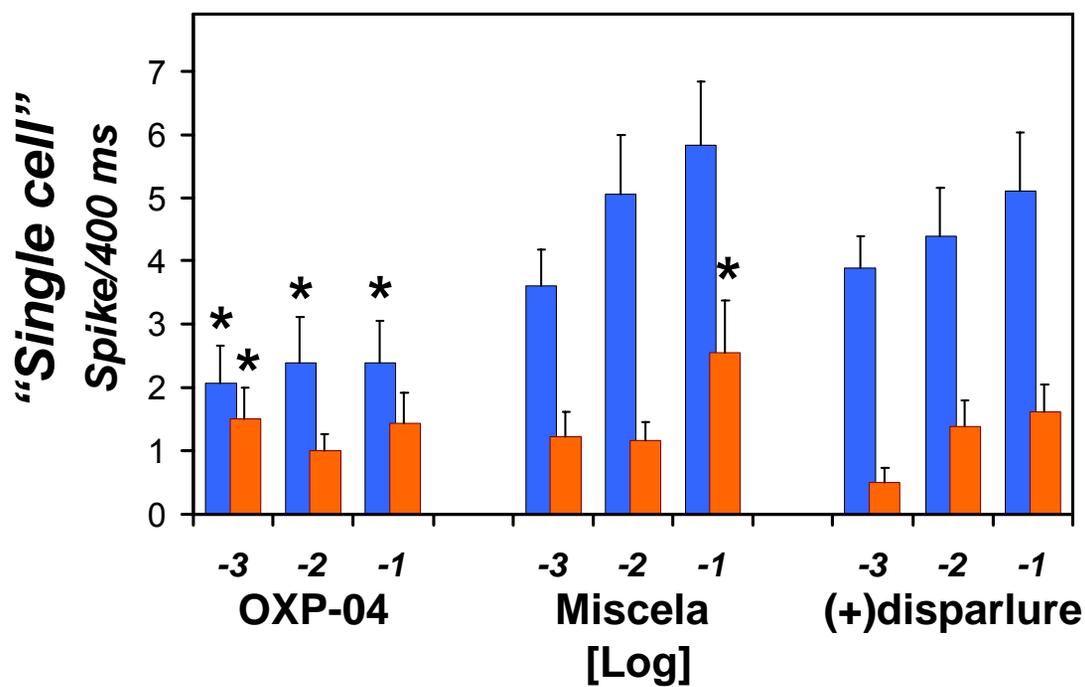
Istogrammi dei valori medi  $\pm$  errore standard (ES) degli EAG (A) e delle frequenze dei potenziali d'azione (B) in risposta al (+)disparlure, all'analogo OXP-04 ed alla miscela, alle diluizioni 1:1000, 1:100 e 1:10.

(\*) differenze statisticamente significative ( $p \leq 0,05$ ).

**A**      ■ Analogo      ■ Analogo + (+)disparlure      ■ (+)disparlure

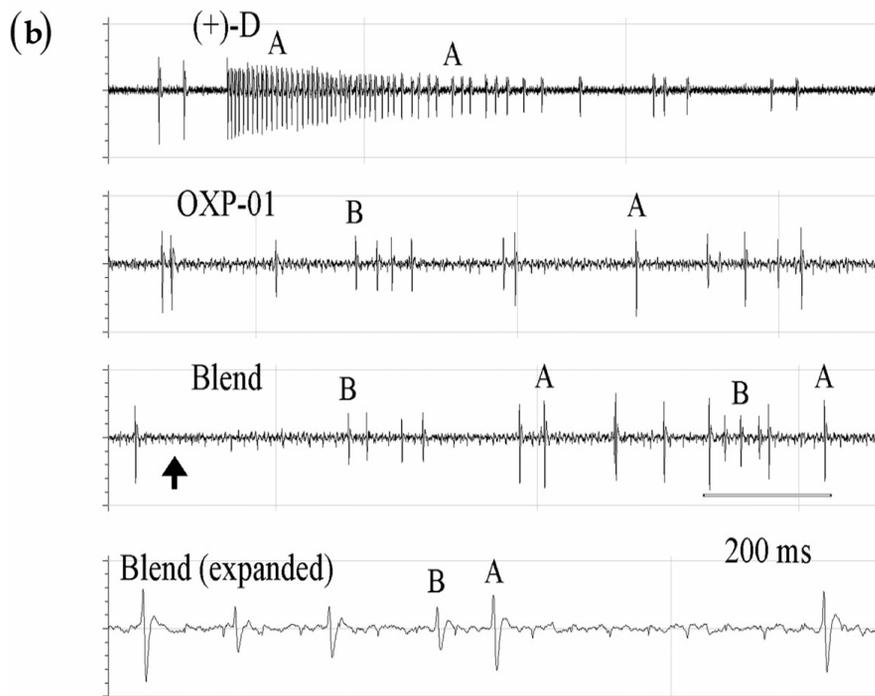
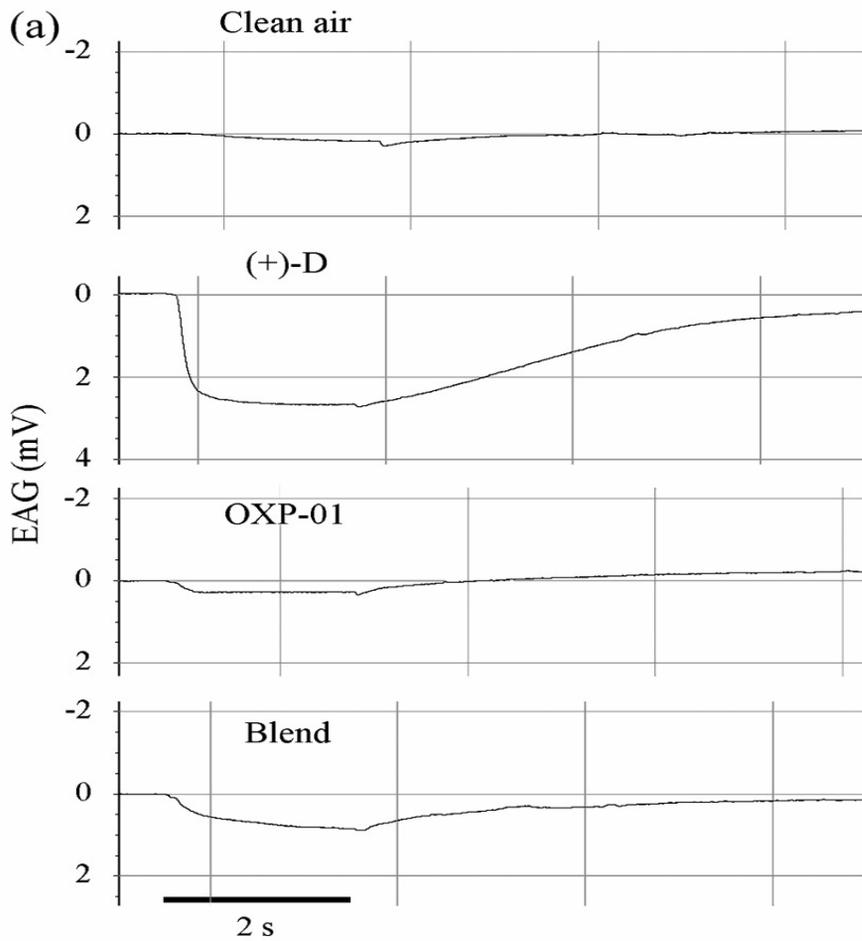


**B**      ■ Cellula A      ■ Cellula B



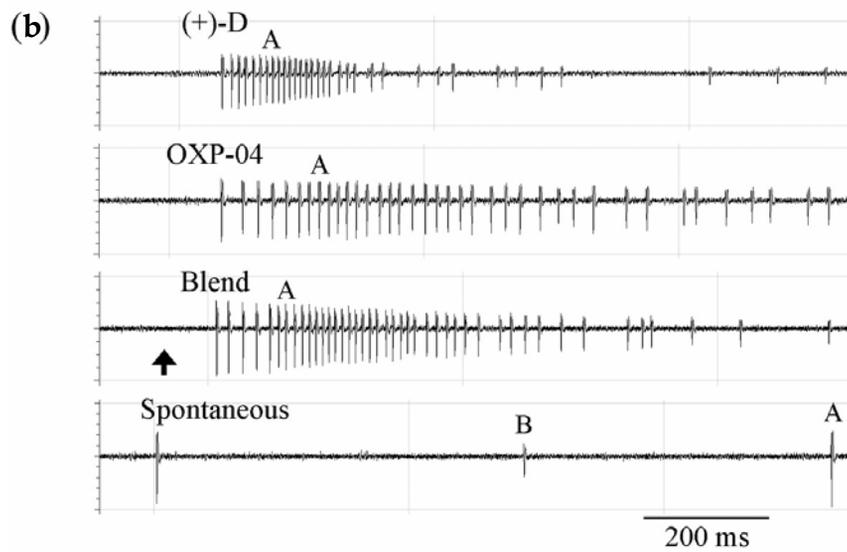
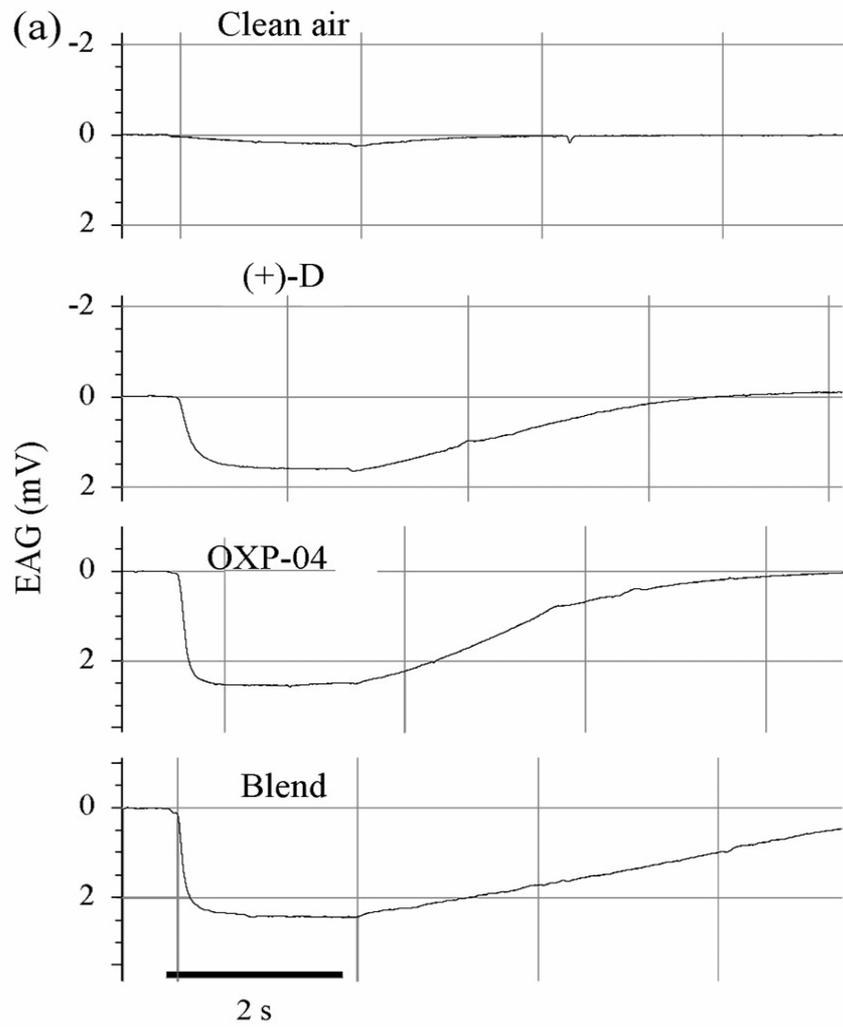
***Figura 13***

Esempi del potenziale del recettore (a) e delle frequenze dei potenziali d'azione (b) in risposta alla stimolazione con il (+)disparlure, l'analogo OXP-01 e la loro miscela.



***Figura 14***

Esempi del potenziale del recettore (a) e delle frequenze dei potenziali d'azione (b) in risposta alla stimolazione con il (+)disparlure, l'analogo OXP-04 e la loro miscela.



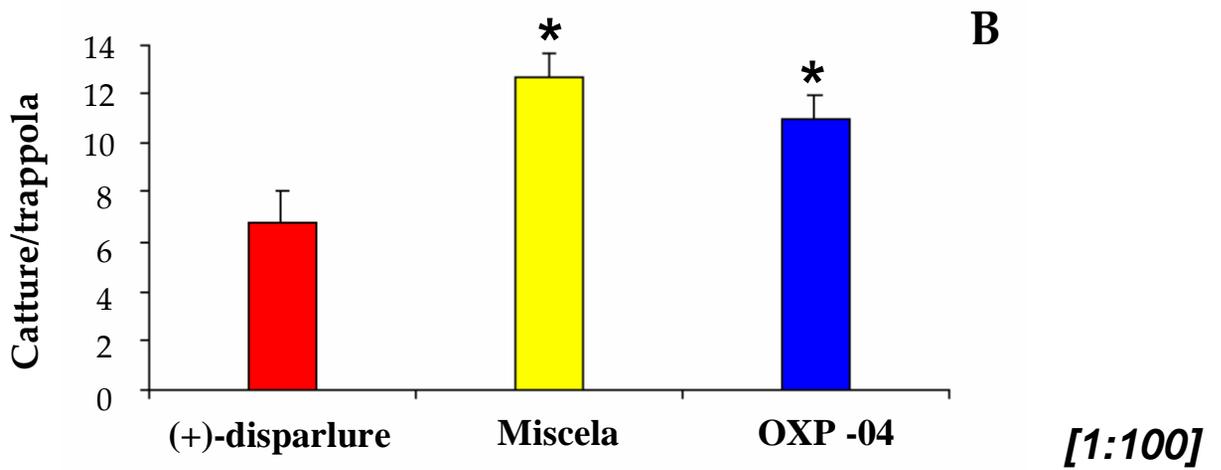
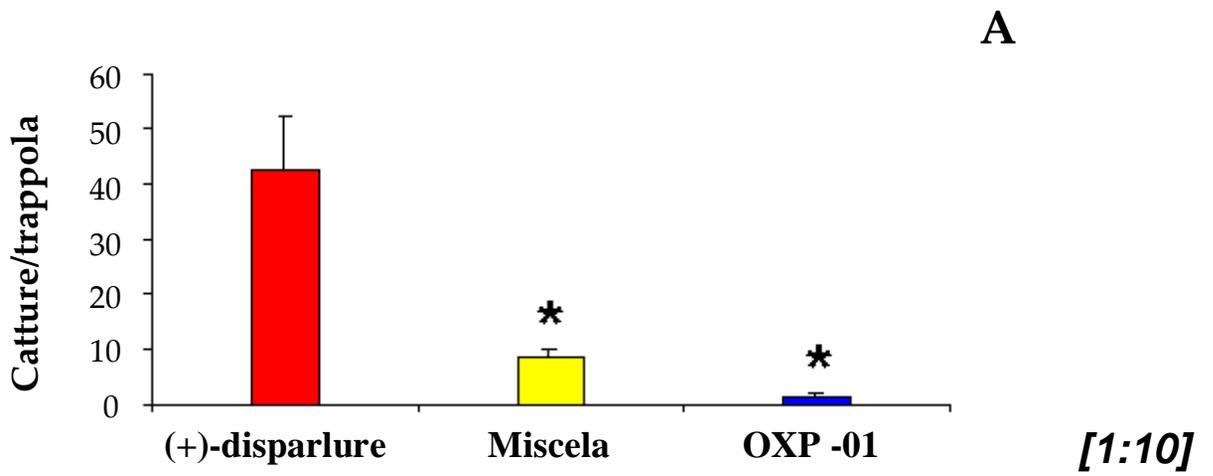
***Figura 15***

Istogrammi dei valori medi  $\pm$  errore standard (ES) del numero di insetti catturati per trappola con:

A. (+)disparlure, analogo OXP-01 e la miscela alla diluizione 1:10

B. (+)disparlure, analogo OXP-04 e la miscela alla diluizione 1:100

(\*) differenze statisticamente significative ( $p \leq 0,05$ ).

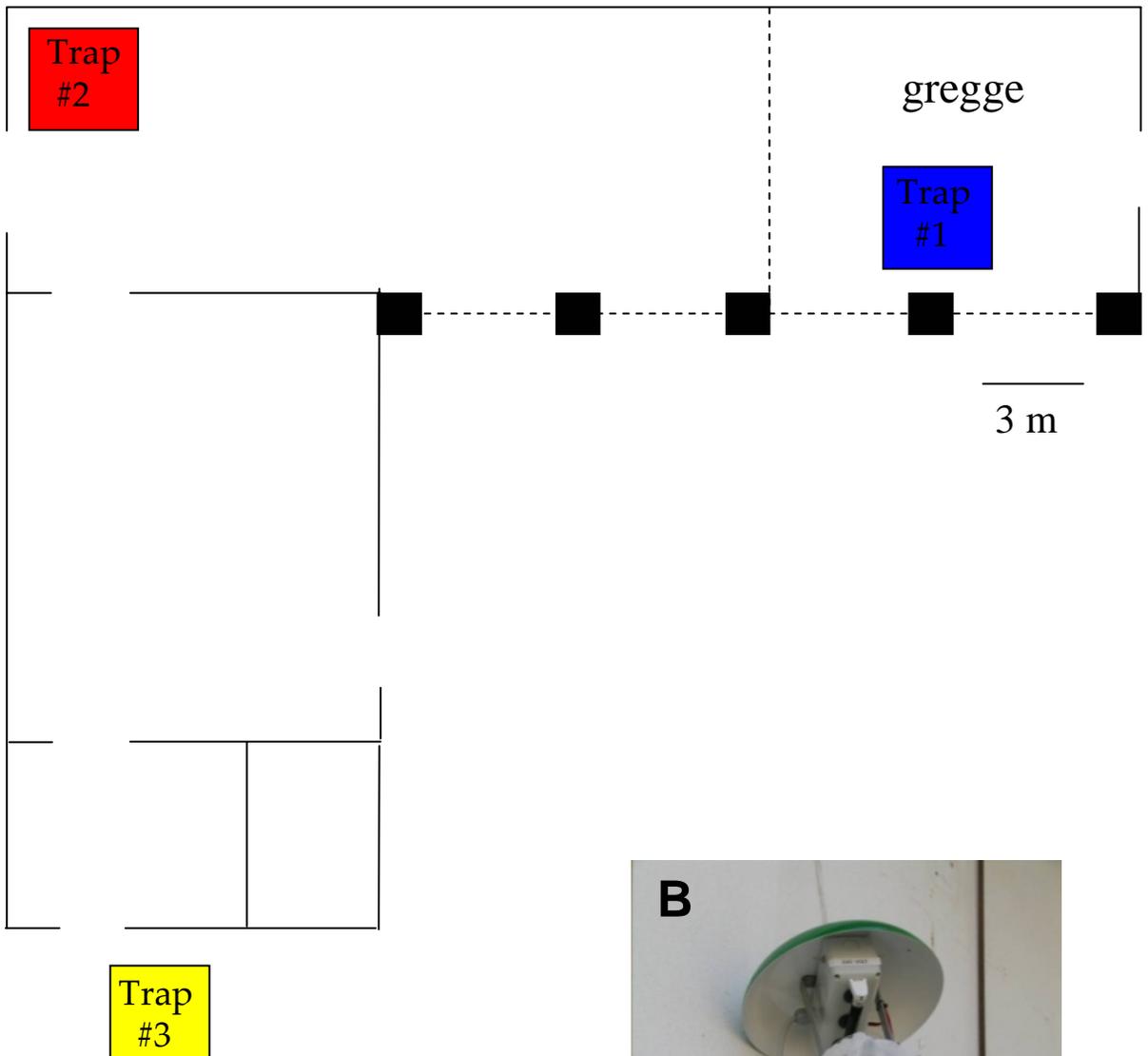


***Figura 16***

A) Rappresentazione schematica dell'ovile dove sono state eseguite le prove comportamentali. La Trappola # 1 è stata posizionata all'interno dell'ovile dove riposano le pecore, mentre le trappole # 2 e 3 sono state messe dentro e fuori dall'ovile, rispettivamente, ma entrambe lontane dalle pecore. Le linee tratteggiate indicano le recinzioni aperte

B) Trappola a luce per la cattura degli insetti

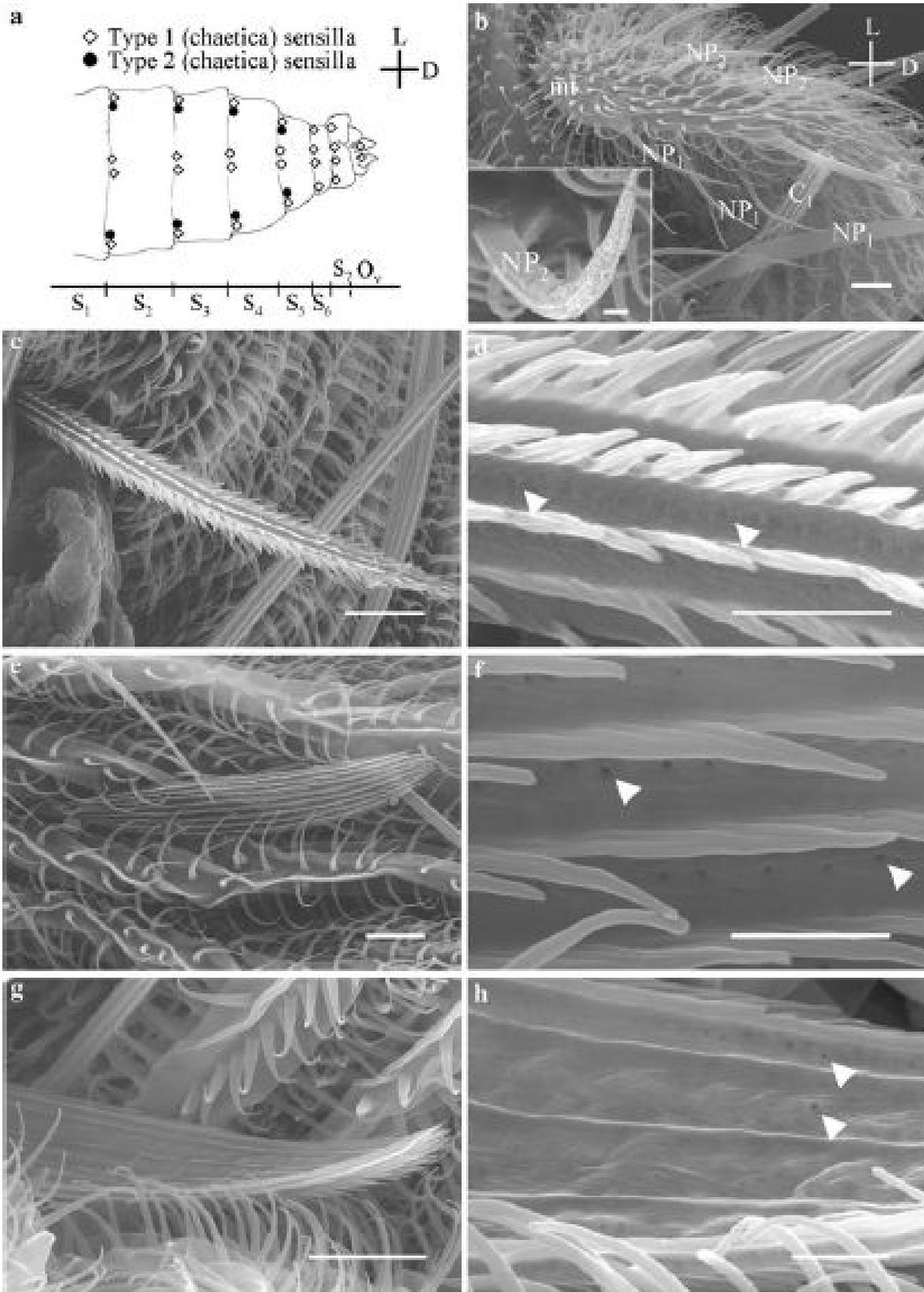
**A**



**Figura 17**

- a)** Vista ventrale dell'addome esteso di un insetto femmina *C. imicola*, che mostra la differente posizione dei sensilli chetici lungo i sette segmenti addominali (S1-S7) e l'ovopositore (Ov).
- b)** Vista ventrale dell'ovopositore con i diversi sensilli: C1 = sensillo chetico di tipo 1 (spezzato dal trattamento del preparato), NP 1 = sensillo liscio non poroso, NP2 = sensillo non poroso, con superficie longitudinale a coste (ingrandimento nel riquadro), mt = microtrichia).

I due differenti morfotipi di sensilli olfattivi multiporo comprendono i sensilli chetici di tipo 1 (**c,d**) e di tipo 2 (**e-h**). L = sinistra, D = distale; barra = 100  $\mu\text{m}$  in **a**, 5  $\mu\text{m}$  in **b, c, e, g**, 1  $\mu\text{m}$  in **d, f, h**.



***Figura 18***

Esempi di derivazioni EAG in risposta alle stimolazioni dell'antenna con L-(+)-lactic acid, 1-octen-3-ol, 3-ethylphenol e 4-propylphenol alle diluizioni 1:10.

(Per gentile concessione di Sollai et al., 2007)

L-(+)-lactic acid



1-octen-3-ol



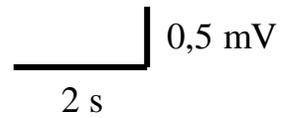
3-ethylphenol



4-propylphenol



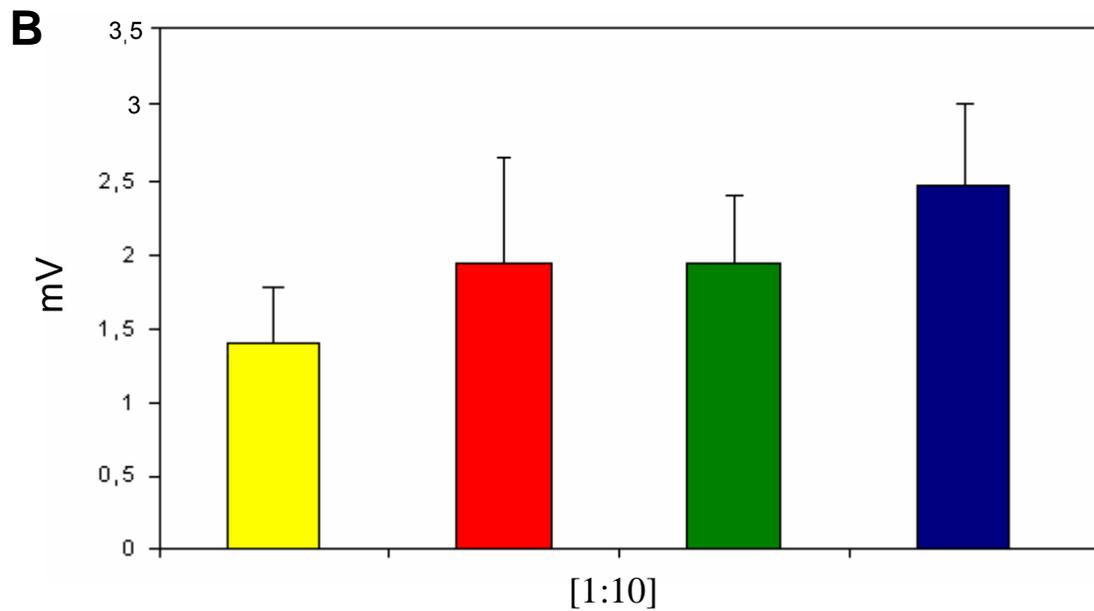
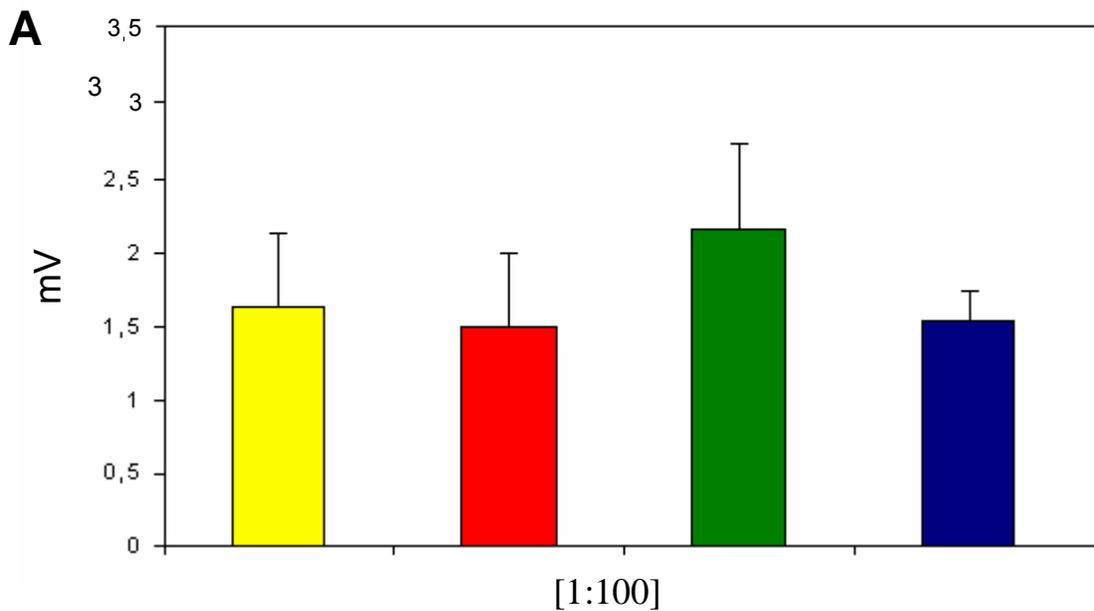
Air control



***Figura 19***

Istogrammi dei valori medi  $\pm$  errore standard (ES) delle risposte EAG in seguito alle stimolazioni dell'antenna con L-(+)-lactic acid, 1-octen-3-ol, 3-ethylphenol e 4-propylphenol alle diluizioni 1:100 (A) e 1:10 (B).

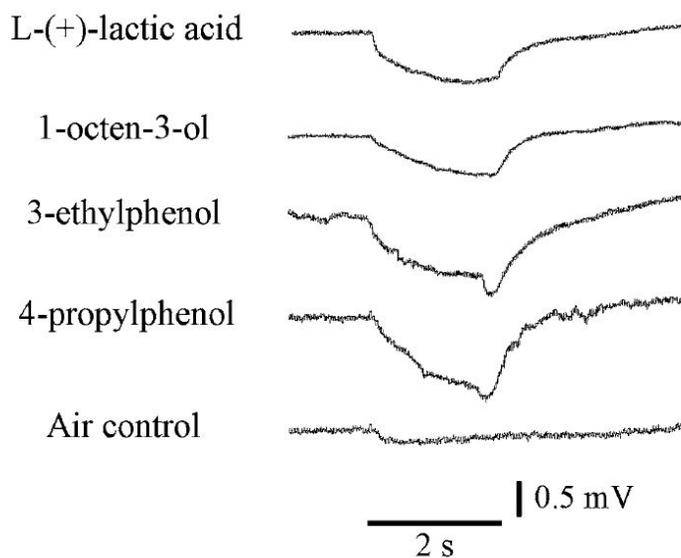
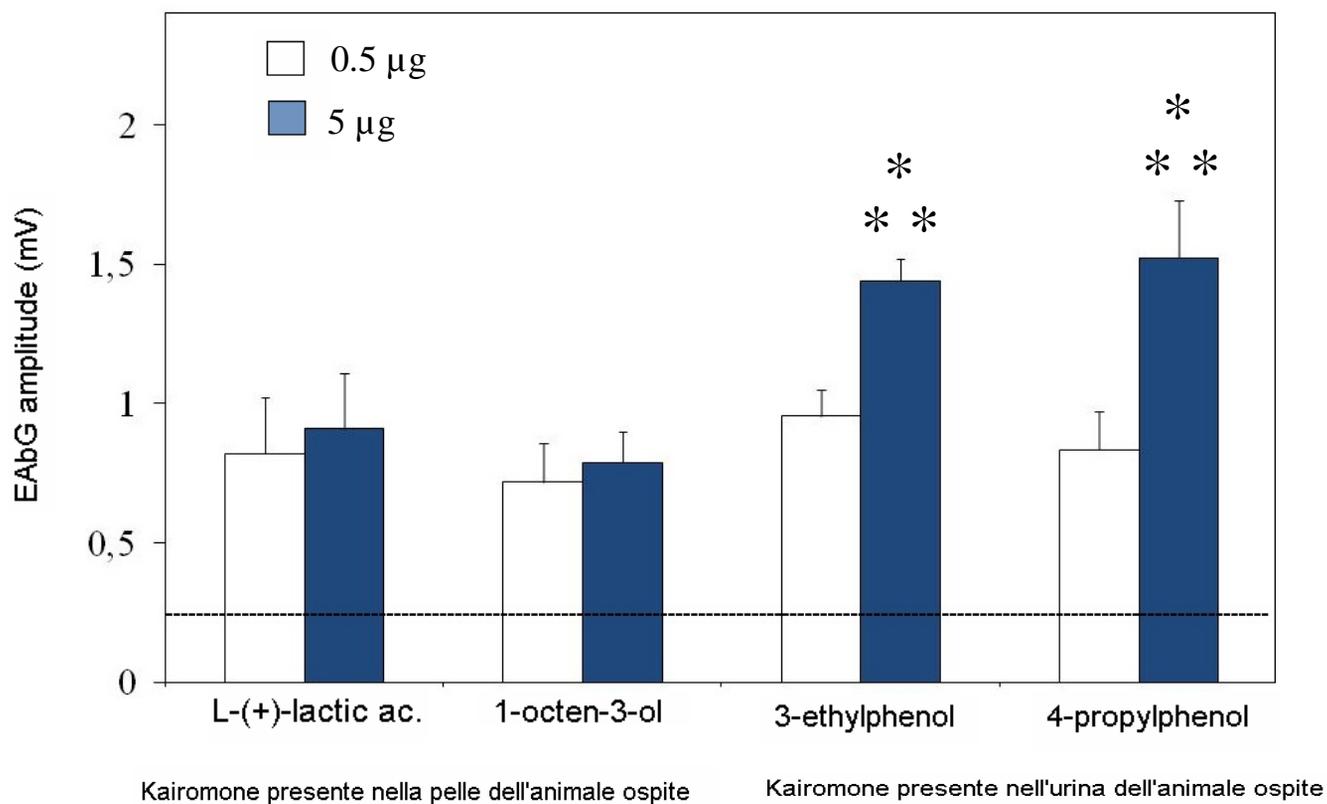
(Per gentile concessione di Sollai et al., 2007)



***Figura 20***

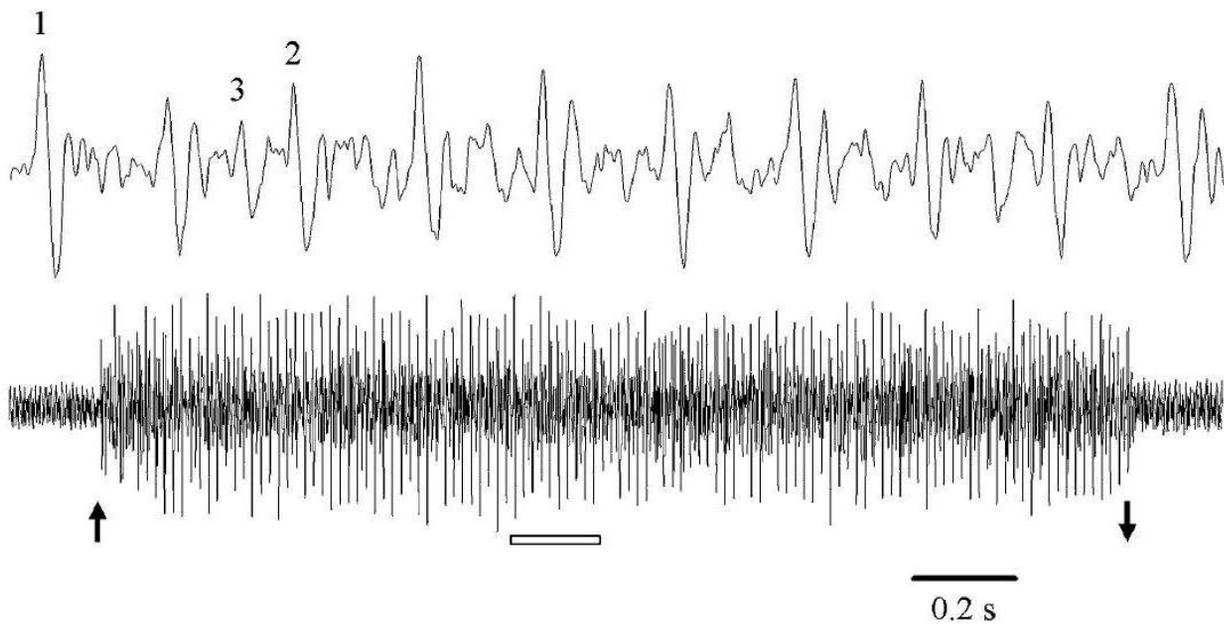
Esempi di derivazioni EAbG (A) e relativi istogrammi delle ampiezze (B) ottenuti in seguito a stimolazione con L-(+)-lactic acid, 1-octen-3-ol, 3-ethylphenol e 4-propylphenol testati ai due dosaggi 0,5 e 5 µg. Valori medi ± errore standard (ES) ottenuti da 18-20 preparati. La linea tratteggiata rappresenta il valore del controllo (aria).

L'asterisco (\*) e il doppio asterisco (\*\*) indicano le differenze significative ( $p \leq 0,05$ ) rispetto a L-(+)-lactic acid e 1-octen-3-ol, rispettivamente.

**A****B**

***Figura 21***

Esempio di registrazione da un singolo sensillo chetico di tipo 1 dell'ovopositore in risposta al L-(+)-lactic acid, che mostra l'attività a "spike" di tre differenti chemorecettori (1, 2 e 3), classificati sulla base delle diverse ampiezze e forme d'onda. Il tracciato superiore rappresenta un allargamento della porzione di scarica sottolineata.

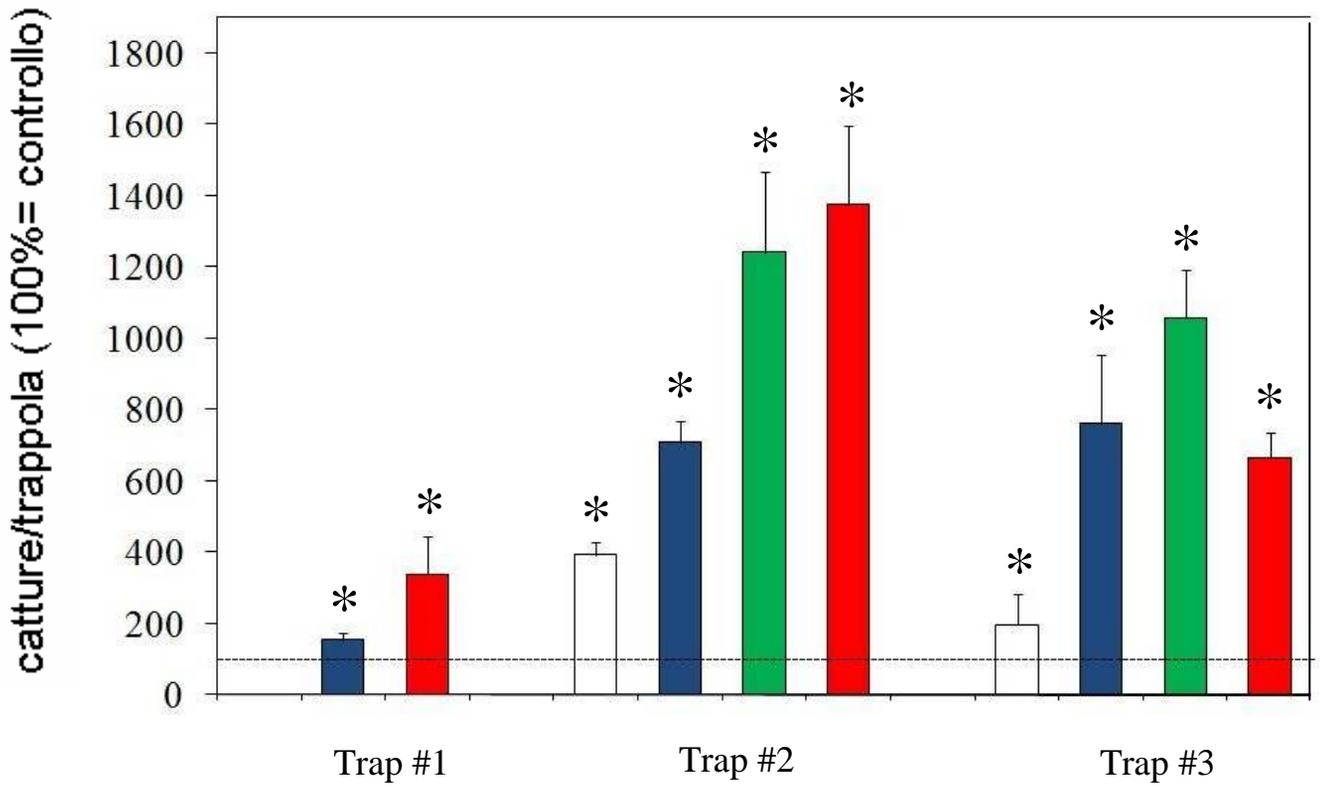


### ***Figura 22***

Istogrammi normalizzati del numero di insetti catturati dalla trappola # 1 (all'interno dell'ovile, nella zona di stazionamento del gregge) innescata con 1-octen-3-ol e olio di semi di sesamo e dalle trappole # 2 e # 3 (all' interno e all'esterno dell'ovile, rispettivamente, ma entrambe lontane dal gregge), innescate con 1-octen-3-ol, 3-ethylphenol, 4-propylphenol e olio di semi di sesamo, rispetto ai relativi controlli (trappole non innescate), posti come il 100% delle catture.

Valori medi  $\pm$  errore standard (ES) ottenuti da 6 a 9 replicati per composto per trappola.

L'asterisco indica le differenze significative ( $p \leq 0,05$ ) rispetto ai controlli.

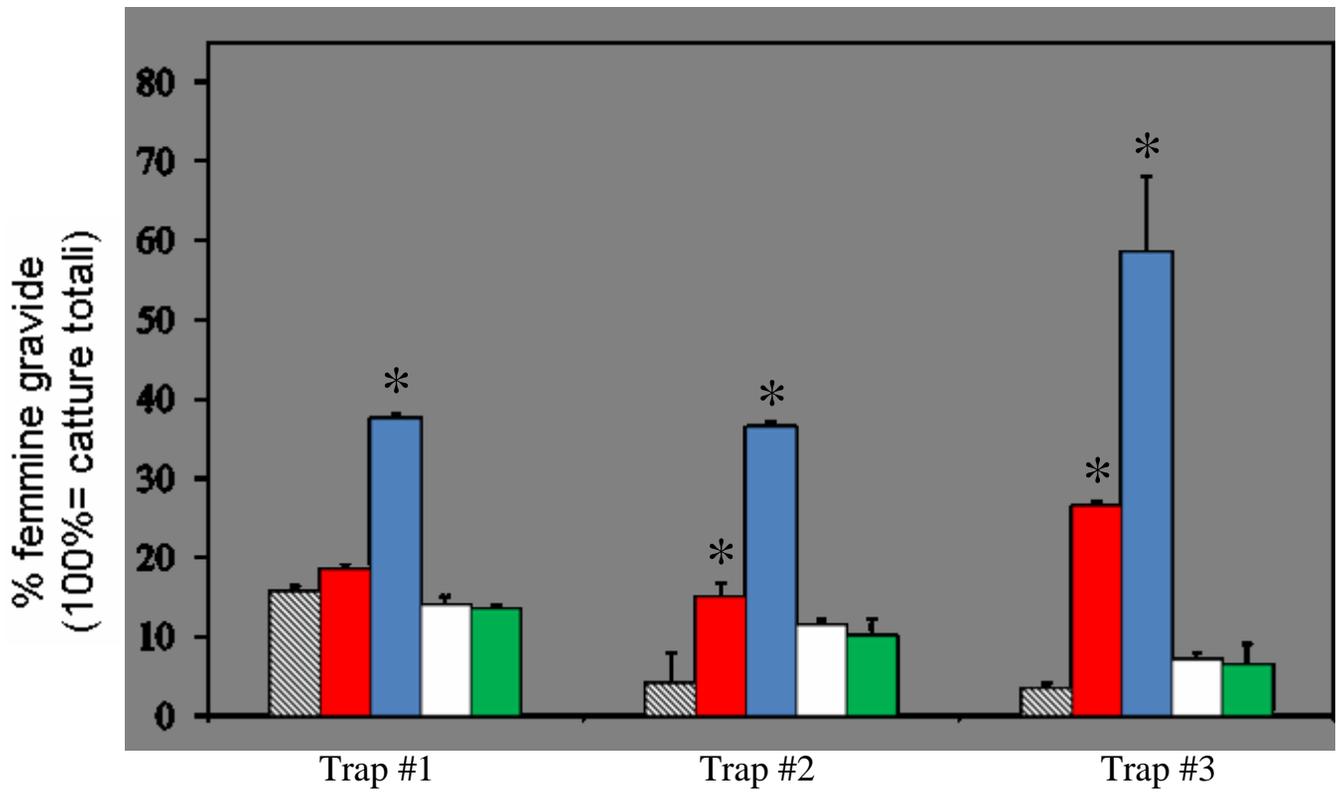
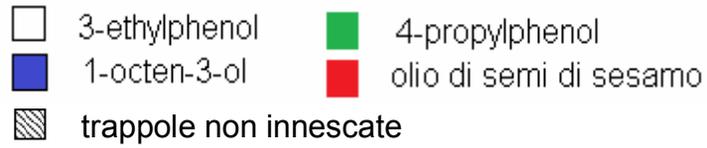


***Figura 23***

Istogrammi normalizzati del numero di insetti femmine gravide catturate dalla trappola # 1 (all'interno dell'ovile, nella zona di stazionamento del gregge) e dalle trappole # 2 e # 3 (all'interno e all'esterno dell'ovile, rispettivamente, ma entrambe lontane dal gregge) non innescate (controlli) o innescata con 1-octen-3-ol, 3-ethylphenol, 4-propylphenol e olio di semi di sesamo, rispetto alle catture totali, poste come il 100% delle catture.

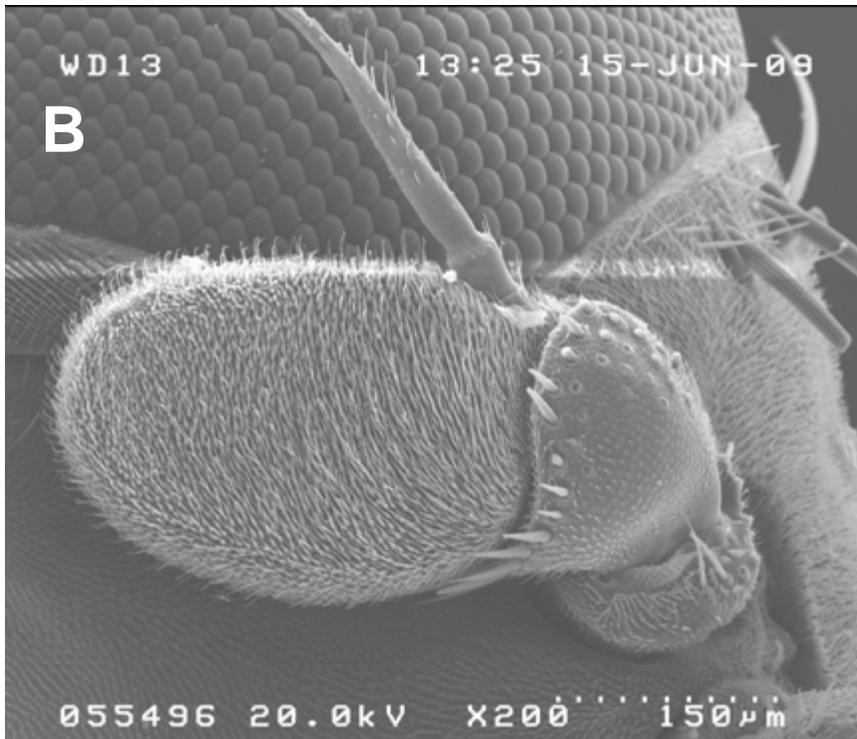
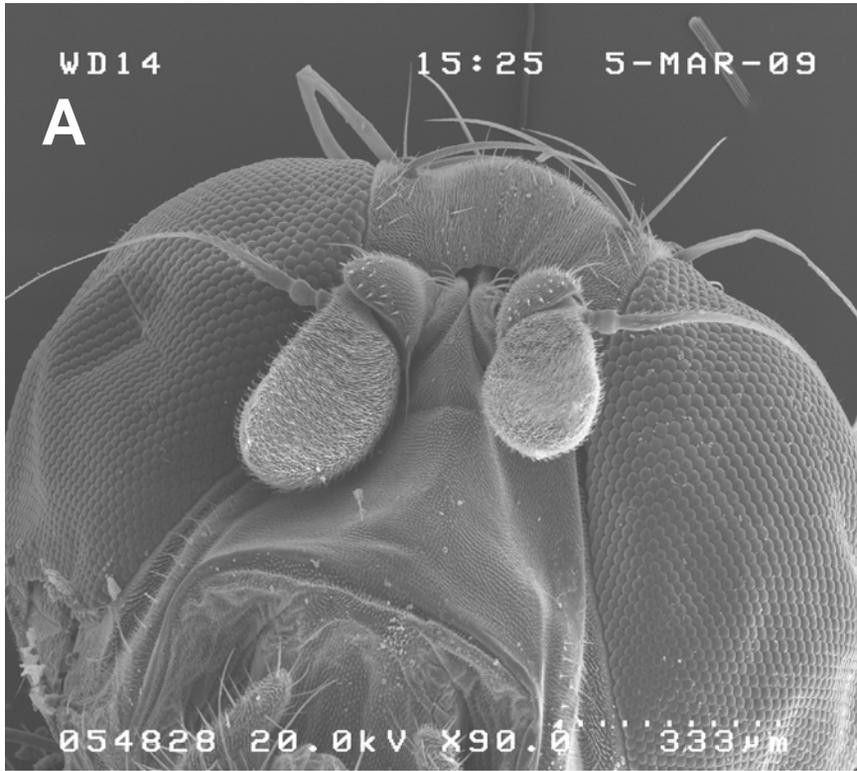
Valori medi  $\pm$  errore standard (ES) ottenuti da 4-5 replicati per composto per trappola.

L'asterisco indica le differenze significative ( $p \leq 0,05$ ) rispetto ai controlli.



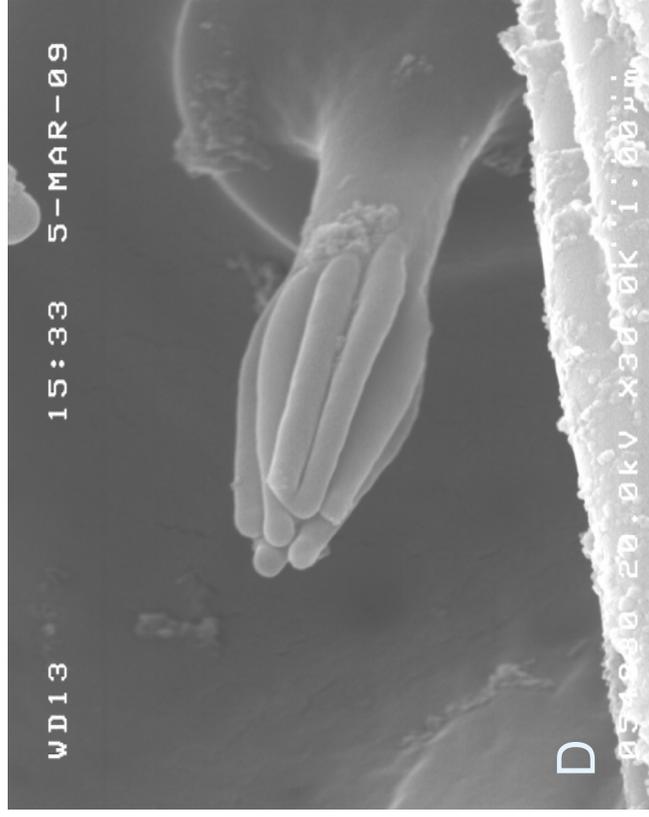
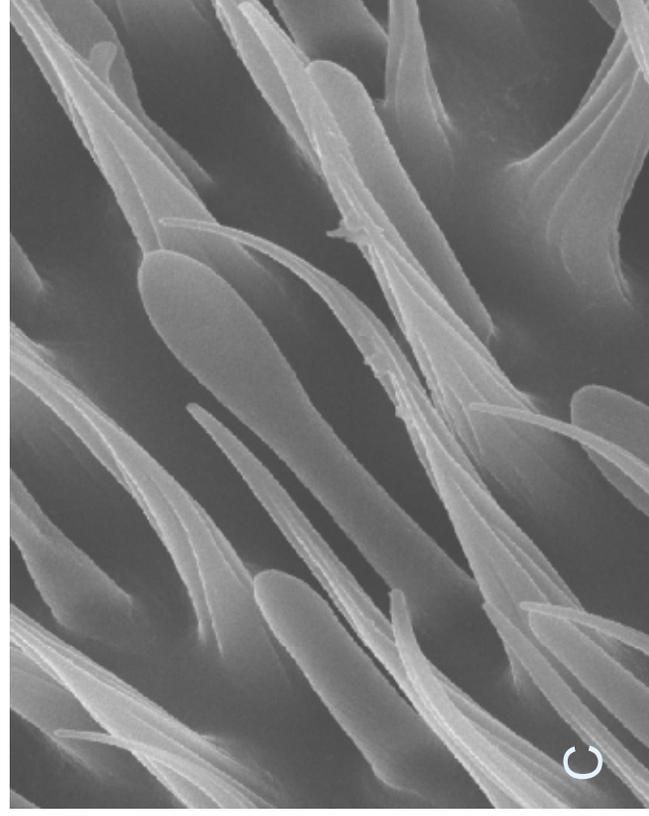
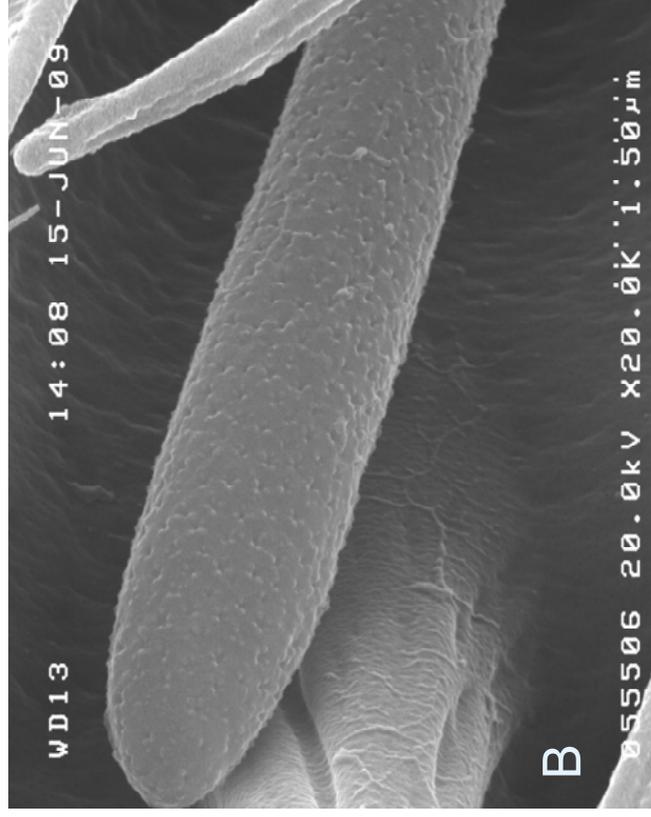
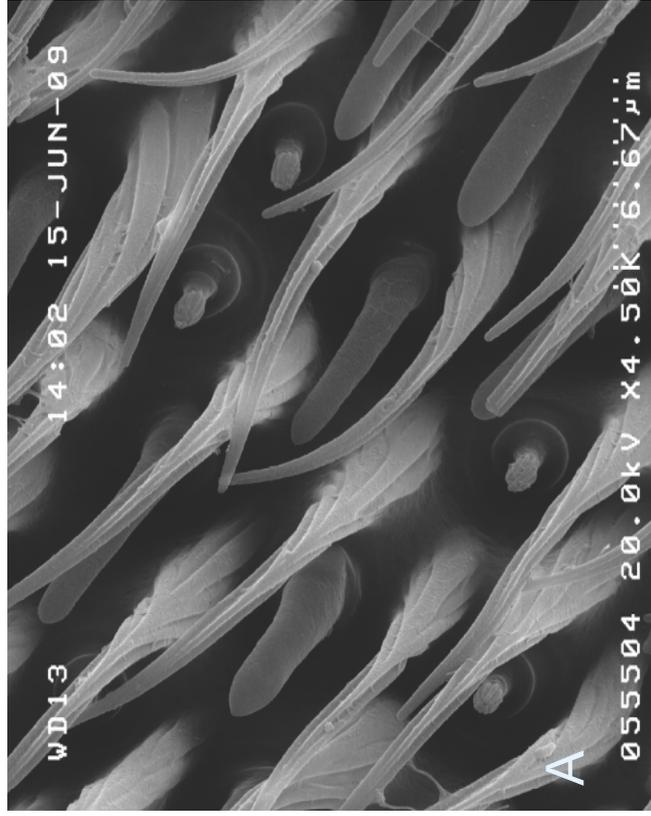
***Figura 24***

Microfotografie a scansione elettronica (ingrandimento x90 e x200, rispettivamente) della testa (A) e dell'antenna (B) di *Ceratitis capitata*.



***Figura 25***

Serie di microfotografie a scansione elettronica (ingrandimento x4.5K, x13K, x20K e x30K, rispettivamente) dei sensilli tricoidei (A), di un sensillo basiconico multiporo (B), di un sensillo basiconico clavato (C), e di un sensillo fiammato (D).



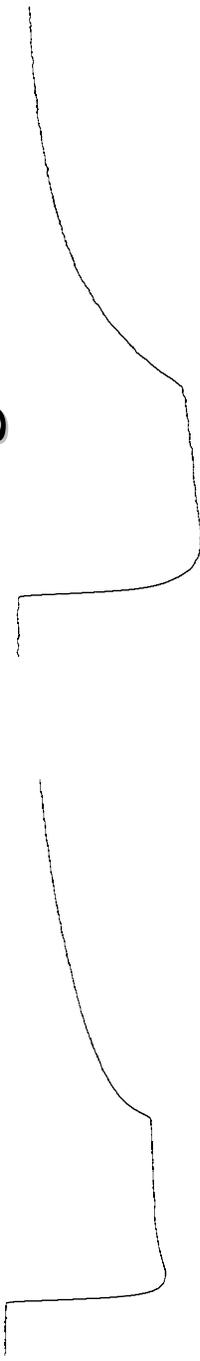
***Figura 26***

Esempi di derivazioni EAG in risposta alla stimolazione con arancia, mela e rispettive foglie.

*Arancia*

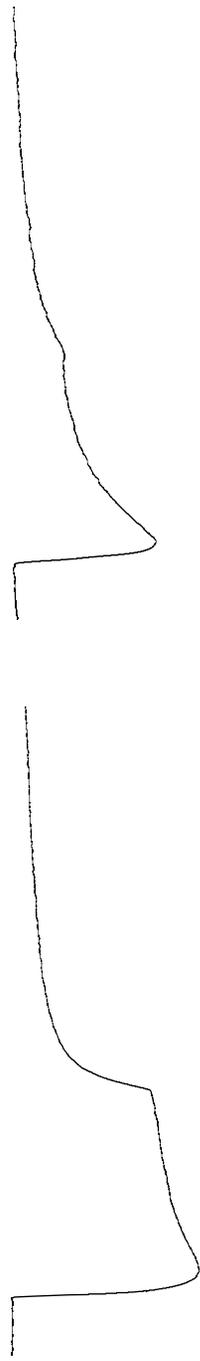
*Frutti*

*Foglie*



*Mela*

2 mV  
2 s



***Figura 27***

Istogrammi dei valori medi  $\pm$  errore standard (ES) delle risposte EAG in seguito alle stimolazioni dei sensilli antennali di femmine e maschi con i frutti: mandarancio, arancia, fico d'india, limone, mela.

LEGENDA

- a. Differenze tra i sessi e stato fisiologico nella stessa popolazione ( $p \leq 0,05$ )
- b. Differenze tra insetti allevati in laboratorio e insetti selvatici appartenenti allo stesso sesso e stato fisiologico ( $p \leq 0,05$ )
- c. Differenze tra maschi accoppiati e vergini all'interno della stessa popolazione ( $p \leq 0,05$ )
- d. Differenze tra femmine accoppiate e vergini all'interno della stessa popolazione ( $p \leq 0,05$ )

*Insetti accoppiati*

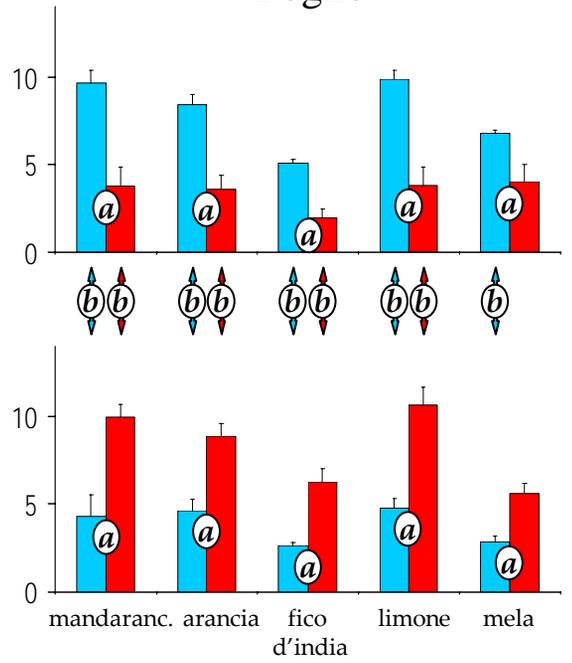
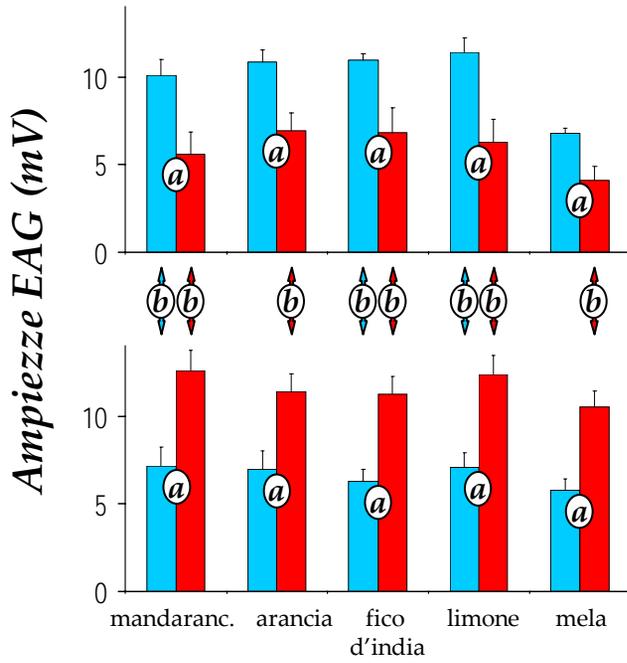
maschi femmine

Laboratorio

Wild

Frutti

Foglie



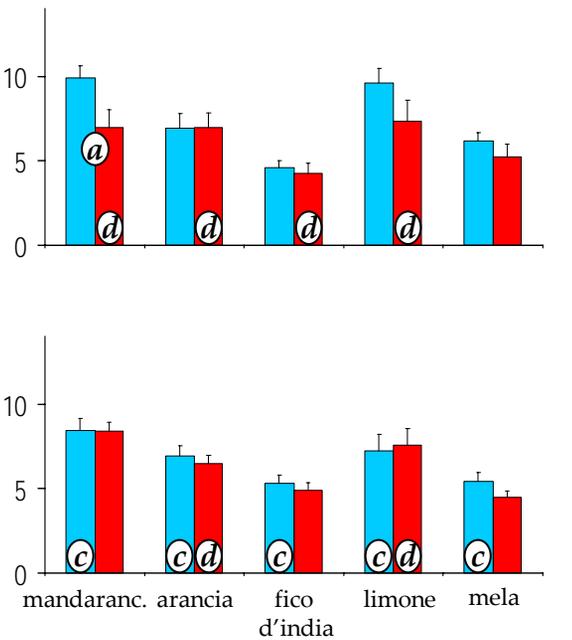
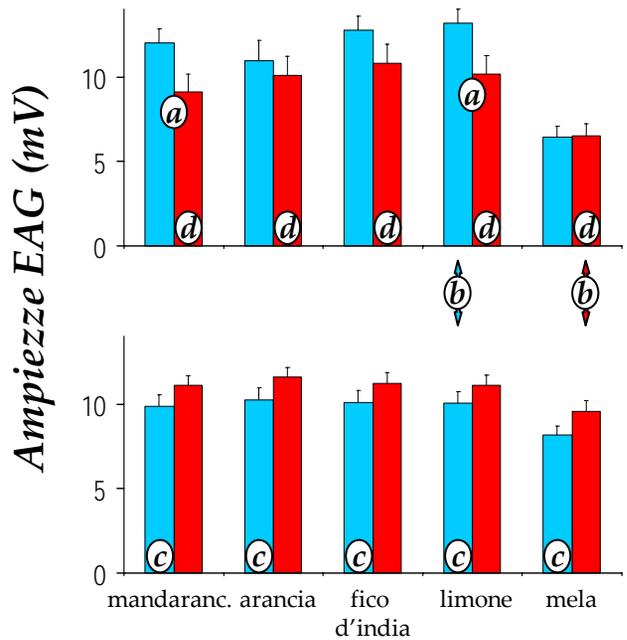
*Insetti vergini*

Frutti

Foglie

Laboratorio

Wild



***Figura 28***

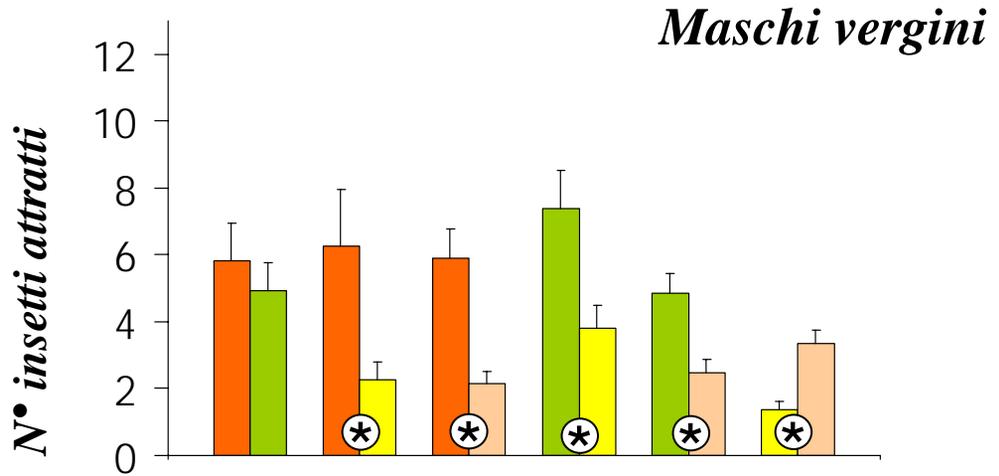
Istogrammi del numero di insetti maschi vergini (A) e femmine vergini (B) della mosca mediterranea della frutta *C. capitata* posatisi sui frutti mandarancio, arancia, fico d'india, limone e mela.

Valori medi  $\pm$  errore standard (ES) ottenuti da 20-26 insetti.

L'asterisco indica le differenze statisticamente significative ( $p \leq 0,05$ ).

Arancia Mela Limone Fico d'india

A



B

