

# DROSOPHILA SUZUKII E MARCIUME ACIDO UN RUOLO ATTIVO NELLA DIFFUSIONE?

*Drosophila suzukii* è giunta in Europa nel 2009 e da subito ha messo in chiaro la sua pericolosità, soprattutto per piccoli frutti e ciliegie, causando ingenti danni economici e costringendo alla revisione delle linee guida di difesa integrata. E per quanto riguarda l'uva? Uno studio multidisciplinare condotto presso la Fondazione Mach ha cercato di chiarire le interazioni dell'insetto con l'uva e il suo ruolo nell'insorgenza e diffusione del marciume acido in vigneto.



Di  
**Franca Ghidoni**<sup>1</sup>  
**Tomás Román**<sup>2</sup>  
**Raffaele Guzzon**<sup>3</sup>  
**Claudio Ioratti**<sup>4</sup>

Centro Trasferimento Tecnologico,  
 Fondazione Mach - San Michele all'Adige (TN)

**Valerio Mazzoni**  
 Centro Ricerca e Innovazione,  
 Fondazione Mach - San Michele all'Adige (TN)

**Gianfranco Anfora**  
 C3A, Centro Agricoltura Alimenti Ambiente,  
 Università di Trento (TN)

## INTRODUZIONE

● *Drosophila suzukii* (Diptera, Drosophilidae; Matsumura 1931) è un dittero originario dell'Asia molto simile a *Drosophila melanogaster*, il comune moscerino dell'aceto (o della frutta). Introdotta in Europa nel 2009, è considerata una minaccia per la frutticoltura mondiale (Cini *et al.* 2012) poichè:

- ovidepone in frutta sana, ancora in pianta;
- preferisce i frutti in maturazione rispetto a quelli sovraturati (Mitsui *et al.* 2006);
- le sue larve portano i frutti a rapido disfacimento, rendendone impossibile la commercializzazione;
- favorisce l'insediamento di altri insetti (in particolare altri drosophilidi) e di marciumi e/o funghi secondari.

● Le femmine di *D. suzukii* presentano un ovopositore molto forte e seghettato (**Fig. 1**), caratteristica importante nel riconoscimento della specie, mentre i maschi (**Fig. 2**) sono identificabili grazie a due macchie nere che compaiono sulle ali entro due giorni dallo sfarfallamento, rendendone il riconoscimento più difficile all'inizio della fase di adulto (Hauser 2011). Le uova, difficilmente visibili ad occhio nudo, non presentano caratteristiche specie-specifiche; possono però essere identificate per come vengono deposte nel frutto: l'uovo infatti viene inserito nella polpa tramite il forte ovopositore, mentre i due processi respiratori rimangono all'esterno (**Fig. 3**).

● *D. suzukii* è una specie molto polifaga che completa il suo ciclo sia su piante

spontanee, sia su piante coltivate. Piccoli frutti e ciliegie sono le colture maggiormente suscettibili, ma la vite non è indenne dall'attacco dell'insetto.

● Studi di laboratorio e osservazioni di campo hanno evidenziato una spiccata differenziazione della suscettibilità varietale in vite (Linder *et al.* 2014; Ioriatti *et al.* 2015; Andreatta *et al.* 2016), anche se solo poche uova vengono deposte in uva rispetto ai piccoli frutti (Bellamy *et al.* 2013; Ioriatti *et al.* 2015).

● Le uve da vino, infatti, sono un ospite poco adatto per *D. suzukii*: lo sviluppo delle larve è rallentato e il tasso di sopravvivenza è molto basso ed è direttamente legato allo stadio di maturazione degli acini (Maignashca *et al.* 2010; Lee *et al.* 2011; Linder *et al.* 2014; Ioriatti *et al.* 2015).

**Tab. 1** - Verifica della capacità di *D. suzukii* di veicolare gli agenti causali del marciume acido. Valori medi (N=10) e deviazione standard della carica microbica in relazione alle fonti di contaminazione definite nei trattamenti sperimentali. I livelli di carica microbica sono riferiti al gruppo A.

Trattamento	"A" (Acini sterilizzati)	"B"	Batteri acetici (UFC/g)	Batteri lattici	Lieviti <i>Saccharomyces</i> (UFC/g)	Lieviti non- <i>Saccharomyces</i> (UFC/g)
	Acini analizzati	Acini fonte di contaminazione				
<b>a (controllo)</b>	Integri	Integri	5.0 ± 0.0 x 10 <sup>1</sup> a	5.0 ± 0.0 x 10 <sup>1</sup> a	1.8 ± 2.5 x 10 <sup>4</sup> a	2.2 ± 3.0 x 10 <sup>4</sup> a
<b>b</b>	Integri	Incisi	6.0 ± 1.1 x 10 <sup>3</sup> b	1.6 ± 2.3 x 10 <sup>3</sup> b	6.8 ± 7.1 x 10 <sup>4</sup> a	2.6 ± 2.4 x 10 <sup>4</sup> a
<b>c</b>	Integri	Incisi ed inoculati con batteri acetici	6.8 ± 12 x 10 <sup>3</sup> b	2.8 ± 2.6 x 10 <sup>3</sup> b	4.7 ± 6.3 x 10 <sup>3</sup> a	5.8 ± 11 x 10 <sup>4</sup> a
<b>d</b>	Incisi	Integri	4.8 ± 4.6 x 10 <sup>6</sup> c	2.0 ± 3.3 x 10 <sup>6</sup> c	1.3 ± 1.2 x 10 <sup>6</sup> b	3.1 ± 5.3 x 10 <sup>7</sup> b
<b>e</b>	Incisi	Incisi ed inoculati con batteri acetici	9.2 ± 9.2 x 10 <sup>6</sup> c	2.6 ± 4.6 x 10 <sup>6</sup> c	1.1 ± 0.9 x 10 <sup>5</sup> b	2.0 ± 3.2 x 10 <sup>7</sup> b

I dati sono considerati significativi quando la differenza tra i valori è > 1 unità logaritmica.

- Popolazioni composte da diverse specie di drosofilidi sono normalmente attive nei vigneti a partire dall'invasatura e la loro presenza diventa sempre più cospicua avvicinandosi al periodo di vendemmia (Pajač Živković *et al.* 2016).

- I drosofilidi come *D. melanogaster* sono riconosciuti vettori di comunità microbiche associate all'insorgenza di marciume acido (Fermaud *et al.* 2002): acini danneggiati e compromessi diventano - sia come substrato di nutrizione, sia come sito di ovodeposizione - attrattivi per le drosofile, le quali aumentano la loro presenza in vigneto e favoriscono la diffusione di batteri e lieviti.

- *D. suzukii* visita, oltre ad acini deteriorati, anche quelli integri sui quali potrebbe, in linea di principio, favorire ulteriormente la diffusione di comunità microbiche collegate al marciume. Scopo di questo lavoro è stato, quindi, proprio quello di deter-

minare quanto la presenza su uva da vino di questo insetto "alieno" possa essere un reale fattore di rischio nello sviluppo di marciume acido in vigneto.

## PARTE SPERIMENTALE

- La sperimentazione è stata condotta in laboratorio e in campo per determinare la capacità di *D. suzukii* di veicolare lieviti e batteri. Per fare ciò sono stati pianificati diversi esperimenti nei quali sono stati utilizzati insetti allevati in laboratorio e miscele di lieviti e batteri in grado di ricreare, almeno in parte, la comunità microbica responsabile del marciume acido.

- Ulteriori precisazioni circa le metodiche chimico analitiche e gli approcci statistici applicati nella valutazione dei risultati sono ricavabili da Ioriatti *et al.* (2017).

## PROVE DI LABORATORIO

### Contaminazione per contatto

- L'obiettivo è comprendere se *D. suzukii* possa diffondere il marciume acido tra acini danneggiati e acini integri. Il test è stato condotto in gabbie di plastica divise in due settori denominati rispettivamente "A" e "B". In ognuno dei 2 settori sono stati posti acini (n=10) di cv Italia, resistente all'ovodeposizione (Andreazza *et al.* 2016). Gli acini posti nel settore "A" sono stati inizialmente sterilizzati con una soluzione di etanolo al 96% per 5 minuti e, al momento della deposizione nelle gabbie, è stata creata una fonte di variazione lasciandoli come tali, ossia "integri", oppure incidendoli meccanicamente con bisturi sterilizzati ("incisi").

mente con bisturi sterilizzato ("incisi").

- Nel settore "B", invece, sono stati inseriti acini non sterilizzati appartenenti ad una delle seguenti categorie: integri, incisi oppure incisi e inoculati con batteri acetici. Utilizzando le diverse categorie di acini posti nei due settori delle gabbie sono stati sviluppati 5 diversi trattamenti (trattamenti "a-e") (Fig. 4); ogni trattamento è stato replicato per 4 volte.

- In ogni gabbia sono stati rilasciati maschi e femmine adulti di *D. suzukii* e lasciati a contatto degli acini per 7 giorni (T7) in condizioni controllate. A T7 gli acini posti nella sezione "A" sono stati analizzati per verificare lo sviluppo di batteri e lieviti.

## Risultati

- I risultati delle analisi sugli acini contenuti nella parte "A" della gabbia sono riportati in Tab. 1. Il trattamento "a" (ste-

**Fig. 1** - Ovodepositore di *D. suzukii*, carattere importante per il riconoscimento della specie.



**Fig. 2** - Maschio di *D. suzukii*. I punti neri sulle ali aiutano nel riconoscimento della specie, soprattutto in campo.



rilizzati-integri, integri) è stato utilizzato come controllo: sugli acini integri preventivamente sterilizzati c'è stato un limitato sviluppo di batteri e lieviti.

- In altri termini, gli acini integri non sterilizzati non hanno costituito una rilevante fonte di inoculo. Nei trattamenti "b" e "c" la crescita di batteri acetici e lattici è aumentata in modo statisticamente significativo rispetto al controllo; infine nelle tesi "d" ed "e", nelle quali gli acini analizzati erano stati preventivamente danneggiati, è stato rilevato il maggior sviluppo di batteri, indipendentemente dallo stato (intero o danneggiato) della fonte di contaminazione (acini posti nel settore "B" delle gabbie). Prendendo in considerazione i lieviti - sia *Saccharomyces*, sia non-*Saccharomyces* - un significativo aumento della loro presenza è stato rilevato sugli acini danneggiati, mentre su acini integri non si sono notate differenze tra il controllo e le diverse tesi.

### Contaminazione tramite ovodeposizione

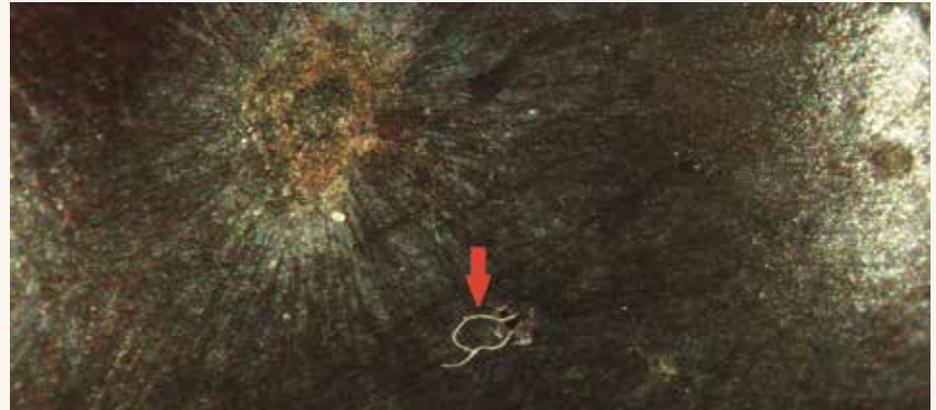
- L'obiettivo è verificare se lo sviluppo di marciume acido sia una conseguenza diretta dell'ovodeposizione. Per questo sono stati utilizzati 200 acini di 3 varietà suscettibili all'ovodeposizione: Schiava grossa e Pinot nero (Ioriatti *et al*, 2015) e Cabernet sauvignon (osservazioni personali di campo, dati non pubblicati). Tutti gli acini sono stati preventivamente sterilizzati lasciandoli per 15 minuti in una soluzione di acqua ed etanolo al 70% (per la procedura completa si veda Ioriatti *et al*. 2017).

- Gli acini di ogni cultivar sono stati lasciati integri (n = 100) oppure incisi con un bisturi (n = 100). Metà degli acini di ogni gruppo (n = 50) sono stati posti a contatto con adulti di *D. suzukii* (6 femmine + 4 maschi), precedentemente infettati con batteri acetici e lattici. Ogni saggio consisteva di 5 acini e sono state effettuate 10 repliche. Dopo 4 giorni (T4) è stata valutata l'ovodeposizione negli acini e dopo 12 giorni (T12) è stato valutato lo sviluppo del marciume acido, verificando la contaminazione con batteri acetici e lo sviluppo di acidità volatile (Fig. 5).

### Risultati

- Il numero di uova deposte nelle diverse tesi è risultato significativamente maggiore in acini danneggiati (7.7±5.5 uova depo-

**Fig. 3** - Uovo di *D. suzukii* in acino di Schiava. *D. suzukii* depone le uova nei frutti in modo caratteristico: l'uovo viene inserito nella polpa, mentre i due processi respiratori (spiracoli) rimangono all'esterno e sono visibili sulla superficie integra del frutto.



ste/acino) rispetto ad acini integri (1.9±1.9 uova deposte/acino). Gli acini sono stati poi analizzati per verificare lo sviluppo di batteri acetici e di acidità volatile nelle diverse tesi: "danneggiati", "integri", "presenza di *D. suzukii*", "senza *D. suzukii*".

- Negli acini danneggiati si ha un maggiore sviluppo di batteri (1.2±0.5 x 10<sup>7</sup> UFC/g) rispetto agli acini integri (7.9±1.9 x 10<sup>6</sup> UFC/g), come già evidenziato nell'esperimento di contaminazione per contatto. Infine, come ci si aspettava, il contenuto di acidità volatile è risultato statisticamente maggiore nella tesi con acini danneggiati (3.55 g/L) rispetto alla tesi acini integri (1.03 g/L).

- L'acidità volatile era maggiore anche nel confronto "presenza di *D. suzukii*" (3.61 g/L) vs "senza *D. suzukii*" (0.36 g/L). Sono quindi evidenti la maggiore attrattività di acini danneggiati nei confronti dell'insetto e, al contempo, la loro maggiore suscettibilità al marciume acido.

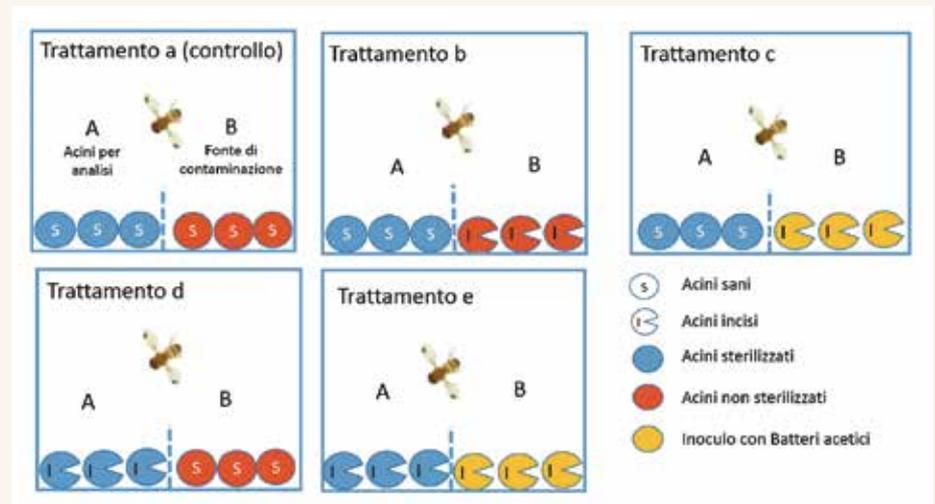
## PROVE DI CAMPO

- I due esperimenti seguenti hanno indagato il comportamento in campo dell'insetto nella scelta dei siti di ovodeposizione e lo sviluppo di marciume acido in seguito all'attacco di *D. suzukii*. Nel 2016 sono stati selezionati 3 vigneti di Schiava nella stessa area climatica (piana Rotaliana, provincia di Trento); all'interno di ogni vigneto sono stati selezionati 45 grappoli integri (3 grappoli/pianta) ed ognuno è stato chiuso in un sacchetto di organza (Fig. 6).

### Ovodeposizione in campo

- L'obiettivo è quello di comprendere meglio il comportamento di ovodeposizione *D. suzukii*. Allo scopo, 5 grappoli per ciascuna delle 3 date seguenti: 7, 17 e 27 settembre rispettivamente 40, 50 e 60 giorni circa dopo l'inizio dell'invasatura, sono stati infestati con adulti di *D. suzukii*

**Fig. 4** - Rappresentazione del piano sperimentale utilizzato per determinare la capacità di *D. suzukii* di trasmettere gli agenti causali del marciume acido per contatto.



in ciascuno dei tre vigneti di Schiava sopraccitati. Dopo 4 giorni si è provveduto alla rimozione degli insetti e alla raccolta dei grappoli. Ogni acino è stato controllato allo stereomicroscopio e categorizzato in relazione alla presenza (g+) o assenza di uova (g-); gli acini dei due gruppi sono stati poi analizzati per la quantificazione di acido malico, acido tartarico, acidità totale, pH, contenuto zuccherino e potassio.

**Risultati**

- Gli acini con (g+) e senza uova (g-) sono stati analizzati per la loro composizione chimica di base nelle tre date di campionamento. La presenza di uova sembra essere legata al grado di maturazione delle uve. Infatti, nella prima data (7 settembre) si osservano differenze significative tra g+ e g- per tutti i parametri, ad eccezione dell'acido tartarico.
- Nell'intorno della seconda data di campionamento (14-22 settembre) le differenze sono significative solo per gli zuccheri, maggiore negli acini con uova, e per l'acido malico, maggiore negli acini senza uova. Infine nel terzo periodo (26-27 settembre) gli acini differiscono per acidità totale e contenuto di acido tartarico, a valori maggiori negli acini senza uova, e per i valori di pH, maggiori negli acini con uova (Fig. 7).

**Sviluppo di marciume acido in vigneto**

- L'obiettivo è comprendere se *D. suzukii* sia la causa principale di sviluppo di marciume acido. Dei sopraccitati 45 grappoli/vigneto insacchettati, i 30 rimanenti

dall'esperimento precedente sono stati infestati con insetti inoculati con batteri acetici e lasciati a contatto con i grappoli per 4 giorni. 15 grappoli sono stati raccolti a distanza di 7 giorni dall'infestazione (T7) e 15 dopo ulteriori 7 giorni (T14), in corrispondenza della data di vendemmia (28-29 settembre).

- Tutti gli acini sono stati controllati singolarmente allo stereomicroscopio e divisi in 3 classi: acini integri (senza uova), acini con uova, acini nei quali c'è stato sviluppo di larve. Ogni gruppo di acini è stato sottoposto ad analisi dell'acidità volatile e gli acini con livelli di acidità volatile >0.1 g/L sono stati considerati attaccati da marciume acido.

**Risultati**

- In tutti i grappoli controllati, sia a T7, sia a T14, erano presenti uova e larve. I tre gruppi di acini (acini integri, acini con uova, acini con larve) sono stati analizzati per evidenziare lo sviluppo di acidità volatile. In nessuno dei campioni con presenza di sole uova è stato evidenziato un incremento dell'acidità volatile, né a T7, né a T14. Nei campioni in cui, invece, le larve sono riuscite a svilupparsi non si osserva sviluppo di acidità volatile a T7, mentre a T14 il 9.5% dei campioni (4 su 42) ha sviluppato acidità volatile da 0.1 g/L a 1.2 g/L.

**CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE**

- L'obiettivo di questo lavoro era di determinare la capacità di *D. suzukii* di veico-

lare gli agenti causali di marciume acido, come già verificato per *D. melanogaster* e altri drosophilidi (Fermaud *et al.* 2002). I primi risultati ottenuti evidenziano che:

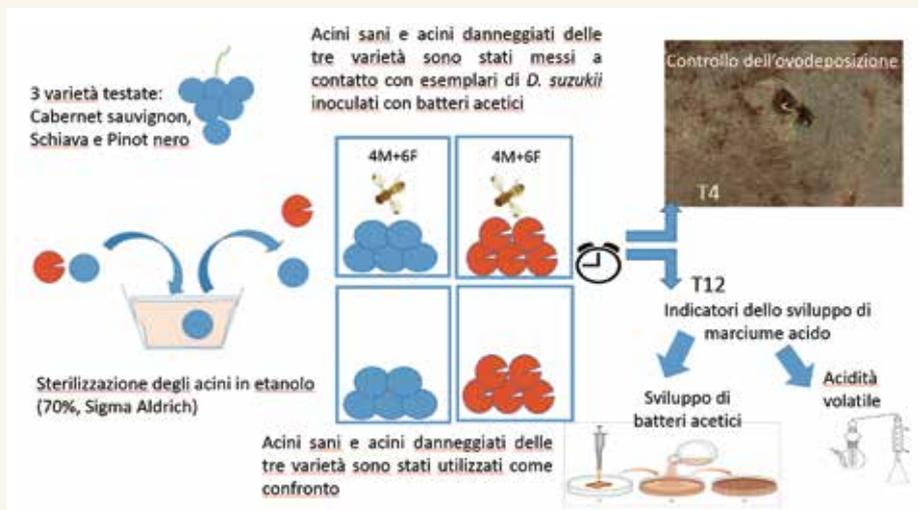
- *D. suzukii* può veicolare batteri acetici attraverso il contatto e/o nutrendosi su acini danneggiati;
- il marciume acido (acidità volatile negli acini >0.1 g/L) si può sviluppare a causa del microbiota trasportato da *D. suzukii* da/su acini danneggiati;
- l'ovoposizione su acini integri non è condizione di per sé sufficiente per lo sviluppo del marciume acido, condizione verificata anche in test di pieno campo; per lo sviluppo di marciume acido è indispensabile che le uova schiudano e che si sviluppi la larva;
- contenuto zuccherino, acidità e pH sembrerebbero avere un ruolo nella scelta del sito di ovodeposizione.
- Analizzando il comportamento delle femmine si evidenzia come, all'inizio dell'infestazione (che equivale a circa 20-30 giorni prima della vendemmia per la varietà Schiava), esse siano maggiormente propense a scegliere come sito di ovodeposizione acini con maggior contenuto di zuccheri e minore acidità: la scelta dell'acino in cui ovodeporre è quindi guidata dalle componenti chimico-compositive dei singoli acini o comunque da aspetti compositivi correlati alle componenti analizzate.

● Si può quindi concludere che non è l'ovodeposizione su acini integri, di per sé, a determinare lo sviluppo di marciume acido. Finché gli acini rimangono integri non sono suscettibili allo sviluppo della patologia. Durante la maturazione diversi fattori (piogge, vento, uccelli, altri insetti, grandine,...) possono alterare l'integrità dell'acino e influenzare in maniera importante il microbiota dell'uva, primo responsabile dello sviluppo di marciume acido (Barata *et al.*, 2012). La presenza poi di marciume acido in vigneto può infine creare un ciclo detto di "feedback positivo" attrattivo per i drosophilidi (Mazzetto *et al.*, 2016; Rombaut *et al.*, 2017), i quali, nutrendosi su acini danneggiati, contribuiscono alla diffusione della malattia.

**BIBLIOGRAFIA**

- Andrezza, F., Baronio, C., Botton, M., Valgas, R., Ritschel, P., Maia, J., Nava, D. (2016). Suscetibilidade de bagas de genótipos de videira pela infestação por *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae).

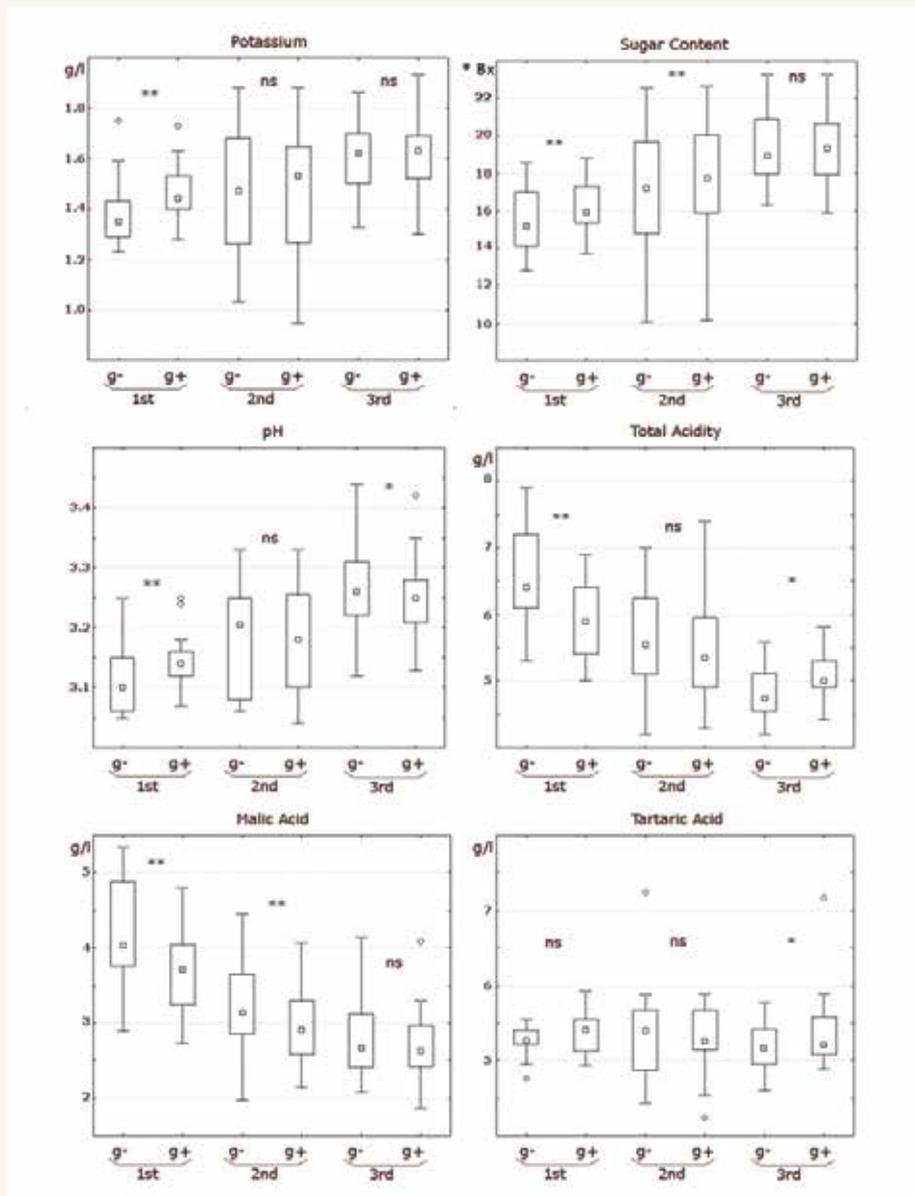
**Fig. 5** - Rappresentazione del piano sperimentale usato per determinare la capacità di *D. suzukii* di trasmettere gli agenti causali del marciume acido attraverso l'ovodeposizione.



**Fig. 6** - Grappolo insacchettato per lo svolgimento delle prove in campo.



**Fig.7** - Distribuzione dei valori dei principali parametri compositivi delle uve misurati per ciascuno dei tre periodi di campionamento (1st, 07/09; 2nd, 14-22/09; 3rd, 26-27/09), in acini con (g+) e senza (g-) uova di *D. suzukii*. I risultati sono stati analizzati tramite test Wilcoxon (\*P<0.05; \*\*P<0.01) tra le coppie g+ e g- dello stesso periodo di campionamento.



Pesq. Agropec. Bras. Brasília, 51, 599-606.

- Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V. (2012). The microbial ecology of wine grape berries. *Int. J. Food Microbiol.*, 153, 243-259.
- Bellamy, D., Sisterson, M., Walse, S. (2013). Quantifying host potentials: indexing postharvest fresh fruits for spotted wing drosophila, *Drosophila suzukii*. *PLoS One*, 8: e61227.
- Cini, A., Ioriatti, C., Anfora, G. (2012). A review of the invasion of *Drosophila suzukii* in Europe and a draft research agenda for Integrated Pest Management. *Bull. Insectology*, 65, 149-160.
- Fermaud, M., Gravot, E., Blancard, D. (2002). La pourriture acide dans le vignoble bordelais, 2<sup>e</sup> Vection par les drosophiles des micro-organismes pathogènes. *Phytoma*, 546, 41-44.
- Hauser, M. (2011). A historic account of the invasion of *Drosophila suzukii* (Matsumura) (Diptera: Drosophilidae) Contributes to the Development of Sour Rot in Grape. *Journal of Economic Entomology*, 111, 283-292. doi:10.1093/jeet/tox292.
- Ioriatti, C., Walton, V., Dalton, D., Anfora, G., Grassi, A., Maistri, S., Mazzoni, V. (2015). *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) and its potential impact to wine grapes during harvest in two cool climate wine grape production regions. *J. Econ. Entomol.*, 108, 1148-1155.
- Lee, J., Bruck, D., Curry, H., Edwards, D., Haviland, D., Van Steenwyk, R., Yorgey, B. (2011). The susceptibility of small fruits and cherries to the spotted-wing drosophila, *Drosophila suzukii*. *Pest Manag. Sci.*, 67, 1358-1367.
- Linder, C., Martin, C., Labois, S., Chatelain, P., Kehrli, P. (2014). Susceptibility of various grape cultivars to *Drosophila suzukii* and other vinegar flies. *IOBC-WPRS Bulletin*, 105, 219-224.
- Maiguashca, F., Ferguson, H., Bahder, B., Brooks, T., O'Neal, S., Walsh, D. (2010, August 28). SWD ovipositing on grapes in laboratory; partial maggot survival. Washington State University Extension, Spotted Wing Drosophila Grape Update.
- Matsumura, S. (1931). 6000 illustrated insects of Japan-empire (in Japanese). Tokyo: Tokohshoin.
- Mazzetto, F., Gonella, E., Crotti, E., Vacchini, V., Syrpas, M., Pontini, M., Mangelinckx, S., Daffonchio, D., Alma, A. (2016). Olfactory attraction of *Drosophila suzukii* by symbiotic acetic acid bacteria. *J. Pest. Sci.*, 89, 783-792.
- Mitsui H., Takahashi H. K., Kimura M. T., (2006). Spatial distributions and clutch sizes of *Drosophila* species ovipositing on cherry fruits of different stages. *Population Ecology*, 48: 233-237.
- Pajač Živković, I., Baric, B., Lemic, D., Blazevic, I., Subic, M., Seljak, G., & Mesic, A. (2016). The Drosophilid Fauna (Diptera, Drosophilidae) of IPM Vineyards in Croatia. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 81(4), 231-234.
- Rombaut, A., Guilhot, R., Xuèreb, A., Benoit, L., Chapuis, M., Gilbert, P., Fellous, S. (2017). Invasive *Drosophila suzukii* facilitates *Drosophila melanogaster* infestation and sour rot outbreaks in the vineyards. *R. Soc. Open Sci.*, 4(3): 170117.