



**Università
degli Studi
di Ferrara**

**DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOLOGIA EVOLUZIONISTICA ED ECOLOGIA**

In convenzione con
Università degli studi di Parma
Università degli studi di Firenze

CICLOXXXI

COORDINATORE Prof. Guido Barbujani

*Mutualismo e manipolazione
nelle relazioni tra formiche e piante:
aspetti ecoetologici e applicativi*

Settore Scientifico Disciplinare BIO/05

Dottorando
Dott. Daniele Giannetti

Tutor
Prof. Donato A. Grasso

CoTutor
Prof.ssa Alessandra Mori

Anni 2015/2018

Ringraziamenti:

Un grande ringraziamento al Prof. Donato A. Grasso per la grande opportunità e fiducia concessami e per aver reso possibile un sogno, che ruba la mia immaginazione fin da piccolo, quello di conoscere, studiare e capire gli incredibili meccanismi che regolano il mondo delle formiche. Grazie a tutto il laboratorio di Mirmecologia dell'Università di Parma, alla Dott.ssa Cristina Castracani, alla Dott.ssa Fiorenza Spotti e alla Prof.ssa Alessandra Mori per aver partecipato a questo viaggio. Un viaggio con eccezionali maestri. Grazie!

Indice

CAPITOLO 1 Introduzione e scopo

1.1 Interazione Formiche-Piante-----	1
2.1 Mirmecofite vs Mirmecofile-----	2
2.1.1 Domazie e corpi fruttiferi-----	2
2.1.2 Nettari extraflorali (EFNs)-----	3
3.1 Ipotesi sul ruolo dei nettari extraflorali-----	4
3.1.1 Distraction hypothesis-----	4
3.1.2 Protective hypothesis-----	5
4.1 Nettare e Manipolazione-----	5
4.1.1 Nettare florale-----	6
4.1.2 Nettare extraflorale-----	6
5.1 Formiche e lotta biologica-----	10
6.1 Scopo-----	12

CAPITOLO 2

Studio preliminare sulla interazione tra formiche e piante Mirmecofile in ambiente naturale

2.1 Scopo-----	14
2.2 Materiali e metodi-----	14
2.2.1 Area di studio e modelli sperimentali-----	14
2.2.2 Raccolta dati-----	16
2.2.3 Analisi statistica-----	19
2.3 Risultati -----	20
2.3.1 Analisi sulla presenza e andamento delle formiche in relazione a <i>Prunus avium</i> -----	21
2.3.2 Analisi sulla presenza e andamento delle formiche in relazione a <i>Pteridium aquilinum</i> -----	23
2.3.3 Analisi sulla presenza e andamento delle formiche in relazione a <i>Vicia sativa</i> -----	25
2.4 Discussione e conclusioni-----	28

CAPITOLO 3

Studio sugli effetti diretti della presenza delle formiche su Fabaceae presenti in natura e coltivate

3.1 Scopo-----	30
3.2 Materiali e metodi (I)-----	30
3.2.1 Area di studio-----	30
3.2.2 Esperimenti su <i>Vicia sativa</i> -----	31
3.2.3 Definizione delle categorie-----	32
3.2.4 Analisi statistica sugli esperimenti di <i>V. sativa</i> -----	34
3.3 Risultati degli esperimenti su <i>V. sativa</i> -----	34
3.4 Materiali e metodi (II)-----	37
3.4.1 Esperimenti su <i>Vicia faba</i> -----	37
3.4.2 Definizione delle categorie-----	38
3.4.3 Analisi statistica sugli esperimenti di <i>V. faba</i> -----	40
3.5 Risultati degli esperimenti su <i>V. faba</i> -----	40
3.6 Discussione e conclusioni-----	45

CAPITOLO 4

Studio sulle interazioni tra formiche e piante mirmecofile: il caso di *Crematogaster scutellaris* (Hymenoptera; Formicidae) e *Vicia faba* (Fabales; Fabaceae)

4.1 Introduzione e scopo-----	48
4.2 Materiali e metodi (I)-----	49
4.2.1 Allevamenti e coltivazione delle piante in laboratorio-----	49
4.2.2 Effetti a seguito dell'assunzione di nettare extrafiorele di <i>V. faba</i> da parte di <i>C. scutellaris</i> -----	50
4.2.3 Esperimenti di aggressività -----	51
4.2.4 Analisi statistiche-----	53
4.3 Risultati-----	54

4.3.1 Test di aggressività: <i>Crematogaster scutellaris</i> vs <i>Halyomorpha halys</i> -----	54
4.3.2 Test di aggressività: <i>Crematogaster scutellaris</i> vs <i>Lasius niger</i> -----	57
4.4 Materiali e metodi (II)-----	59
4.4.1 Effetti dell'assunzione del nettare extraflorale su parametri locomotori espressi da <i>C. scutellaris</i> -----	59
4.4.2 Analisi statistiche -----	60
4.5 Risultati: analisi dei parametri locomotori-----	60
4.6 Materiali e metodi (III)-----	62
4.6.1 Esperimenti per valutare la risposta a stimoli sociali-----	62
4.6.2 Analisi statistiche-----	63
4.7 Risultati inerenti la risposta a stimoli sociali-----	63
4.8 Materiali e metodi (IV)-----	63
4.8.1 Stima degli effetti delle interazioni tra formiche e piante su alcuni aspetti della biologia di <i>Vicia faba</i> registrati in laboratorio e sul campo-----	63
4.8.1.1 Esperimenti in laboratorio-----	63
4.8.1.2 Esperimenti in campo-----	65
4.8.2 Analisi statistiche-----	66
4.9 Risultati sugli effetti della presenza delle formiche sulle piante-----	67
4.9.1 Risultati degli esperimenti in laboratorio-----	67
4.9.2 Risultati degli esperimenti in campo-----	67
4.10 Discussione e conclusioni-----	68

CAPITOLO 5 Mutualismo con *Prunus avium* mediato da nettari extraflorali

5.1 Introduzione e scopo-----	71
5.1.1 Ricerca sul campo-----	71
5.1.2 Ricerca in laboratorio: effetti dell'assunzione del nettare extraflorale-----	71
5.2 Materiali e metodi (I)-----	72
5.2.1 Esperimenti in campo-----	72
5.2.2 Analisi statistica-----	76
5.3 Risultati degli esperimenti in campo-----	77
5.4 Materiali e metodi (II)-----	82
5.4.1 Esperimenti in laboratorio per valutare gli effetti dell'assunzione del nettare extraflorale----	82
5.4.1.1 Condizioni di stabulazione delle formiche e coltivazione piante-----	82
5.4.1.2 Effetti a seguito della assunzione di nettare extraflorale	

sul comportamento delle formiche-----	82
5.4.2 Analisi statistiche-----	86
5.5 Risultati degli esperimenti in laboratorio-----	86
5.6 Discussione e conclusioni-----	92

CAPITOLO 6

Interazione tra formiche e piante del genere *Quercus spp* mediate da galle di *Andricus quercustozae*

6.1 Introduzione e scopo-----	95
6.2 Field survey-----	96
6.2.1 Materiali e metodi-----	96
6.2.1.1 Area di studio e selezione delle galle-----	96
6.2.1.2 Raccolta dati-----	97
6.2.1.3 Analisi statistiche-----	98
6.2.2 Risultati-----	98
6.3 Tasso di colonizzazione delle galle e analisi dell'architettura interna-----	102
6.3.1 Materiali e metodi-----	102
6.3.2 Risultati-----	103
6.4 Analisi dei possibili effetti sulla presenza delle formiche-----	113
6.4.1 Materiali e metodi-----	113
6.4.2 Risultati-----	114
6.5 Discussione e conclusioni-----	116

CAPITOLO 7 Conclusioni generali-----120

CAPITOLO 8 Bibliografia-----123

CAPITOLO 1

1.1 Interazione Formiche-Piante

Il lungo cammino evolutivo tra formiche e piante ha avuto inizio circa 100 milioni di anni fa in concomitanza con l'iniziale espansione delle Angiosperme. Tale espansione sarebbe stata influenzata dalla variazione delle condizioni fisico-chimiche, atmosferiche (Axelrod, 1970), dalla espansione di vari gruppi di insetti coinvolti nell'impollinazione (Takhtajan, 1969; Crepet, 1979) e, dall'incremento di numerose specie erbivore (uccelli, rettili, mammiferi), a loro volta coinvolte nella dispersione dei semi (Regal, 1977; Ehrlich & Raven, 1965). Evidenze fossili, supportate da analisi filogenetiche, individuano in questo periodo una grande espansione di numerose famiglie di formicidi. A tutt'ora le formiche rappresentano gli organismi dominanti in molti ecosistemi terrestri. Allo stato attuale il numero stimato di specie di formiche è circa 13200 in tutto il mondo con differenti adattamenti e diversificazioni morfologiche e eto-ecologiche, che rendono tali organismi un eccellente modello di studio per numerosi aspetti legati alla biologia evolutiva (Grasso et al, 2015). La chiave di tale successo ecologico-adattativo è legata alla loro vita coloniale (Hölldobler & Wilson 2009). La complessità raggiunta nella vita sociale consente loro di controllare al meglio l'ambiente circostante, competere per le risorse e sfruttarle (Hölldobler & Wilson 1990). La loro azione e interazione in numerose reti trofiche con numerosi componenti dell'ecosistema come microrganismi, funghi, vertebrati e piante (Ness et al, 2010; Grasso et al, 2015) può influire in modo decisivo sui cicli della vegetazione e del suolo, che risulterebbero profondamente alterati da una loro improvvisa scomparsa (Bernard et al, 1968). La crescente espansione da parte delle Angiosperme avrebbe contribuito alla creazione di nuove e importanti nicchie ecologiche per questi insetti, mediante un aumento di disponibilità di prede o di fonti di secrezioni zuccherine. grazie alla crescente biodiversità degli insetti erbivori, ed una variazione nella dieta prettamente carnivora da parte di molte specie a una dieta basata sulle risorse offerte direttamente dalle piante (Mayer et al, 2014). Tali fonti alimentari sono riconducibili in modo particolare a corpi fruttiferi ricchi di componenti proteiche/lipidiche e, nettari extraflorali (EFN); strutture nettarifere presenti in differenti porzioni della pianta secernenti una soluzione zuccherina differente da quella florale molto attrattiva per le formiche. Sebbene pochi studi abbiano indagato gli effetti del nettare extraflorale sulle comunità presenti in un determinato ambiente, studi recenti suggeriscono che la presenza di piante con nettari extraflorali (EFN) sia in grado di determinare e influenzare la biodiversità animale di un ecosistema, influenzando l'abbondanza delle specie e, le relazioni tra le comunità presenti (Rudgers et al, 2003).

2.1 Mirmecofite vs Mirmecofile

2.1.1 Domazie e corpi fruttiferi

Per ottimizzare e massimizzare l'azione difensiva delle formiche, alcune piante hanno evoluto sistemi utili a favorirne e concentrarne la presenza, offrendo strutture ricettive utili alla fondazione della colonia e fonti di cibo. Basandoci sulle caratteristiche morfologiche che mediano questa interazione mutualistica con le formiche possiamo categorizzare gli organismi vegetali coinvolti, in piante mirmecofile e piante mirmecofite. Oltre 100 generi di Angiosperme localizzate nelle regioni tropicali presentano strutture specializzate utili a ospitare le formiche, favorendo una interazione stabile. Le mirmecofite infatti offrono luoghi di nidificazione pre-formati (domazie) con strutture cave e corridoi utili alla fondazione e riparo per la colonia. Questa costante e stabile joint-venture è garantita da differenti strutture per offrire un sostegno alimentare, utili ad aumentarne il tasso di sopravvivenza delle colonie (Davidson & McKey, 1993; Heil & McKey, 2003). Infatti sulle piante mirmecofite oltre alle domazie, sono disponibili varie sostanze alimentari sotto forma di corpi fruttiferi (distinti in alcuni casi in relazione alla specie vegetale) e nettari extraflorali (EFN) (Jolivet, 1986; Grasso et al, 2015). Vengono definiti corpi Mülleriani strutture lipidiche con presenza di glicogeno, localizzate alla base del picciolo delle foglie di *Cercopia peltata* (Urticaceae); queste strutture sono state identificate in altre piante come *Cercopia adenopus* e *Cercopia obtusifolia*. I corpi Beltiani sono cellule parenchimatiche ricche di composti proteici e localizzate alle estremità delle foglie basali su piante di *Acacia sphaerocephala*. Tali strutture sono prodotte anche da *Acacia cornigera* all'apice dei rachidi e delle pinnule. In piante della famiglia delle Euphorbiaceae come *Macaranga caladiifolia* e *Macaranga hypoleuca* sono state identificate strutture lipidiche ricche di amido, prodotte nella faccia inferiore delle stipole e definiti corpi Beccariani. Oltre alle strutture sopraindicate all'interno di diciannove generi di piante sono state descritte strutture a base lipidica definite "pearl bodies". Queste strutture furono definite da Federico Delpino come risorse di cibo per le formiche, parallele e complementari ai nettari extraflorali (Delpino, 1886; O'Dowd et al, 1982; Putz & Holbrook, 1988; Penzing, 1892; Janzen, 1966; Jolivet, 1986; Rickson, 1971; Rickson, 1980; Rico-Grey & Oliveira, 2007; Ness et al, 2010). Le piante mirmecofile differiscono dalle mirmecofite per la assenza delle domazie o strutture analoghe e preformate utili ad alloggiare la colonia. Similmente alle mirmecofite precedente descritte, le piante mirmecofile possono presentare nettari extraflorali e/o corpi fruttiferi. Nelle regioni mediterranee sono state descritte 66 famiglie vegetali con presenza di nettari extraflorali e 20 famiglie con presenza di corpi fruttiferi. In questo caso le interazioni tra formiche e piante vengono definite facoltative o opportunistiche, legate

all'attrazione delle formiche per le ricompense alimentari offerte dalla pianta (O'Dowd, 1982; Elias et al, 1983; Heil & Mckey, 2003).

2.1.2 Nettàri extrafiorali (EFNs)

“Certain plants excrete sweet juice, apparently for the sake of eliminating something injurious from the sap: this is effected, for instance, by glands at the base of the stipules in some Leguminosae, and at the backs of the leaves of the common laurel. This juice, though small in quantity, is greedily sought by insects; but their visits do not in any way benefit the plant. Now, let us suppose that the juice or nectar was excreted from the inside of the flowers of a certain number of plants of any species. Insects in seeking the nectar would get dusted with pollen, and would often transport it from one flower to another. The flowers of two distinct individuals of the same species would thus get crossed; and the act of crossing, as can be fully proved, gives rise to vigorous seedlings, which consequently would have the best chance of flourishing and surviving. The plants which produced flowers with the largest glands or nectaries, excreting most nectar, would oftenest be visited by insects, and would oftenest be crossed; and so in the long-run would gain the upper hand and form a local variety. “

Charles Darwin (On the Origin of the species 1856) chapter IV. Natural selection; or the survival of the fittest.

La morfologia e funzione dei nettàri extrafiorali di molte specie vegetali sono stati motivo di grande dibattito scientifico. Darwin ne' “L'Origine delle Specie” definisce i nettàri extrafiorali come strutture secernenti una sostanza zuccherina utile a eliminare sostanze superflue dalla pianta. Tali strutture secondo Darwin risulterebbero del tutto inutili per la pianta, invece, lo sviluppo di strutture analoghe nel fiore avrebbe consentito un incremento delle visite degli insetti impollinatori. Di conseguenza piante con nettàri più grandi e produzione maggiore di nettare saranno visitate di più dagli insetti e avranno possibilità di “incrociarsi più spesso”. Tuttavia tale ipotesi sulla funzione dei nettàri extrafiorali non venne accolta in modo favorevole dal botanico e Presidente della società Botanica Italiana Federico Delpino. Da lui definiti come “*extranuptial nectaries*”: (Delpino, 1874). Delpino non concordava con l'ipotesi darwiniana adducendo che, una sostanza ricca di zuccheri, frutto di un grande dispendio energetico non poteva essere solo un rifiuto. La produzione di tali sostanze doveva infatti avere una funzione quanto meno analoga a quella nei nettàri fiorali ossia di attirare insetti (Bentley, 1977; Mancuso, 2010). Nell'evoluzione degli organismi vegetali il nettare venne prodotto per la prima volta dalle prime Pteridofite. In queste piante i nettàri sono localizzati sulle fronde e definiti nettàri fogliari (Koptur et al, 2013; Nepi et al, 2018). Le Angiosperme differenziatesi nel medio-Cretaceo adattarono la produzione di nettare dal punto di vista chimico e fisiologico in relazione a nuovi gruppi di insetti, per rinforzare e consolidare le interazioni mediate da nettàri extrafiorali. Attualmente sono 4017 le specie di Angiosperme (849 generi, 110 famiglie) con presenza di nettàri extrafiorali (EFN) (Weber et al, 2015). La grande diversità di strutture vegetali classificate come nettàri extrafiorali è dovuta alla loro definizione in relazione alla funzione

ecologica (non coinvolti nell'impollinazione) piuttosto che, rispetto alla loro posizione, struttura e origine evolutiva (Delpino, 1886; Weber & Agrawal, 2014). La loro estrema diversità varia in funzione della posizione sulla pianta e, dalla loro struttura in funzione dei meccanismi di secrezione (Heil, 2011; Marazzi et al, 2013). In relazione alla struttura vengono suddivisi principalmente in alcune categorie: “formless nectaries, flat nectaries, elevated nectaries, scale-like nectaries, hollow nectaries, pit nectaries, and embedded nectaries”. In alcuni casi possono essere attivi durante lo sviluppo florale o durante la fase di maturazione dei frutti (Zimmermann et al, 1932; Elias et al, 1983). Alcuni studi hanno evidenziato una variazione del numero di nettari extrafloriali sulle piante in funzione del grado di erbivoria (Mondor, 2003; Pacini & Nepi, 2007). Il significato adattativo dei nettari extrafloriali è stato discusso per oltre 100 anni (Bentley, 1977) portando alla formulazione di differenti ipotesi.

3.1 Ipotesi sul ruolo dei nettari extrafloriali

3.1.1 distraction hypothesis

Le formiche potrebbero interferire sull'impollinazione influenzando sull'azione da parte di differenti insetti pronubi (Gaume et al, 2005; Trager et al, 2010). La presenza delle formiche sul fiore infatti può avere un effetto deterrente sugli insetti impollinatori riducendo il loro numero di visite. Tale effetto ha portato a considerare i nettari extrafloriali come strutture di distrazione per le formiche, utili a evitare il pattugliamento sul fiore (*distraction hypothesis*) (Kerner et al, 1878). Nonostante siano presenti casi documentati di impollinazione da parte delle formiche su specie europee-mediterranee e montane, come *Lobularia maritima* (Brassicaceae) e *Borderea pyrenaica* (Discoraceae) (Peakall et al, 1991; Garcia et al, 1995; Gómez, 1999), le formiche non sono considerate impollinatori comuni. Infatti, possono interferire con altri impollinatori o causare danneggiamenti alle strutture riproduttive stesse ed in particolare al polline. Questo in funzione delle possibili azioni di disturbo e predazione di differenti insetti pronubi e, della presenza di sostanze antifungine e antibatteriche prodotte da differenti ghiandole presenti sul corpo. Un esempio è l'acido 1-Bidrossidecanoico prodotto dalla ghiandola meta-toracica e riscontrato in differenti specie di formiche (*Atta sexdens*, *Acromyrmex subterraneus*, *Messor barbarus* e *Myrmica laevinodis*) (Beattie et al, 1986). In esperimenti di laboratorio differenti sostanze prodotte dalle formiche hanno evidenziato un effetto inattivo e in alcuni casi totalmente distruttivo sui granuli pollinici. Per evitare tale conflitto sul fiore, su alcune piante come *Acacia collinsii*, sono stati rilevati composti volatili con funzione repellente verso le formiche (Ghazoul, 2001; Junker et al, 2008). Ulteriore ipotesi vede i nettari extrafloriali come fonte di distrazione per le formiche per evitarne il contatto con insetti emittenti produttori di melata. In tal modo si ridurrebbe la presenza di questi insetti sulla pianta riducendo il potenziale danno da virus e indebolimento da essi causati. Studi successivi tuttavia hanno portato alla luce risultati che mettono in discussione tale ipotesi.

Infatti in Messico è stato osservato che le formiche possono alternare il consumo di nettare extrafioreale e melata, preferendo i nettari extrafioreali in condizioni di aridità (Engel et al, 2001; Koptur, 2005). In alcuni casi pur interagendo e favorendo insetti fitomizi le formiche difenderebbero la pianta da insetti e patogeni ancora più distruttivi e nocivi per la sopravvivenza della pianta.

3.1.2 *protective hypothesis*

Il crescente interesse verso lo studio di queste interazioni mutualistiche come modello per approfondire differenti aspetti (teorici e applicativi) dalla biologia evolutiva alla lotta biologica, ha stimolato indagini di metanalisi allo scopo di valutare in modo globale gli effetti sulle piante da parte delle formiche (Trager et al, 2010). Il ruolo protettivo (*protective hypothesis*) da parte delle formiche sulle piante, trova numerosi riferimenti in letteratura su differenti specie vegetali. I risultati evidenziano un effetto positivo delle formiche dovuta ad una azione diretta caratterizzata da una diminuzione degli insetti predatori e una riduzione del danno fogliare (Janzen, 1966; Heil & McKey, 2003; Heil, 2000; Heil, 2001). In piante di *Thunbergia grandiflora* è stata osservata una consistente riduzione del danno floreale causato da bruchi di lepidotteri in presenza di formiche (Koptur, 2005). Tali azioni difensive da parte delle formiche porterebbero a un miglioramento della fitness della pianta dal punto di vista fisiologico e riproduttivo (Fiala et al, 1989; Schmitz et al, 2000). Tuttavia tale interazione sarebbe vantaggiosa anche per le formiche, migliorando il tasso di sopravvivenza delle colonie che interagiscono con le piante (Heil, 2011). Anche se estremamente indicativi, il numero di lavori che descrivono una correlazione tra la presenza e interazione delle formiche con piante provviste di nettari extrafioreali e, gli effetti sulla fisiologia della piante è ancora poco consistente non consentendo di trarre considerazioni generali accurate.

4. 1 Nettare e Manipolazione

Il nettare è definito come una secrezione della pianta in grado di mediare differenti interazioni mutualistiche con molte specie di animali. Possiamo distinguere in nettare floreale (FN) e nettare extrafioreale (EFN). Le due tipologie di nettare presentano una composizione chimica di base, caratterizzata da carboidrati e da tre zuccheri semplici: il disaccaride saccarosio e le sue componenti monosaccaridiche, fruttosio e glucosio. La loro concentrazione dipende dall'attività dell'enzima invertasi che idrolizza il saccarosio in fruttosio e glucosio, prima o durante la secrezione (Nicolson & Thornburg, 2007). In aggiunta sono presenti differenti proteine definite nettarine (proteine ad azione antibiotica), che svolgono un ruolo protettivo riducendo la proliferazione di microrganismi come funghi e batteri, la cui attività metabolica modifica la composizione chimica del nettare e conseguentemente l'interazione con gli insetti pronubi (Herrera et al, 2009; Perez & Heil, 2012). Dopo gli zuccheri i soluti più abbondanti del nettare sono gli amminoacidi. Questi sono meno

concentrati rispetto agli zuccheri (da 100 a 1000 volte meno) (Nepi & Stpiczyńska, 2008; Nepi, 2014a; Grasso et al, 2015, Nepi et al, 2018).

4.1.1 Nettare florale

Carboidrati e aminoacidi nel nettare presentano un ruolo importante nell'attrattività. Gli animali differiscono nelle preferenze alimentari, di conseguenza la variazioni in proporzione di zuccheri e aminoacidi presenti nel nettare sono in grado di determinare e influenzare l'attività di foraggiamento rispondendo a specifici requisiti alimentari. Inoltre la variazione del profilo chimico del nettare in funzione di queste componenti da parte delle piante, gli consente di adattarsi a specifici partner particolarmente adatti per la specie vegetale. Molte piante impollinate dagli insetti presentano una composizione del nettare florale ricca in aminoacidi, che risultano attrattivi per farfalle, mosche e api (Heil, 2011; Escalante-Pérez, 2012). Alcuni studi hanno dimostrato la presenza negli insetti di diversi chemocettori che rispondono ai composti a base di acqua, zuccheri e sostanze saline. Lo studio degli effetti degli aminoacidi su questi chemocettori ha permesso la descrizione di quattro classi basate sul gusto dato dagli aminoacidi. In particolare è stato dimostrato che due aminoacidi di classe III, prolina e idrossiprolina, hanno la capacità di stimolare i recettori legati ai composti salini. Altri aminoacidi di classe IV come leucina, fenilalanina, triptofano, valina, metionina e isoleucina sono in grado di stimolare i recettori sensibili ai composti zuccherini (Nicholson & Thornburg, 2007).

L'attrattività del nettare è inoltre influenzata dalla presenza di composti volatili (VOCs). Tali composti risultano di grande importanza nell'attrarre gli impollinatori e nel proteggere la pianta da altri insetti che ne potrebbero sfruttare le risorse. Studi presenti in letteratura sul tabacco selvatico evidenziano la presenza di specifici composti volatili presenti solo nel nettare florale e non riscontrabili neanche in tracce in altre parti della pianta. Tra le classi di composti che risultano importanti per l'attrattività ci sono differenti amminoacidi e composti volatili come il Benzil-acetone. All'opposto differenti composti come il Catalpol e le Gelsemine risultano invece repellenti per differenti specie di insetti (Herrera et al, 2009; Nepi et al, 2009; Perez & Heil, 2012; Nepi et al, 2012).

4.1.2 Nettare extrafiore

La attività dei nettari extrafioreali può essere caratterizzata da una secrezione permanente o indotta. La secrezione indotta a seguito dell'attacco ad opera di insetti è stata ben documentata in piante presenti nelle regioni temperate (Bixenmann et al, 2011; Nepi et al, 2018). Variazioni della produzione del nettare extrafioreale tra specie vegetali differenti, in differenti momenti del giorno, possono influenzare il pattern di attività e il numero di formiche sulle piante (Blüthgen et al, 2003;

Lange et al, 2013, 2017). Esistono diversi studi che descrivono la presenza di composti neuroattivi nel nettare fiorale (Kessler et al, 2012; Baracchi et al, 2017), tuttavia gli effetti chimici del nettare extrafioreale sulle formiche risultano ancora poco conosciuti. Il nettare rappresenta una fonte di primaria importanza per la assimilazione di azoto e proteine. E' stato evidenziato che uno sbilanciamento nelle proporzioni di carbonio e azoto nel nettare può influenzare e incrementare l'interesse delle formiche per composti ricchi di N, aumentando la probabilità che possano attaccare insetti erbivori presenti sulla pianta. Alterazioni del rapporto C/N sono state registrate in risposta all'attacco di insetti masticatori, con una variazione in percentuale di saccarosio e aminoacidi. Questo suggerisce che il cambiamento nel rapporto C/N possa manipolare le preferenze alimentari delle formiche influenzandone l'attività di foraggiamento (Smith et al, 1990; Ness, 2003; Ness et al 2009; Wilder, 2010; Grover et al, 2007; González & Teuber, 2012; Grasso et al, 2015). Oltre ai composti indicati sono presenti metaboliti secondari (es: alcaloidi, ammine biogene) che svolgono un ruolo cruciale nel mediare l'interazione tra piante e insetti. Ciò suggerisce che tali molecole giochino un ruolo essenziale nell' influenzare il comportamento delle formiche nelle loro interazioni con le piante (Adler & Irwin, 2012; Manson et al, 2013; Detrain & Prieur, 2014; Nepi, 2014b, 2018). Tuttavia i dati in letteratura relativi a tali composti sono ancora pochi. Sono state riscontrate tracce di alcaloidi in alte concentrazioni nel tessuto di nettari extrafioreali di *Passiflora edulis* (Passifloraceae) e, in basse concentrazioni nel nettare secreto. Queste piante sono in grado di modulare la concentrazione dei metaboliti secondari nel nettare extrafioreale in relazione alla presenza di insetti dannosi sulla pianta e, in relazione ai propri partner che interagiscono con i nettari. La presenza di alte concentrazioni nel tessuto avrebbe funzione di protezione verso gli erbivori non provocando secondo i dati a disposizione effetti sulle formiche (Cardoso-Gustavson et al, 2013; Cook et al, 2013). Attualmente non sono state individuate tracce di altri alcaloidi nel nettare extrafioreale. Tuttavia l'effetto degli alcaloidi sul comportamento delle formiche è stato studiato su *Myrmica sabuleti* in esperimenti di laboratorio. Test su differenti sostanze come cocaina, teofillina, caffeina ed atropina, hanno evidenziato effetti significativi sulla fisiologia e il comportamento di *M. sabuleti* alterandone la locomozione, percezione chimica, memoria olfattiva e reazione agli stimoli (Cardoso-Gustavson et al, 2013; Cammaerts et al, 2014, Nepi et al, 2018). Un esempio ben documentato di manipolazione fisiologica in letteratura è rappresentato dall'interazione tra *Acacia cornigera* e la formica *Pseudomyrmex ferrugineus* (Hymenoptera; Pseudomyrmecinae). Le colonie presenti sulle piante si nutrono del nettare extrafioreale privo di saccarosio che non risulta attrattivo per altre formiche (Heil et al, 2014, 2015). Le operaie adulte di questa specie presenti sulle piante risultano prive della funzione svolta dall'enzima invertasi (ovvero idrolisi del saccarosio in glucosio e fruttosio). L'enzima tuttavia risulta normalmente presente nelle larve. E' stato evidenziato che una specifica chitinasi (proteina ad azione antifungina)

presente nel nettare extrafioreale di questa specie svolge anche una attività inibitoria dell'enzima invertasi normalmente presente nelle larve (Heil, 2011; Heil et al, 2014; Grasso et al, 2015; Nepi et al, 2018). In questa interazione mutualistica tra formica e pianta, l'acacia manipola la attività digestiva della formica costringendola ad alimentarsi del nettare prodotto dalla pianta; questo stabilizza l'interazione e impedisce interferenze da parte di possibili sfruttatori nel sistema.

La figura 1 (Nepi et al, 2018) illustra il complesso network multitrofico che coinvolge le piante, gli insetti impollinatori e le formiche. Sebbene alcuni di questi meccanismi siano già stati oggetto di studio, molti altri non sono ancora stati chiariti. Come già anticipato grazie ad alcune sostanze neuroattive presenti nel nettare floreale, le piante potrebbero garantirsi una fidelizzazione degli insetti impollinatori e, di conseguenza un aumento del loro successo riproduttivo. Tuttavia dal punto di vista dell'insetto ciò comporterebbe una riduzione dell'efficienza di foraggiamento (poiché la quantità di nettare a disposizione sulla stessa pianta diminuisce) e quindi uno svantaggio. Questa manipolazione potrebbe cambiare la tipologia di relazioni che intercorrono tra la pianta e gli insetti, ovvero da una interazione mutualistica a una relazione di parassitismo. Come evidenzia la Fig 1, molti passaggi di questa complessa relazione devono ancora essere indagati. In particolare la mancanza di evidenze scientifiche sull'effetto dei metaboliti secondari presenti nel nettare extrafioreale sul comportamento delle formiche.

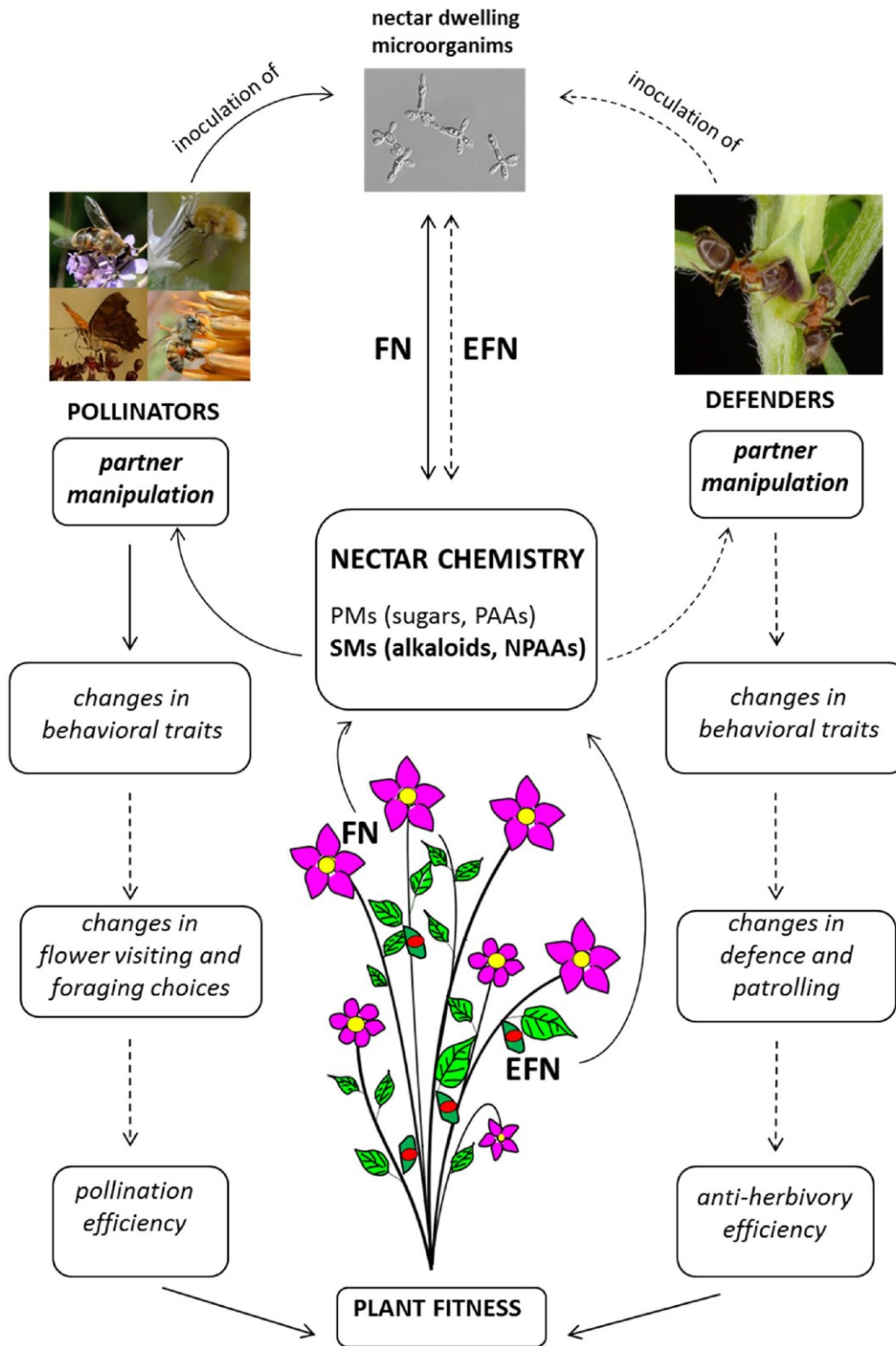


Fig 1 Diagramma che illustra il complesso network multitrofico che coinvolge le piante, gli insetti impollinatori e le formiche. (Immagine tratta da Nepi et al, 2018)

5.1 Formiche e lotta biologica

Le formiche rappresentano degli ottimi candidati nella difesa delle piante per differenti colture agricole. Riassumendo alcuni degli attributi (Rico-Grey & Oliveira, 2007) che le rendono ottimi candidati come agenti di controllo biologico possiamo dire che:

1. sono molto diversificate e abbondanti in numerosi ecosistemi nelle regioni tropicali e temperate e, sono considerate dei predatori generalisti;
2. rispondono alle variazioni di densità di potenziali prede;
3. rimangono abbondanti in un ecosistema anche a seguito di una riduzione delle prede disponibili, dato che sono in grado di cannibalizzare la loro prole o usare le secrezioni rilasciate da insetti emittenti e dalle piante come fonte di cibo;
4. possono stoccare le risorse alimentari, ma questo non limita comunque la normale e continua azione di predazione;
5. oltre a catturare numerosi insetti nocivi, possono scoraggiare molti altri organismi di grandi dimensioni anche se difficili da essere catturati;
6. possono essere gestite (trasporto e allevamento) per aumentarne l'abbondanza e la distribuzione per favorirne il contatto con le potenziali prede;

In alcuni casi, tale difesa può estendersi contro patogeni (batterici e fungini) o, contro la vegetazione circostante (Janzen, 1966; Hölldobler & Wilson 1990, Novotny et al, 1999; Floren et al, 2002; Heil & McKey, 2003).

Pionieristiche applicazioni delle formiche in pratiche di lotta biologica vedono l'utilizzo della specie *Oecophylla smaragdina*. Il loro utilizzo era già noto in Cina su piante del genere *Citrus spp*, (Phillipot et al, 2005; Heil, 2008). L'utilizzo di differenti specie di *Oecophylla spp* in Africa e sulle isole Salomone ha evidenziato una diminuzione di numerose specie invasive come *Amblyopelta cocophaga* (Hemiptera; Coreidae), *Pseudotheraptus wayi* e *Pseudotheraptus devastans* (Hemiptera; Coreidae) su piante di cocco (Way & Khoo, 1992; Rico-Grey & Oliveira, 2007). Differenti studi in Tanzania hanno evidenziato in presenza di *Oecophylla longinoda* un consistente effetto di riduzione di differenti insetti che attaccano le colture. Studi successivi sull'applicazione di queste formiche in differenti colture come palme da olio, cacao, caffè, mango e agrumi, hanno confermato la estrema efficacia di questa specie nel limitare e, in molti casi eliminare completamente la presenza di insetti invasivi sulle piante (Van Mele, 2008). Gli studi in campo fino ad ora condotti su altre specie per valutarne l'efficienza come agenti di controllo biologico in agricoltura, sono concentrati particolarmente in zone e colture tropicali. Esperimenti di manipolazione su piante di caffè con il posizionamento controllato di predatori masticatori hanno evidenziato un significativo decremento di questi insetti dannosi in presenza della formica Azteca (Vandermeer et al, 2002). In modo

analogo su varie colture come caffè, cacao e thè in Camerun sono stati evidenziati analoghi risultati con un decremento di differenti specie di Miridi in presenza della formica *Wasmannia auropunctata* (Bruneau, 1969). Ulteriore effetto di controllo biologico in colture commerciali è stato evidenziato in molte “sapodilla farmer” coltivazioni di *Manikara zapota* in Laos e Vietnam da parte delle formiche *Dolichoderus thoracicus*. Gli studi hanno evidenziato in presenza delle formiche una riduzione delle piante infestate da *Alophia sp* (Lepidoptera ; Pyralidae). Tuttavia questo effetto è reso inefficiente dall’utilizzo di pesticidi utilizzati per i trattamenti sulle piante (Van Mele & Cuc, 2001). Esperimenti in campo su colture intensive di *Zea mays* (Poaceae) in Nicaragua hanno monitorato l’attività di due specie di formiche *Pheidole radowszkoskii*, *Ectatomma ruidum* e, il livello di due importanti insetti dannosi per le piante come *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae) e *Dalbulus maidis* (Hemiptera ; Cicadellidae). I risultati nelle parcelle sottoposte a trattamenti chimici hanno evidenziato una diminuzione dell’attività delle formiche a seguito dell’utilizzo di (clorpirifos e carbofurani). Tali applicazioni ripetute negli anni in queste parcelle hanno evidenziato un effetto negativo sulle popolazioni di formiche, causandone la scomparsa. All’opposto nelle parcelle mantenute prive di trattamenti chimici, i risultati hanno evidenziato una azione positiva da parte delle formiche con una riduzione delle larve di *S. frugiperda* e *D. maidis*. Studi pluriennali condotti nell’area hanno descritto una significativa perdita di efficacia da parte dei trattamenti chimici a causa di resistenze sviluppate dai fitofagi. Tali sostanze tuttavia hanno mantenuto un effetto negativo sulle formiche presenti nelle aree agricole, limitandone l’azione di protezione e, portando alla progressiva scomparsa delle colonie. Successivi interventi sperimentali in assenza di trattamenti chimici hanno evidenziato una ricolonizzazione da parte delle formiche delle aree trattate e, un significativo decremento delle specie invasive sulle piante operato dalle formiche (Perfecto et al, 1994). Studi pionieristici condotti a partire dagli anni cinquanta da Mario Pavan dell’Università di Pavia avevano evidenziato l’importanza delle formiche del gruppo *Formica rufa* per la lotta a differenti insetti fitofagi delle conifere; in particolare differenti trapianti di *Formica lugubris* appartenente al gruppo *F.rufa* furono effettuati in differenti aree in Italia. E’ stato stimato che un nido di *Formica polyctena* appartenente al gruppo *Formica rufa*, consumi circa otto milioni di artropodi in un anno e, circa 14000 tonnellate di insetti siano uccisi ogni anno dalle formiche del gruppo *F. rufa* su tutto l’arco alpino italiano (Pavan, 1959; Way & Khoo, 1992). Recenti esperimenti condotti nel laboratorio di Mirmecologia dell’Università di Parma hanno evidenziato un’efficace azione predatoria da parte della formica *Crematogaster scutellaris* verso la specie alloctona *Halyomorpha halys* (Hemiptera ; Pentatomidae) negli stadi di sviluppo 1-2-3-4-5 (Castracani et al, 2017; Maistrello et al, 2014). Questi esperimenti pur necessitando di ulteriori conferme sul campo, suggeriscono un eccellente modello animale (*C. scutellaris*); specie arborea e ubiquitaria sul territorio nazionale utile in eventuali applicazioni di lotta biologica. Gli esempi

precedenti, suggeriscono un potenziale ruolo significativo da parte delle formiche in un programma di lotta biologica integrata tuttavia, in molti casi, vengono considerate come agente infestante a causa della possibile interazione con insetti fitomizi. Spesso sono infatti soggette a trattamenti chimici mirati o subiscono un decremento a causa della suscettibilità verso numerosi pesticidi utilizzati in agricoltura (Perfecto & Vandermeer, 1994). Vari autori hanno considerato gli effetti ecologici delle interazioni mutualistiche tra formiche e insetti fitomizi in relazione ai costi-benefici per le piante (Styrsky & Eubanks, 2007). Valutando il bilancio costi benefici tra l'effetto positivo dovuto alla difesa della pianta e gli effetti negativi causati dal mutualismo tra formiche ed insetti fitomizi. Attualmente in funzione dei casi analizzati, le interazioni formiche-insetti fitomizi e, altri insetti dannosi per le piante, hanno evidenziato un bilancio netto positivo sulla fitness delle piante (Styrsky & Eubanks, 2007; Rosumek et al, 2009). Di conseguenza, la presenza delle formiche in numerosi agroecosistemi potrebbe avere un effetto positivo agendo sul controllo di specie dannose. Inoltre, se comparato ad altri possibili sistemi di difesa (meccanici e chimici) sviluppati dalle piante, il sistema di difesa offerto dalle formiche risulta evolutivamente stabile e relativamente immune ai potenziali e rapidi adattamenti evolutivi (comportamentali e fisiologici) sviluppati da molti insetti fitofagi (Whittaker & Feeny, 1971; Rathcke & Poole, 1975; Schmitz, 2000).

Scopo del progetto

Il mio progetto di dottorato si propone di studiare le interazioni mutualistiche tra formiche e piante presenti in ambiente mediterraneo. Lo studio è stato rivolto ad analizzare due tipologie di rapporti formiche-piante che sono state classificate in due distinte categorie: relazioni **mediate** (*by-product mutualism*) e relazioni **dirette**.

Le **relazioni mediate** considerate, hanno riguardato le interazioni tra formiche e piante del genere *Quercus spp*, favorite dalle galle prodotte dal cinipide *Andricus quercustozae* (Hymenoptera; Cinipidae). Successivamente allo sfarfallamento del galligeno tali strutture rappresentano un luogo di nidificazione ideale per alcune specie di formiche. A seguito della scarsità di dati presenti in letteratura, durante i tre anni di lavoro abbiamo svolto:

- un primo survey per determinare le specie di formiche presenti nelle galle in una area naturale e la loro scelta in funzione della posizione sulla pianta e delle dimensioni delle galle;
- tasso di colonizzazione su galle vuote in un anno e, la scelta da parte delle varie specie di formiche in funzione della posizione e delle dimensioni delle galle;

- una analisi della architettura e delle proporzioni di scavo in funzione delle specie presenti nelle galle;
- gli eventuali effetti sul benessere della pianta derivanti dalla presenza stabile delle formiche.

Abbiamo definito **iterazioni dirette** quelle che si instaurano tra formiche e piante dotate di nettari extrafloriali (mirmecofile). A tale riguardo il mio lavoro ha preso in considerazione differenti piante mirmecofile presenti in ambiente naturale e di interesse agricolo.

- In campo è stato condotto uno studio preliminare sulla interazione tra formiche e piante mirmecofile utilizzando tre specie modello (*Prunus avium*, *Pteridium aquilinum* e *Vicia sativa*) presenti in natura, per definire e quantificare le specie di formiche coinvolte e descriverne l'interazione con le piante.
- Sono stati quantificati gli effetti diretti della presenza delle formiche su Fabaceae (*Vicia faba* e *Vicia sativa*) presenti in natura e coltivate, valutando gli effetti sulla potenziale riduzione del danno fogliare, la quantità e la qualità di semi prodotti.
- Utilizzando in modo particolare due modelli sperimentali vegetali quali *Prunus avium* e *Vicia faba* e, il modello animale *Crematogaster scutellaris* (Hymenoptera; Formicidae) in laboratorio, abbiamo valutato l'eventuale manipolazione comportamentale a seguito dell'assunzione di nettare extrafloriale. L'analisi ha preso in considerazione differenti parametri come:
 - a) attività locomotoria, analizzata tramite video tracking su 480 video;
 - b) aggressività, valutata in risposta ad una potenziale preda e ad una specie interspecifica;
 - c) risposta a stimoli sociali, mediante la risposta alla capacità di percezione del feromone di traccia.

In natura, e in laboratorio, mediante coltivazioni in condizioni controllate abbiamo inoltre valutato la risposta da parte delle piante alla presenza delle formiche. Abbiamo considerato lo sviluppo dei nettari extrafloriali che mediano questa interazione e la quantità di nettare secreto. Campioni di nettare extrafloriale sono stati raccolti durante le fasi sperimentali in relazione alla presenza/assenza di formiche per effettuare analisi chimiche del nettare extrafloriale.

CAPITOLO 2

Studio preliminare sulla interazione tra formiche e piante Mirmecofile in ambiente naturale

2.1 Scopo

A causa della assenza di dati inerenti le interazioni tra formiche e piante mirmecofile in ambiente mediterraneo la presente ricerca si propone di:

- a) quantificare la presenza delle formiche nelle aree dove sono presenti specie mirmecofile, in relazione allo sviluppo delle piante;
- b) quantificare la presenza delle formiche sulle piante.

2.2 Materiali e metodi

2.2.1 Area di studio e modelli sperimentali

Lo studio ha interessato una zona dell'alta Toscana in località Lunigiana localizzata in prossimità del paese di Fornoli (DD=44°15,291'N-009°58,099'E) all'interno del comune di Villafranca (MS). Una preliminare azione di indagine ha portato all'individuazione di aree naturali localizzate a 1,2 km dall'abitato, all'interno delle quali sono state individuate le nostre specie mirmecofile modello:

Prunus avium (Rosaceae). Pianta originaria delle regioni del Mar Caspio e del Mar Nero (Wusch & Hormaza, 2004), può vivere mediamente dai 100 ai 150 anni e può raggiungere altezze che possono variare dai 20 ai 30 m se cresciuta in condizioni ottimali. Il suo areale comprende le foreste temperate in Europa, nel Nord-Africa e nelle foreste dell'Asia occidentale (Ducci et al, 2013). La diffusione in Europa ha avuto origine grazie all'Impero romano, con la comparsa di coltivazioni nel sedicesimo secolo (Wusch & Hormaza, 2004). Il genere *Prunus* in relazione alla specie, presenta diverse strutture ghiandolari classificate in base alla posizione: 1) strutture presenti sulla lamina fogliare ad eccezione di quelle sui denti fogliari; 2) strutture presenti nella porzione abassiale delle foglie; 3) strutture presenti sui denti fogliari. Queste tipologie di ghiandole possono subire una ulteriore divisione in funzione del settore della foglia dove si sviluppano e possono trovarsi: A) sul margine della foglia; B) alla congiunzione della lamina fogliare e del picciolo; C) lungo la cresta marginale superiore del picciolo. Nel caso di *Prunus avium* i nettari extraflorali sono disposti lungo il picciolo e alla base della lamina fogliare (Fig 2.2 A). (Pulice & Packer, 2008 ; Chin et al, 2013).

Pteridium aquilinum (Hypolepidaceae). Detta comunemente felce aquilina, è la pianta vascolare maggiormente diffusa nel mondo. Il suo areale di presenza è esteso a tutti i continenti ad eccezioni

di alcune zone tropicali, desertiche, ad alte quote oltre i 3000 m e nelle regioni antartiche. Caratterizzato da 6 stadi di crescita (Fig 2.1) le lamine fogliari sono costituite da un gambo da cui si dirama il rachide, caratterizzato da numerose pinne, a loro volta composte da pinnule. Come altre pteridofite preseta strutture nettariifere localizzate sulle foglie e definite nettari fogliari (Fig 2.2 B). Questi vengono considerati topograficamente analoghi ai nettari extraflorali delle Angiosperme. I nettari extraflorali risultano ben evidenti allo stadio 1 (Fig 2.1) (Temple, 1983).

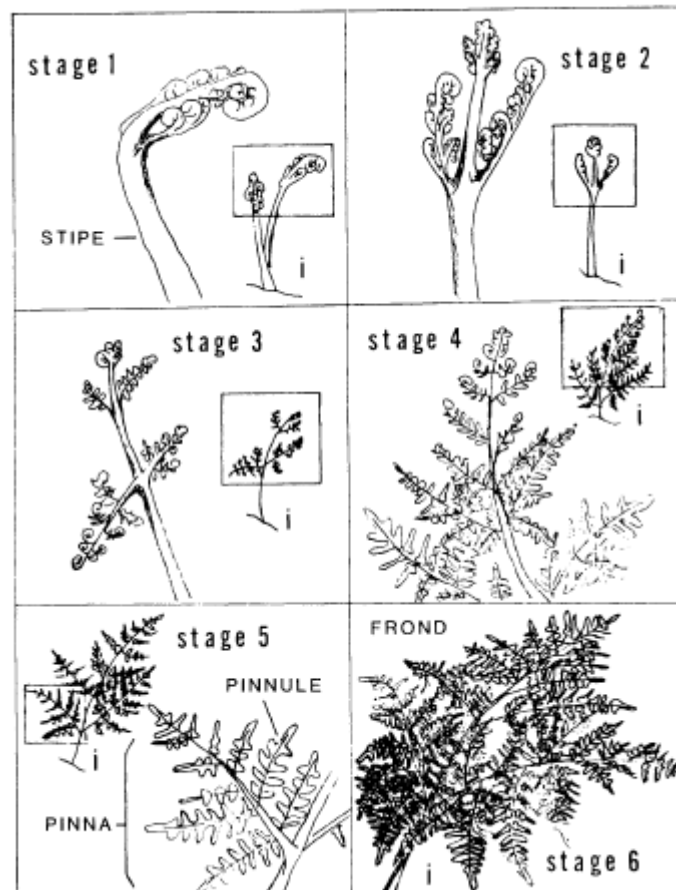


Fig 2.1 Stadi di sviluppo di *P. aquilinum* (Immagine tratta da Temple et al, 1983).

Possono essere inoltre presenti sul rachide, alla base delle pinne e in alcune eccezioni sulle pinnule. Sono caratterizzati da una colorazione marrone scura e un range dimensionali che va da 1 a 4 mm di diametro (Marrs & Watt, 2006).

Vicia sativa (Fabaceae). Il genere *Vicia* comprende circa 140 specie, con un areale di distribuzione che va dalle regioni temperate dell'Europa, all'America meridionale, le Hawaii e l'Africa. La diversità di specie più sorprendente si trova nella regione mediterranea e nel Caucaso. I nettari sono localizzati nella porzione abassiale nelle stipole a loro volta disposte lungo il fusto, alla base dei rami. Gli organi da cui viene secreto il nettare come descritto in altre specie, sono localizzati al

centro delle stipole caratterizzata da una colorazione bruno-porpora (Fig 2.2 C) (Hanelt & Mettin, 1989; Heneidak & Hassan, 2007).

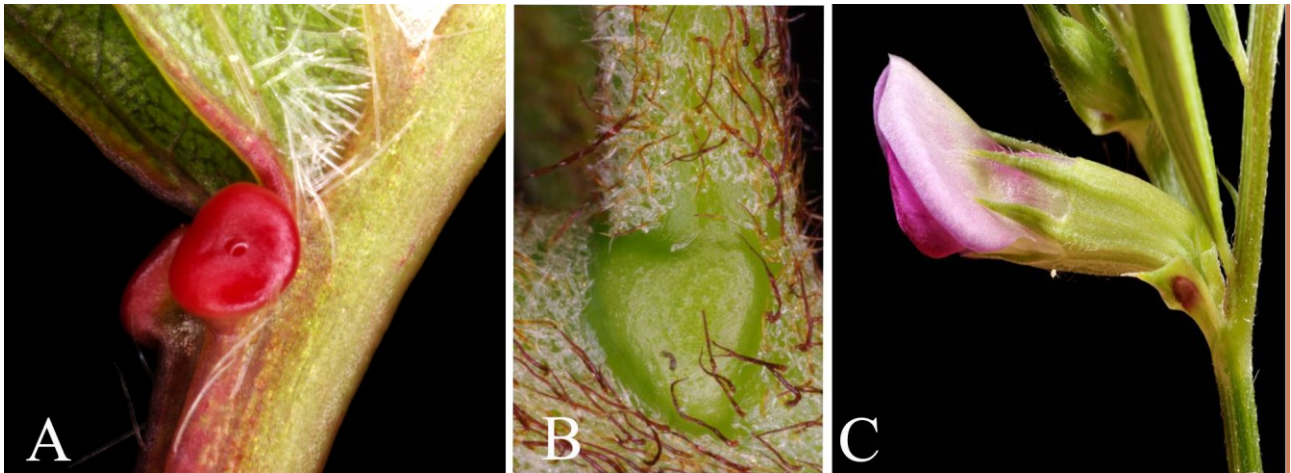


Fig 2.2 Nettarei extrafloriali: A) *P. avium*; B) *P. aquilinum*; C) *V. sativa*.

Gli esperimenti sono stati condotti in due aree naturali: 1) area boschiva con presenza di *Prunus avium* e *Pteridium aquilinum*, caratterizzata da bosco ceduo di castagni *Castanea sativa* concomitante a gap di querceti caducifogli caratterizzati da Cerro (*Quercus cerris*, *Quercus sp*) e Carpino (*Carpinus betulus*). 2) Aree aperte con presenza di *Vicia sativa*, adiacenti ai margini boschivi, caratterizzate dalla presenza di specie erbacee spontanee. Tali zone sono risultate idonee per la totale assenza di sfruttamento intensivo del castagno come fonte commerciale e alimentare che, per il taglio del legname. Inoltre sono risultate prive di coltivazioni agricole intensive offrendo un'ambiente privo di perturbazioni di origine antropica.

2.2.2 Raccolta dati

La raccolta dati è stata condotta da Marzo a Luglio 2015 in relazione al ciclo vegetativo delle nostre piante modello. Nell'area di studio è stata effettuata una raccolta mediante pitfall trap, costituite da un contenitore in plastica (h=90mm; Ø=60mm) in polipropilene, con capacità di 120 ml e aperte per 24h. Questa tecnica viene impiegata spesso per stimare composizione in specie e abbondanze specifiche delle formiche epigee, fornendo informazioni sui pattern di foraggiamento e di distribuzione delle colonie nell'area. Dall'analisi dei campioni è possibile ottenere un indice del livello di attività dato che la frequenza di cattura è influenzata sia dal numero di individui presenti nell'area che, dalla loro mobilità. (Agosti & Alonso, 2000; Bestelmeyer et al, 2000). Per garantire la preservazione dei campioni nelle pitfall, è stato scelto come agente liquido conservante alcool denaturato sottoposto ad un processo di decolorazione mediante carboni attivi e acqua (in proporzione 2:1 per un volume di 40 ml). Nelle aree indicate per ogni specie vegetale target, sono stati tracciati dei plot di (1mx4m). Un gruppo di trappole (n=10) sono state disposte lungo il

perimetro del plot mantenendo una distanza di 1m (Fig 2.3); inoltre sono stati tracciati quattro transetti lineari coincidenti con le diagonali del plot per una estensione di 10 m nelle diverse direzioni (Fig 2.4).

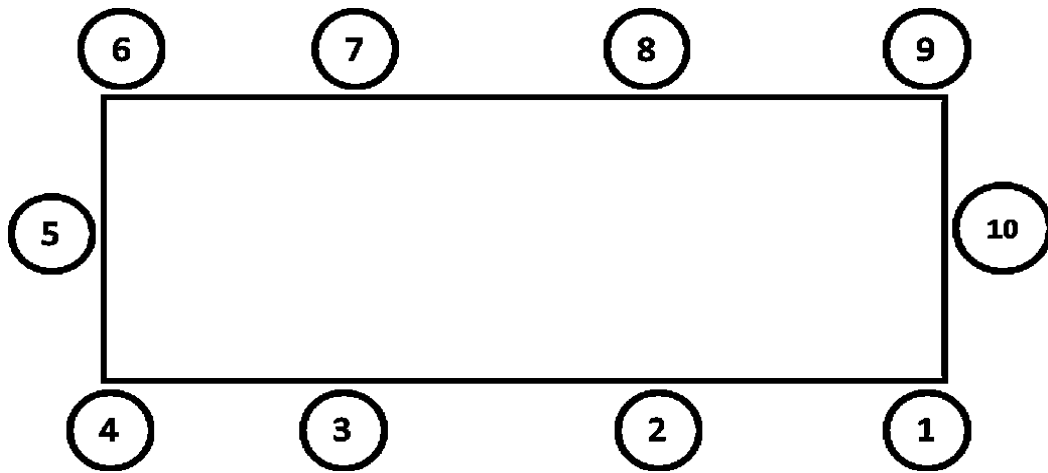


Fig 2.3 Pitfall-trap disposte lungo il perimetro del plot dove sono presenti le piante.

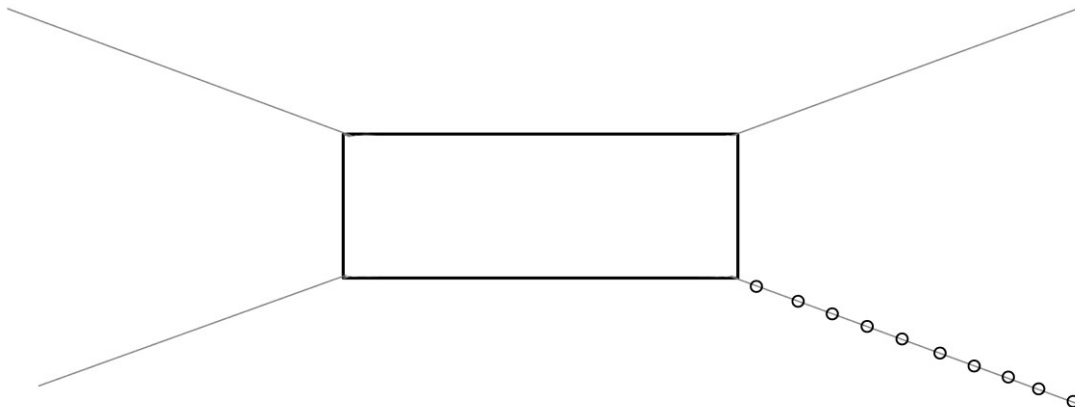


Fig 2.4 Pitfall-trap disposte lungo i transetti lineari coincidenti con le diagonali del plot per una estensione di 10 m.

Per ogni tipologia di pianta sono stati tracciati 6 plot. Per valutare la presenza e la distribuzione delle formiche in relazione alla possibilità di assumere il nettare extraflorale, in 3 plot è stato impedito l'accesso da parte delle formiche ai nettari extraflorali. I nettari sono stati schermati con porzioni di carta di alluminio impedendo alle formiche di interagire con le strutture e assumerne il nettare (Fig 2.5; 2.6).



Fig 2.5 Pianta di *P. avium* e particolare dei nettari extraflorali.



Fig 2.6 Chiusura dei nettari extraflorali di *P. avium* per impedire l'accesso alle formiche.

I campionamenti sono stati ripetuti in funzione del periodo di sviluppo delle piante:

<i>Prunus avium</i>			<i>Pteridium aquilinum</i>		<i>Vicia sativa</i>
06/03/2015	01/05/2015	03/07/2015	29/03/2015	13/06/2015	28/03/2015
13/03/2015	08/05/2015	10/07/2015	11/04/2015	20/06/2015	09/04/2015
20/03/2015	15/05/2015	17/07/2015	18/04/2015	27/06/2015	16/04/2015
27/03/2015	22/05/2015	24/07/2015	25/04/2015	04/07/2015	23/04/2015
03/04/2015	05/06/2015		09/05/2015	11/07/2015	30/04/2015
10/04/2015	12/06/2015		16/05/2015	18/07/2015	07/05/2015
17/04/2015	19/06/2015		23/05/2015	25/07/2015	14/05/2015
24/04/2015	26/06/2015		06/06/2015		21/05/2015
					28/05/2015

Fig 2.7 Calendario dei campionamenti mediate pitfall-trap in relazione alla specie vegetale.

Dal momento che questa tecnica di campionamento risulta meno accurata per screening su specie arboree, il trappolaggio con pitfall è stato associato ad osservazioni mediante la tecnica dello scan-sampling per ogni pianta, per valutare l'interazione delle specie arboree con i nettari extraflorali. Per le piante di *Prunus avium* (n=30) sono stati selezionati 2 rami focali in posizione distale sulla pianta, su cui sono stati effettuati 18 scan sampling della durata di 5 minuti da Marzo a Luglio. Per le piante di *Pteridium aquilinum* (n=67) è stato effettuato il controllo totale della pianta mediante 10 scan sampling della durata di 5 minuti da Marzo a Luglio. Infine per le piante di *Vicia sativa* (n=31) è stato effettuato il controllo totale della pianta tramite 9 scan sampling della durata di 5 minuti da Marzo a Maggio.

Le formiche raccolte nelle trappole sono state identificate a livello di sottofamiglia e genere, mediante l'ausilio di apposite chiavi di riconoscimento (Hölldobler & Wilson, 1990; Bolton, 1994). La discriminazione a livello di specie è stata realizzata con la collaborazione del Dr. Fabrizio Rigato (Museo di Storia Naturale di Milano).

2.2.3 Analisi statistica

Per l'analisi statistica, le pitfall-trap in relazione alla geometria di campionamento sono state suddivise in tre categorie: 1m, entro 5m, entro 10m. Per ogni modello vegetale è stata effettuata una analisi della varianza a due vie (two-way ANOVA) sul numero di formiche presenti in funzione del trattamento (nettari chiusi; nettari aperti) e della distanza (1m, 5m, 10m); seguita da una analisi post-hoc (Tukey test). Per la presenza delle formiche sulle piante è stata effettuata una analisi della

varianza (one-way ANOVA) sul numero di formiche presenti in relazione ai mesi di osservazione. Tutte le analisi sono state eseguite mediante il software IBM SPSS 24.0 (pacchetto Windows).

2.3 Risultati

Il trappolaggio tramite pitfall ha permesso l'analisi di 9123 campioni appartenenti al taxon Formicidae. In totale sono state censite 28 specie, appartenenti a 3 sottofamiglie e 12 generi (Fig 2.8)

1. <i>Lasius distinguendus</i> (Emery, 1916)	15. <i>Crematogaster scutellaris</i> (Olivier, 1792)
2. <i>Lasius emarginatus</i> (Olivier, 1792)	16. <i>Myrmica specioides</i> Bondroit, 1918
3. <i>Lasius neglectus</i> Van Loon et al., 1990	17. <i>Myrmicina graminicola</i> (Latreille, 1802)
4. <i>Lasius niger</i> (Linnaeus, 1758)	18. <i>Pheidole pallidula</i> (Nylander, 1849)
5. <i>Lasius fuliginosus</i> (Latreille, 1798)	19. <i>Tetramorium moravicum</i> Novák & Sadil, 1941
6. <i>Lasius myops</i> Forel, 1894	20. <i>Temnothorax specularis</i> (Emery, 1916)
7. <i>Camponotus vagus</i> (Scopoli, 1763)	21. <i>Temnothorax niger</i> (Forel, 1894)
8. <i>Camponotus lateralis</i> (Olivier, 1792)	22. <i>Temnothorax unifasciatus</i> (Latreille, 1798)
9. <i>Camponotus ethiops</i> (Latreille, 1798)	23. <i>Temnothorax albipennis</i> (Curtis, 1854)
10. <i>Camponotus piceus</i> (Leach, 1825)	24. <i>Temnothorax parvulus</i> (Schenck, 1852)
11. <i>Colobopsis truncata</i> (Spinola, 1808)	25. <i>Temnothorax nylanderi</i> (Foerster, 1850)
12. <i>Plagiolepis pygmaea</i> (Latreille, 1798)	26. <i>Tapinoma sub-boreale</i> Seifert, 2012
13. <i>Formica gagates</i> Latreille, 1798,	27. <i>Tapinoma madeirense</i> Forel, 1895
14. <i>Formica cunicularia</i> Latreille, 1798.	28. <i>Dolichoderus quadripunctatus</i> (Linnaeus, 1771)

Fig 2.8 Check list delle specie di formiche campionate mediante pitfall trap. Le colorazioni indicano l'appartenenza alle sottofamiglie: Formicinae (in verde), Myrmicinae (azzurro), Dolichoderinae (in giallo).

Mediante gli scan sampling abbiamo identificato le formiche presenti sulle piante che interagivano con i nettari extrafloriali:

<i>P. avium</i>	<i>P. aquilinum</i>	<i>V. sativa</i>
<i>C. scutellaris</i>	<i>C. scutellaris</i>	<i>C. scutellaris</i>
<i>L. emarginatus</i>	<i>T. specularis</i>	<i>L. emarginatus</i>
<i>L. fuliginosus</i>	<i>T. niger</i>	<i>L. niger</i>
<i>C. lateralis</i>	<i>T. unifasciatus</i>	<i>C. vagus</i>
<i>C. vagus</i>	<i>T. albipennis</i>	<i>P. pygmaea</i>
<i>P. pygmaea</i>	<i>T. parvulus</i>	<i>F. cunicularia</i>
<i>D. quadripunctatus</i>	<i>T. nylanderi.</i>	
	<i>L. emarginatus</i>	

Fig 2.9 Check list delle specie di formiche presenti sulle piante. Le colorazioni indicano l'appartenenza.

alle sottofamiglie: Formicinae (in verde), Myrmicinae (azzurro), Dolichoderinae (in giallo).

2.3.1 Analisi sulla presenza e andamento delle formiche in relazione a *Prunus avium*

L'analisi dei campioni raccolti con le trappole nei pressi di *Prunus avium* ha evidenziato una differenza altamente significativa nel numero di formiche tra i plot (ANOVA test: $F_{(5,293)} = 83,291$; $p < 0.001$), in funzione del trattamento (ANOVA test: $F_{(1,293)} = 249,18$; $p < 0.001$) e, della distanza delle trappole dalla pianta (ANOVA test: $F_{(2,293)} = 69,24$; $p < 0.001$). I risultati indicano un aumento dell'attività, con un incremento del numero di formiche in relazione ai plot con nettari aperti. L'analisi dei test post-hoc di Tukey ha evidenziato una differenza in funzione della distanza dalle piante, con un progressivo decremento del numero di formiche fino a 10 m. In corrispondenza dei plot con nettari liberi il numero di formiche rimane significativamente più alto. Nei plot con nettari chiusi non si evidenziano differenze tra 1m e 5m, con un'ulteriore diminuzione nella presenza a distanza di 10m dalle piante (Fig 2.10).

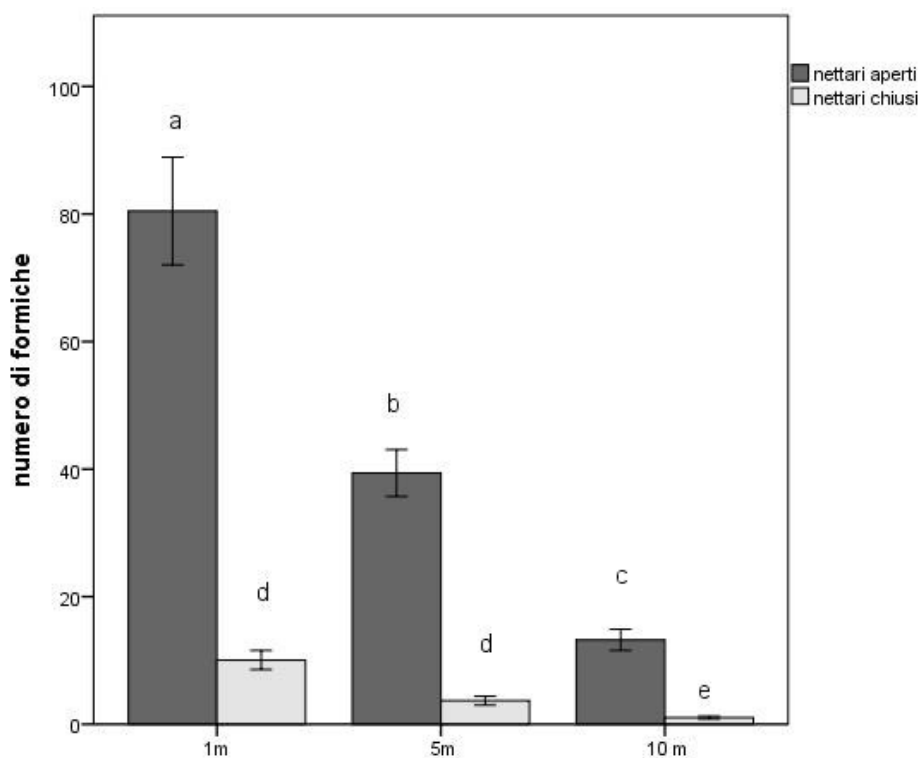


Fig 2.10 Le barre presenti nell'istogramma (\pm errore standard, two-way Anova) indicano il numero medio di formiche riscontrate nelle trappole localizzate nei pressi di *Prunus avium*. In ascissa i gruppi in funzione della distanza delle trappole e ai plot con nettari aperti e nettari chiusi. Le lettere presenti nell'istogramma rappresentano i risultati del confronto tra i gruppi mediante test post-hoc di Tukey. Barre con lettere uguali non presentano differenze statisticamente significative.

L'analisi sulla presenza delle formiche sulle piante descrive una differenza altamente significativa in funzione dei trattamenti (ANOVA test: $F_{(1,27)} = 79,15$; $p < 0,001$), con un aumento del numero di formiche sulle piante con nettari aperti (Fig 2.11).

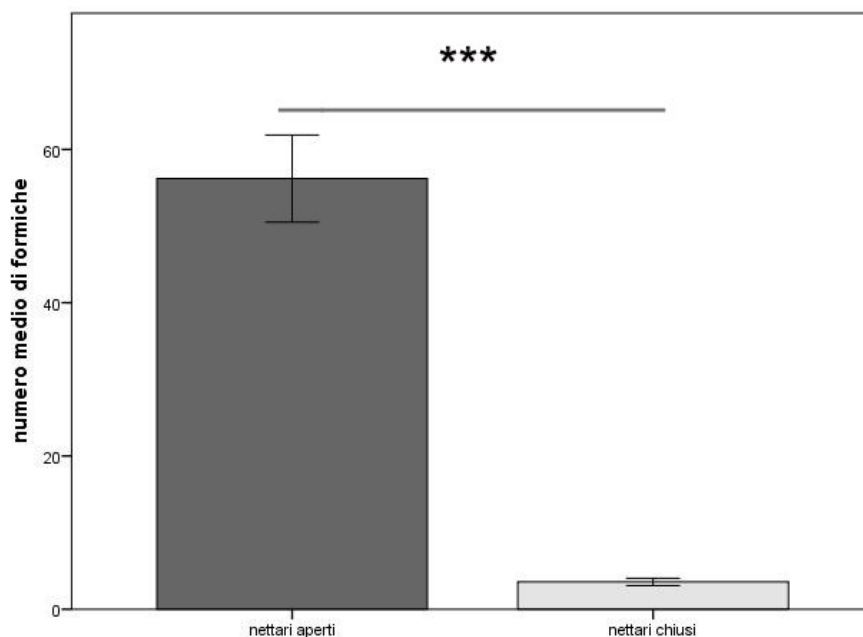


Fig 2.11 Le barre presenti nell' istogramma (\pm errore standard, one-way Anova) indicano il numero medio di formiche presenti sulle piante in funzione dei due trattamenti (nettari aperti; nettari chiusi). Gli asterischi indicano il livello di significatività (***; $p < 0,001$).

Si evidenzia una differenza altamente significativa tra i trattamenti (one-way Anova) anche nell'analisi sull' andamento della presenza delle formiche nel periodo compreso da Marzo a Luglio (ANOVA test: $F_{(9,20)} = 19,7$; $p < 0,001$) (Fig 2.12). Si evidenzia un picco della presenza delle formiche in corrispondenza dei mesi di Aprile e Maggio. Nei plot con nettari chiusi oltre a essere presente un bassissimo numero di individui in confronto ai plot con nettari aperti, non si evidenziano differenze nel numero di formiche presenti durante la stagione vegetativa.

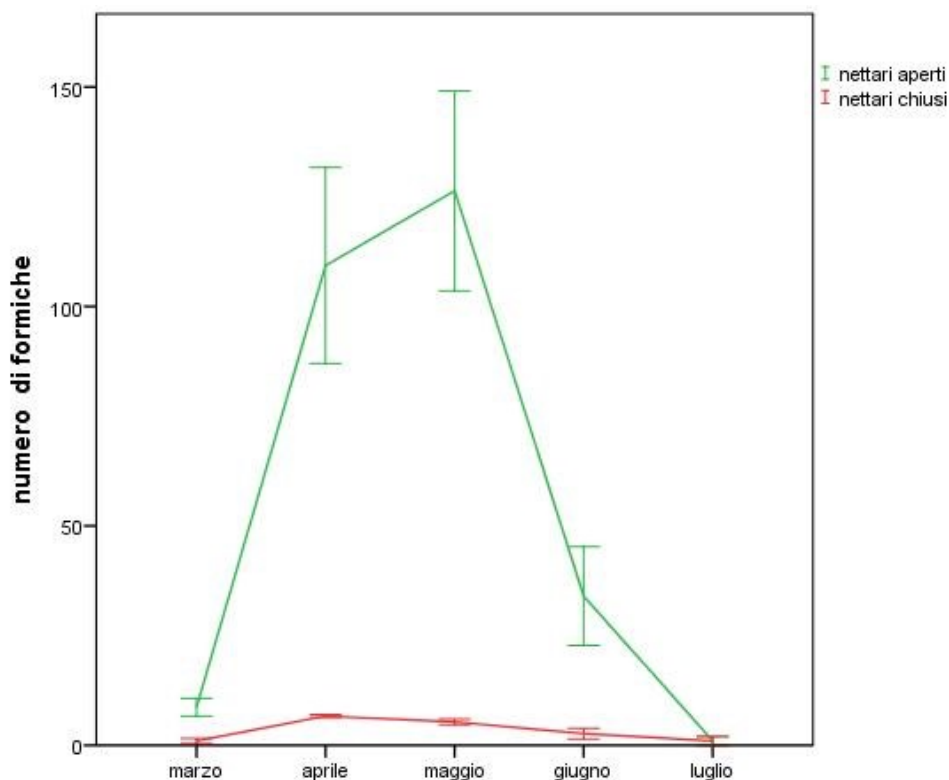


Fig 2.12 Andamento medio (\pm SE) della presenza delle formiche durante la stagione vegetativa di *P. avium*.

2.3.2 Analisi sulla presenza e andamento delle formiche in relazione a *Pteridium aquilinum*

L'analisi statistica (two-way ANOVA) del pitfall-trapping per *Pteridium aquilinum* ha evidenziato una differenza altamente significativa tra i plot (ANOVA test: $F_{(5,293)} = 52,1$; $p < 0.001$), in funzione del trattamento nettari aperti/nettari chiusi (ANOVA test: $F_{(1,293)} = 105,51$; $p < 0.001$) e, della distanza delle trappole dalla pianta (1m, 5m e 10m), (ANOVA test: $F_{(2,293)} = 53,26$; $p < 0.001$). I risultati indicano un aumento dell'attività, con un incremento del numero medio di formiche in relazione ai plot con nettari aperti. I test post-hoc di Tukey evidenziano una differenza in funzione della distanza dalle piante, con un progressivo decremento del numero di formiche fino a 10 m. Nei plot con nettari chiusi non ci sono differenze statisticamente significative tra le trappole in funzione della distanza (Fig 2.13).

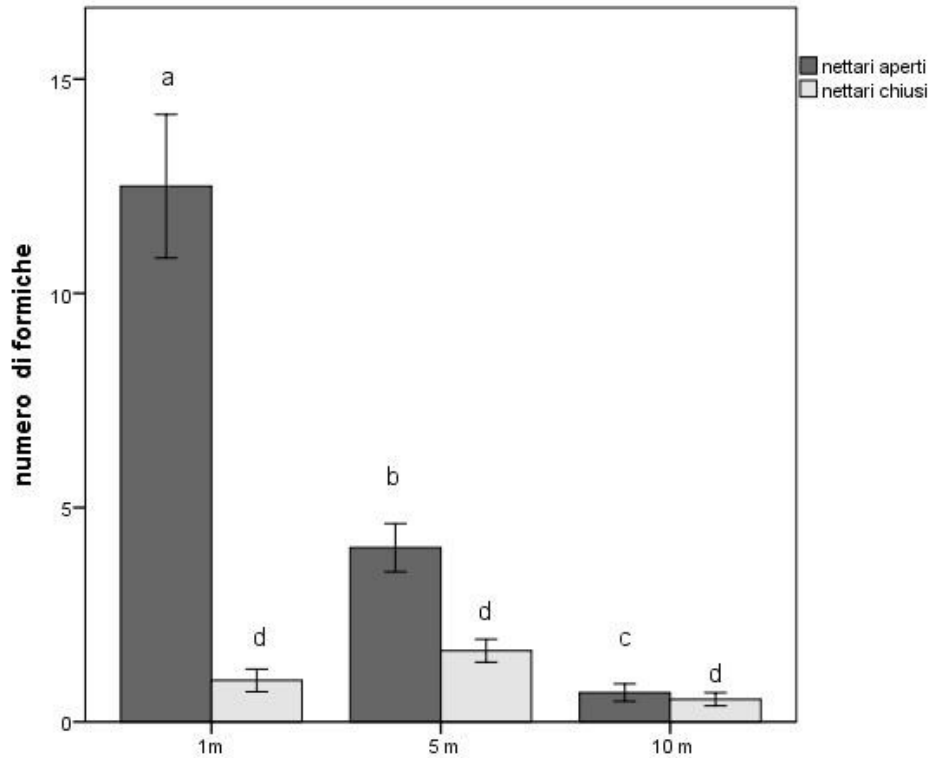


Fig 2.13 Le barre presenti nell'istogramma (\pm errore standard, two-way Anova) indicano il numero medio di formiche riscontrate nelle trappole localizzate nei pressi di *P. aquilinum*. In ascissa i gruppi in funzione della distanza delle trappole e ai plot con nettari aperti e nettari chiusi. Le lettere presenti sulle barre rappresentano i risultati del confronto tra i gruppi mediante test post-hoc di Tukey. Barre con lettere uguali non presentano differenze statisticamente significative.

L'analisi (scan-sampling) sulla presenza delle formiche sulle piante indica una differenza altamente significativa in funzione dei trattamenti (ANOVA test: $F_{(1,65)} = 70,92$; $p < 0.001$), con un aumento del numero di formiche sulle piante con nettari aperti (Fig 2.14).

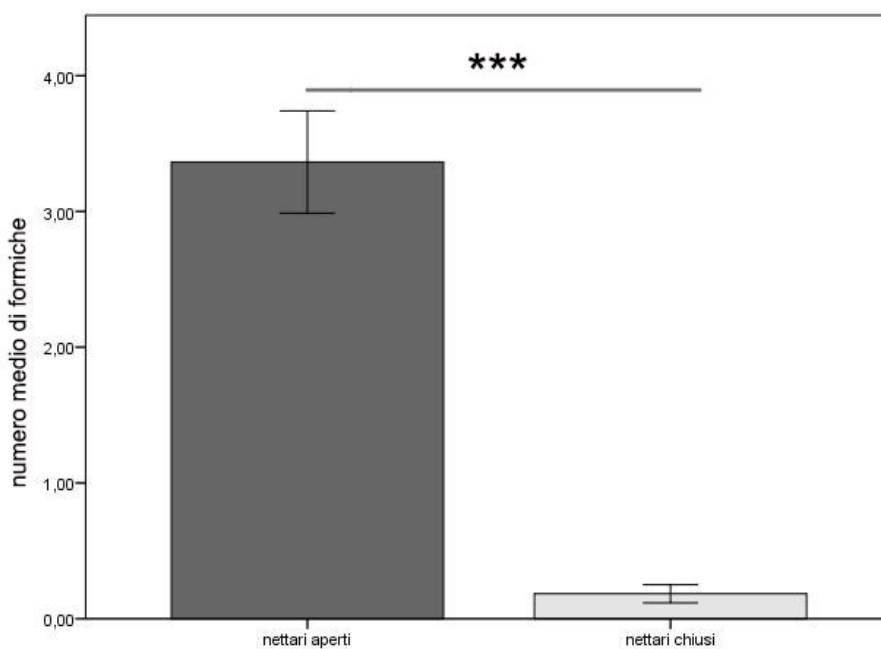
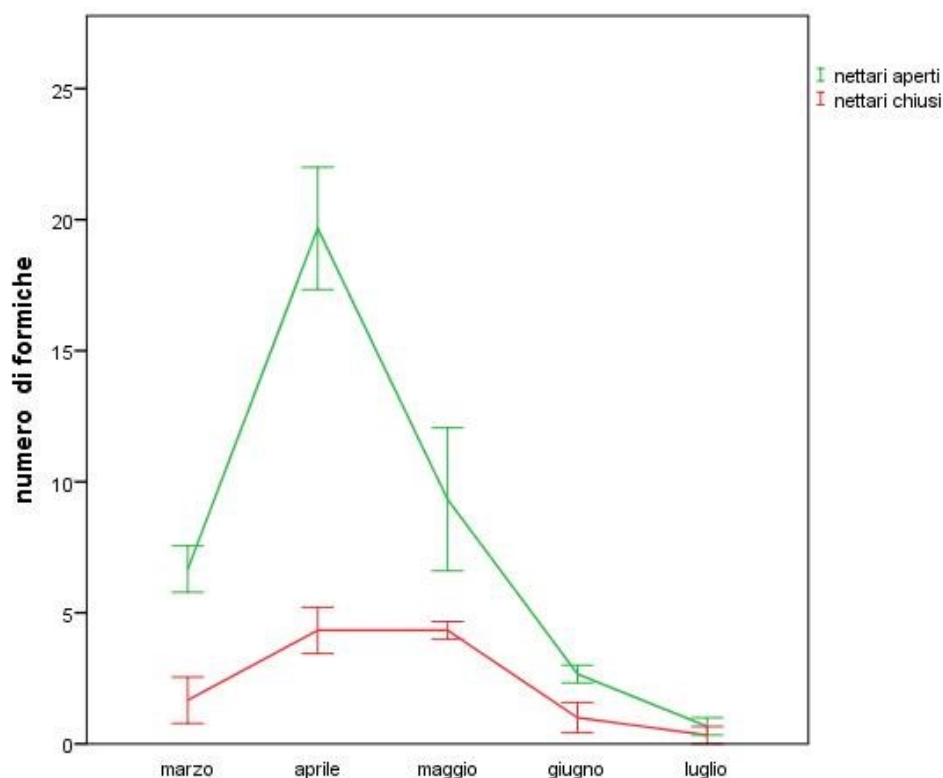


Fig 2.14 Le barre presenti nell'istogramma indicano il numero medio (\pm errore standard, one-way Anova) di formiche presenti sulle piante in funzione dei due trattamenti (nettari aperti; nettari chiusi). Gli asterischi indicano il livello di significatività (***) ($p < 0,001$)

Nell'andamento temporale della presenza delle formiche sulle piante, si evidenzia una differenza altamente significativa nel numero medio di formiche tra i trattamenti nei mesi tra Marzo e Luglio (ANOVA test: $F_{(9,20)} = 21,57$; $p < 0.001$) (Fig 2.15); con un picco di presenze nei plot con nettari aperti in corrispondenza del mese di Aprile. I test post-hoc evidenziano una differenza tra i trattamenti in tutti i campionamenti da Marzo a Maggio. Successivamente in relazione ai trattamenti, non si evidenziano differenze nel numero di formiche presenti sulle piante nei mesi di Giugno e Luglio.

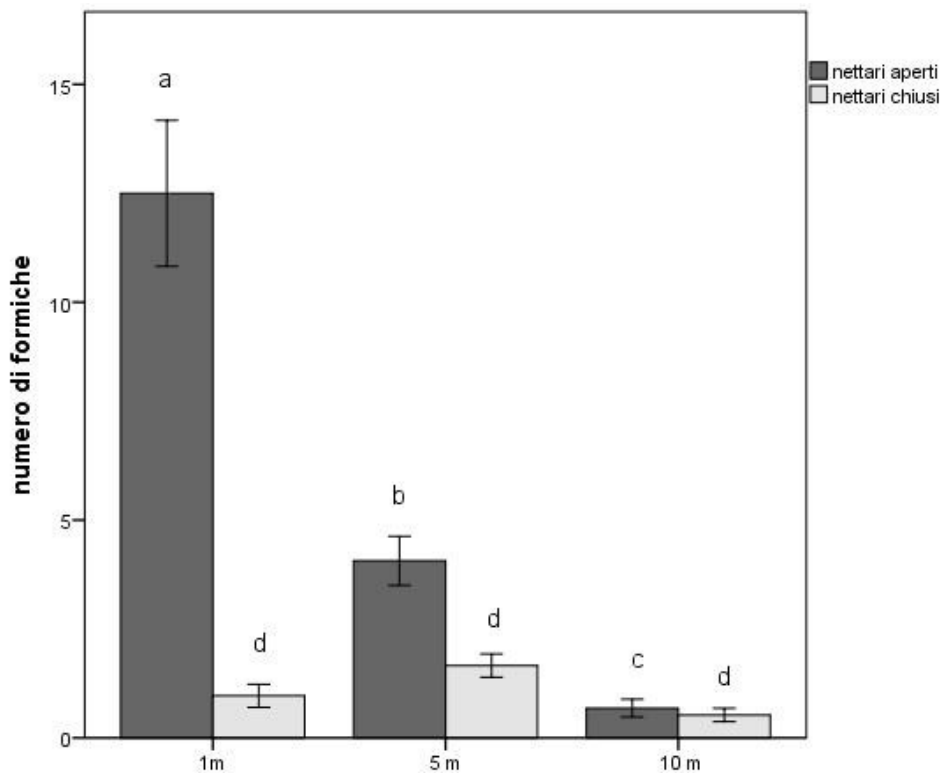


2.15 Andamento medio (\pm SE) della presenza delle formiche durante la stagione vegetativa di *P. avium*.

2.3.3 Analisi sulla presenza e andamento delle formiche in relazione a *Vicia sativa*

L'analisi statistica (two-way ANOVA) inerente il pitfall-trapping per *Vicia sativa* ha evidenziato una differenza altamente significativa tra i plot (ANOVA test: $F_{(5,293)} = 52,09$; $p < 0.001$) in funzione del trattamento nettari aperti/nettari chiusi (ANOVA test: $F_{(1,293)} = 105,51$; $p < 0.001$) e, della distanza delle trappole a 1m, 5m e 10m (ANOVA test: $F_{(2,293)} = 53,26$; $p < 0.001$). Come in precedenza i risultati indicano un aumento dell'attività, con un incremento del numero medio di

formiche in relazione ai plot con nettari aperti. I confronti post-hoc evidenziano una differenza in funzione della distanza dalle piante, con un progressivo decremento del numero di formiche fino a 10 m. Nei plot con nettari chiusi non si evidenziano differenze nel numero di formiche presenti in funzione della distanza (Fig. 2.16).



2.16 Le barre presenti nell'istogramma indicano il numero medio di formiche (\pm errore standard, two-way Anova) riscontrate nelle trappole localizzate nei pressi di *V. sativa*. In ascissa i gruppi in funzione della distanza delle trappole e ai plot con nettari aperti e nettari chiusi. Le lettere presenti sulle barre rappresentano i risultati del confronto tra i gruppi mediante test post-hoc di Tukey. Barre con lettere uguali non presentano differenze statisticamente significative.

L'analisi sulla presenza delle formiche sulle piante indica una differenza altamente significativa in funzione dei trattamenti (ANOVA test: $F_{(1,65)} = 70,92$; $p < 0.001$), con un aumento del numero di formiche sulle piante con nettari aperti (Fig. 2.17).

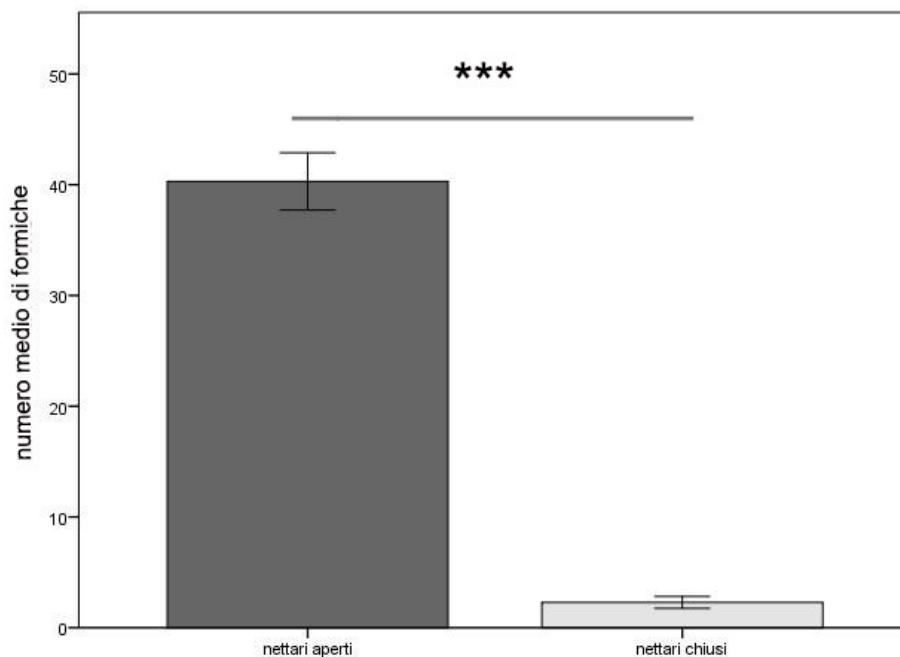


Fig 2.17 le barre presenti nell'istogramma indicano il numero medio (\pm errore standard, one-way Anova) di formiche presenti sulle piante in funzione dei due trattamenti (nettari aperti; nettari chiusi). Gli asterischi indicano il livello di significatività (***) ($p < 0,001$)

Nell'andamento della presenza delle formiche sulle piante, si evidenzia una differenza altamente significativa nel numero medio di formiche tra i trattamenti nei vari mesi (ANOVA test: $F_{(9,20)} = 21,57$; $p < 0.001$) (Fig 2.18); con un picco della presenza delle formiche nei plot con nettari aperti in corrispondenza del mese di Aprile. I test post-hoc evidenziano una differenza tra i trattamenti per tutta la stagione fino alla maturazione dei frutti. Nei plot con nettari chiusi non si evidenziano differenze nel numero di formiche presenti durante la stagione.

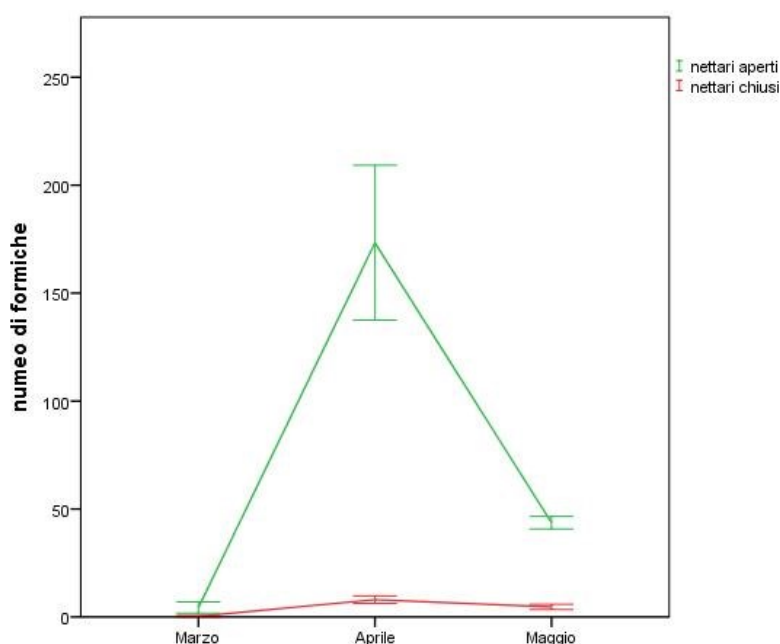


Fig 2.18 Andamento medio (\pm SE) della presenza delle formiche durante la stagione vegetativa di *V. sativa*.

2.4 Discussione e conclusioni

Gli esperimenti hanno evidenziato una alta biodiversità della mirmecofauna nei siti di campionamento, con 28 specie identificate. Dalle analisi emerge una diminuzione della presenza e attività delle formiche in corrispondenza dei transetti sperimentali con nettari chiusi e, un evidente incremento dell'attività della mirmecofauna nei transetti con accesso libero. Questo è spiegabile con la presenza di nettari extraflorali attivi, il cui prodotto è accessibile alle formiche. Per tutte le specie con nettari liberi è stata evidenziata una presenza elevata di formiche entro 1m (quindi in estrema vicinanza) delle piante mirmecofile. Inoltre, la differenza nella presenza delle formiche è risultata statisticamente differente tra i trattamenti anche a distanza 5m e 10m; evidenziando anche in questo caso un numero maggiore di formiche in relazione ai plot con nettari aperti. Differenti studi hanno evidenziato la azione positiva esercitata dalle formiche su piante mirmecofile e mirmecofite (Letorneau, 1998; Del-Claro et al, 2016). L'incremento della mirmecofauna in corrispondenza delle piante mirmecofile e, nelle zone adiacenti, potrebbe avere un impatto positivo anche sulla vegetazione circostante. Infatti grazie alle loro azione dissuasiva dovuta alla mera presenza e attività di pattugliamento (patrolling) nonché alle loro caratteristiche di predatori generalisti, le formiche potrebbero estendere la loro protezione alle piante limitrofe. I risultati di questa indagine, dimostrano un consistente effetto di mirmecofilia, sottolineando il legame fra varie specie di formiche e le piante utilizzate come modello nel presente studio.

Gli scan sampling effettuati sulle piante hanno dimostrato un aumento del numero totale di formiche su piante con nettari extraflorali liberi, evidenziando l'elevata attrattività e l'interesse per queste strutture in specie vegetali differenti. All'opposto, sulle piante con nettari extraflorali chiusi abbiamo registrato un scarsa presenza di formiche dovuta essenzialmente a pattugliamento occasionale.

C. scutellaris e *L. emarginatus* sono risultate le specie di formiche più generaliste poiché riscontrate su tutte le specie vegetali in esame. Per le specie appartenenti al genere *Temnothorax* è stata riscontrata una certa preferenza per *P. aquilinum*. Questa attrattività potrebbe essere dovuta a peculiari caratteristiche del nettare extraflorale della pianta. Durante il periodo di osservazione, in relazione alle piante con nettari extraflorali aperti, sono state registrate oscillazioni del numero di formiche presenti, con evidenti picchi in periodi diversi a seconda della specie vegetale. Ciò, oltre ad essere legato alla normale fenologia e ritmi stagionali della pianta, potrebbe essere dovuto a una risposta delle piante in relazione alla presenza stessa delle formiche, con un aumento delle secrezioni nettarifere tarata per garantirne la presenza costante in momenti particolarmente importanti per la pianta o a seguito di eventi contingenti (attacco di fitofagi).

I dati raccolti suggeriscono anche strategie per un possibile trasferimento tecnologico di queste informazioni. L'utilizzo di banker plants (un sistema di piante coltivate per allevare/sostenere nemici naturali) (Huang et al, 2011; Shovon, 2018) ad esempio, costituite da piante mirmecofile. Organizzate e disposte ai margini di campi o in apposite zone cuscinetto all'interno delle coltivazioni, potrebbero incrementare la mirmecofauna presente offrendo i benefici ad essa associati. Come suggerito dai nostri dati ciò potrebbe portare ad un relativo incremento delle formiche nelle zone circostanti, favorendone il contatto con le varietà agricole, estendendo anche a loro l'attività di protezione. Attualmente, coltivazioni cuscinetto di alcune specie vegetali, sono studiate in sistemi di "trap crop". Si tratta dell'utilizzo di differenti specie di piante appositamente coltivate attorno ai campi o alle parcelle agricole utili ad attirare differenti parassiti, impedendogli di attaccare le varietà di interesse commerciale. Questo sistema garantisce una linea difensiva contro fitofagi e parassiti di differenti varietà orticole (*Solanum lycopersicum*, *Allium cepa*, *Crocus sativus*, *Brassica oleracea*) (Sarkar et al, 2018). Utilizzando tale tecnica con l'integrazione di specie mirmecofile per garantire l'attività delle formiche si potrebbe garantire alle coltivazioni una difesa ad ampio spettro nei confronti di differenti specie di fitofagi (fitomizi e/o masticatori). Ciò consentirebbe di ridurre l'utilizzo di insetticidi con un conseguente miglioramento della qualità ambientale e dei prodotti.

CAPITOLO 3

Studio sugli effetti diretti della presenza delle formiche su Fabaceae presenti in natura e coltivate

3.1 Scopo

Con il presente lavoro abbiamo valutato i possibili effetti dovuti alla presenza delle formiche su Fabaceae in condizioni naturali e in agroecosistemi. Per questo esperimento è stata utilizzata *Vicia sativa*, presente in natura nell'area sperimentale (cfr. cap1). In concomitanza è stata approntata la coltivazione di una pianta orticola di interesse agricolo e ampiamente diffusa e consumata su tutto il territorio nazionale, *Vicia faba*. Entrambe le specie sono caratterizzate da nettari extraflorali presenti nella faccia adassiale delle stipole (Fig 3.1). Lo scopo della ricerca è stato valutare i possibili effetti sul benessere delle piante durante il loro periodo di sviluppo, in presenza e assenza di formiche. Pertanto, durante il periodo di sviluppo delle piante da Marzo a Giugno 2017 abbiamo registrato i possibili effetti di protezione dovuti alle formiche e gli eventuali effetti su parametri connessi alla fitness della pianta.



Fig 3.1 A) *C. scutellaris* su nettari di *V. sativa*; B) *Crematogaster scutellaris* su nettari di *V. faba*.

3.2 Materiali e metodi (I)

3.2.1 Area di studio

Gli esperimenti sono stati condotti in alta Toscana, nella frazione di Fornoli (44°15'17.5"N 9°58'04.9"E; altitude ca.75m), nel comune di Villafranca in Lunigiana (MS). Per le coltivazioni

di *Vicia faba* sono state scelte due parcelle agricole (GPS campo 1: 44°15'17,2'' Nord; 9°58'05,0'' Est; GPS campo 2 : 44°15' 12,5" Nord ; 9° 57' 52,9" Est) prive di sfruttamento intensivo e, adibite a differenti colture orticole. Per il sito di indagine su piante spontanee di *Vicia sativa* è stata identificata una area naturale limitrofa al margine boscato con presenza di piante sperimentali (cfr. cap1).

3.2.2 Esperimenti su *Vicia sativa*

Per lo studio che ha coinvolto *Vicia sativa* (Fig 3.1), nell'area di studio sono state tracciati due transetti di (1mx4 m) dove sono state identificate 24 piante. Abbiamo valutato il possibile effetto dovuto alla presenza delle formiche sulla fitness delle piante. A (n= 12) piante sono stati applicati manicotti di nastro biadesivo per impedire l'accesso alle formiche. In fase di crescita sono stati collocati sostegni in legno di (70 cm). Ogni pianta è stata fissata al sostegno con l'ausilio di nastro elastico per agricoltura. Poiché l'area sperimentale è una zona incolta, è stato necessario effettuare una pulizia dell'area limitrofa le piante, in modo da impedirne il contatto con altre piante erbacee consentendo il passaggio delle formiche. Dopo un mese dalla germinazione delle piante di *V. sativa*, mediante uno scan sampling di 5 minuti per pianta è stato valutato:

- Tasso di danno fogliare: numero di foglie danneggiate/foglie totali (Fd),
- Numero di insetti masticatori per pianta (Pf),

Da Marzo a Maggio 2017 sono stati effettuati 26 scan sampling (3 minuti pianta, 2 volte a settimana) per quantificare e descrivere la presenza delle formiche sulle piante. A maturazione è stata effettuata una raccolta dei frutti per ogni pianta registrando:

- numero totale di frutti (baccelli) prodotti (nB);
- tasso di sviluppo dei frutti: frutti sviluppati / frutti prodotti (sB);
- numero di semi prodotti (nS);
- tasso di semi vitali: semi vitali/totale semi (sV);
- seed mass : peso dei semi vitali (pS);
- numero di insetti predatori dei semi (nP);
- tasso di danneggiamento: numero di semi danneggiati / semi vitali (nSd).

In seguito alla raccolta, i semi sono stati stoccati per un periodo di osservazione di circa 20 giorni per valutare l'eventuale presenza di coleotteri nei semi.

3.2.3 Definizione delle categorie

- sB: consideriamo frutti completamente sviluppati, baccelli con semi privi di deformazioni e danni. Non formati, i frutti di ridotte dimensioni, avvizziti con assenza di semi o presenza di semi non sviluppati all'interno;
- nS: consideriamo i semi presenti all'interno dei frutti sviluppati. Classifichiamo vitali, semi in grado di germinare di dimensioni pari o superiori agli 0,5 mm, con assenza di lesioni o malformazioni (Fig 3.2 A). Definiamo semi non vitali tutti i semi non in grado di geminare, inferiori agli 0,5mm, con alterazioni morfologiche (avvizzimento, alterazione della superficie e malformazioni) (Fig 3.2 B). Per distinguere le categorie è stato effettuato un test di germinabilità, n= 100 semi (50 per categoria) sono stati coltivati in celle termostate con la stessa quantità di acqua (2 volte a settimana per 15 giorni), T= 24°C con ciclo giorno notte 16/8 h;
- nP: larve e insetti presenti all'interno dei semi o dei baccelli in seguito alla raccolta (Fig 3.2 C/D);
- nSd: definiamo tutti i semi con presenza di fori e rimozione di materiale interno, evidenza di una predazione (Fig 3.2 E).



Fig 3.1 Pianta di *V. sativa* in campo.

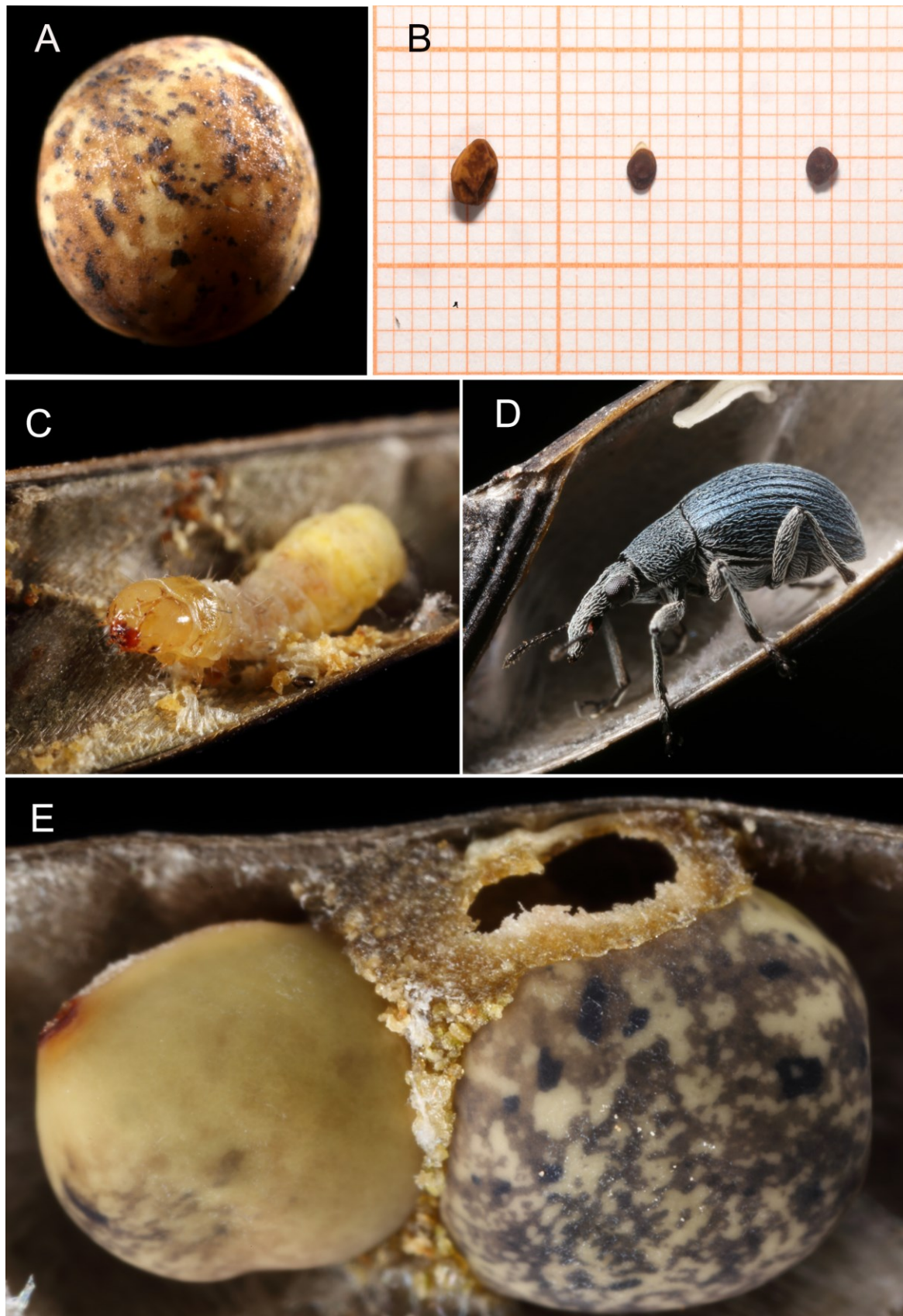


Fig 3.2 Contenuto dei frutti di *V. sativa*, A) semi vitali; B) semi non vitali; C/D) categoria nP: larve e coleotteri del genere *Apion spp* presenti all'interno dei frutti; E) categoria nSd: seme danneggiato.

3.2.4 Analisi statistica sugli esperimenti di *V. sativa*

Per categorie nB, sB, nS, sV, pS, nP e nSd in funzione della presenza/assenza di formiche, è stata effettuata una analisi multivariata (MANOVA) per valutare complessivamente l'effetto dei trattamenti. Ogni variabile (nB, sB, nS, sV, pS, nP e nSd) successivamente è stata analizzata singolarmente in funzione del trattamento mediante una analisi della varianza (one-way ANOVA) per valutare gli effetti della presenza delle formiche. Per le categorie Fd, sB, sV e nSd è stata effettuata una trasformazione dei dati secondo la formula: $X = \arcsen(\sqrt{x})$, dove con x indichiamo il rapporto da calcolare. Tutte le analisi sono state effettuate mediante il programma IBM SPSS 14.0 (pacchetto Windows). Dalle analisi sono state escluse piante danneggiate o con presenza di consistenti danni dovuti ad agenti atmosferici.

3.3 Risultati degli esperimenti su *V. sativa*

Sono state analizzate 24 piante. Gli scan sampling hanno evidenziato 3 specie di formiche presenti sulle piante di *V. sativa* (Fig 3.2) liberamente accessibili: *Crematogaster scutellaris* è risultata la specie più abbondante presente sul 50% delle piante, *Lasius emarginatus* sul 42%, *Plagiolepis pygmaea* sull' 8%. Per le categorie Fd (il numero di foglie danneggiate/ foglie totali) e Pf (il numero di insetti masticatori per ogni pianta) dopo un mese dalla germinazione non abbiamo registrato foglie danneggiate né presenza di insetti defogliatori sulle piante. L'analisi multivariata sulle componenti nB, nS, sV, pS, sB, nP e nSd evidenzia una differenza statisticamente significativa tra i trattamenti (MANOVA: $V=0,98$, $F_{(8,15)}=106,64$; $p < 0,001$). Il risultato indica un effetto positivo sui parametri inerenti la fitness della pianta. I risultati delle analisi condotte sulle singole categorie qui di seguito riportati descrivono:

- **nB** (numero di frutti prodotti $n=733$): le analisi hanno evidenziato una differenza statisticamente significativa tra i trattamenti (ANOVA: $F_{(1,22)}=10,02$; $p=0,004$). Le analisi descrivono un numero maggiore di frutti prodotti nelle piante con presenza di formiche ($31,17 \pm 0,24$ se), rispetto a piante senza formiche ($29,92 \pm 0,31$ se) (Fig 3.4A);
- **sB** Tasso di sviluppo dei frutti: le analisi non hanno evidenziato differenze statisticamente significative nelle percentuali di frutti sviluppati e non sviluppati tra i trattamenti ($1,46 \pm 0,11$ se ; $1,44 \pm 0,13$ se; ANOVA: $F_{(1,22)}=0,07$; $p=0,79$) (Fig 3.4 B);
- **nS** (numero di semi prodotti $n=6836$): le analisi non evidenziano una differenza tra i trattamenti nel numero di semi prodotti (ANOVA: $F_{(1,22)}=4,10$; $p=0,056$). Piante con presenza di formiche non producono un numero maggiore di semi ($301,67 \pm 49,63$ se), rispetto a piante senza formiche ($270,25 \pm 20,87$ se) (Fig 3.4 C);

- **sV** tasso di semi vitali (semi vitali/totale semi prodotti): le analisi evidenziano una differenza altamente significativa in presenza/assenza di formiche (ANOVA: $F_{(1,22)} = 740,15$; $p < 0,001$). Si evidenzia un incremento della percentuale di semi vitali nelle piante con formiche ($1,51 \pm 0,16$ se) e di conseguenza, una diminuzione dei semi non vitali sulle stesse (Fig 3.4D). All'opposto si evidenzia un incremento della percentuale di semi non vitali nelle piante con assenza di formiche ($0,77 \pm 0,22$ se);
- **pS** seed mass (n= 5174): le analisi hanno dimostrato nuovamente una differenza altamente significativa tra i trattamenti (ANOVA: $F_{(1,22)} = 221,17$; $p < 0,001$); registrando un peso medio dei semi maggiore nelle piante pattugliate dalle formiche ($0,28 \pm 0,0009$ se) (Fig 3.4 E), rispetto alle piante con assenza di formiche ($0,12 \pm 0,0005$ se). Il controllo dei semi e, in seguito il loro stoccaggio, hanno evidenziato la presenza di larve e adulti di coleotteri (Coleoptera; Apionidae) (vedi Fig 3.2 C-D);
- **nP** numero di insetti predatori dei semi (numero di insetti predatori dei semi/ semi vitali): la analisi statistica ha evidenziato ancora una volta, una differenza altamente significativa tra i trattamenti (ANOVA: $F_{(1,22)} = 60,10$; $p < 0,001$). Le analisi evidenziano un numero inferiore di insetti e larve sulle piante con presenza di formiche ($0,03 \pm 0,001$ se) rispetto a piante con assenza di formiche ($0,18 \pm 0,228$ se) (Fig 3.4 F). Di conseguenza, la analisi statistica, mostra una differenza altamente significativa tra i trattamenti sulla condizione dei semi (ANOVA: $F_{(1,22)} = 71,13$; $p < 0,001$). Per la categoria **nSd** (numero di semi danneggiati dai predatori/semi vitali, n= 1369) in relazione al numero di insetti, registriamo un abbattimento della percentuale di semi danneggiati nelle piante con formiche ($0,00 \pm 0,00$ se), contro un aumento di insetti e semi danneggiati nelle piante prive di formiche ($5,11 \pm 0,60$ se) (Fig 3.5 G).

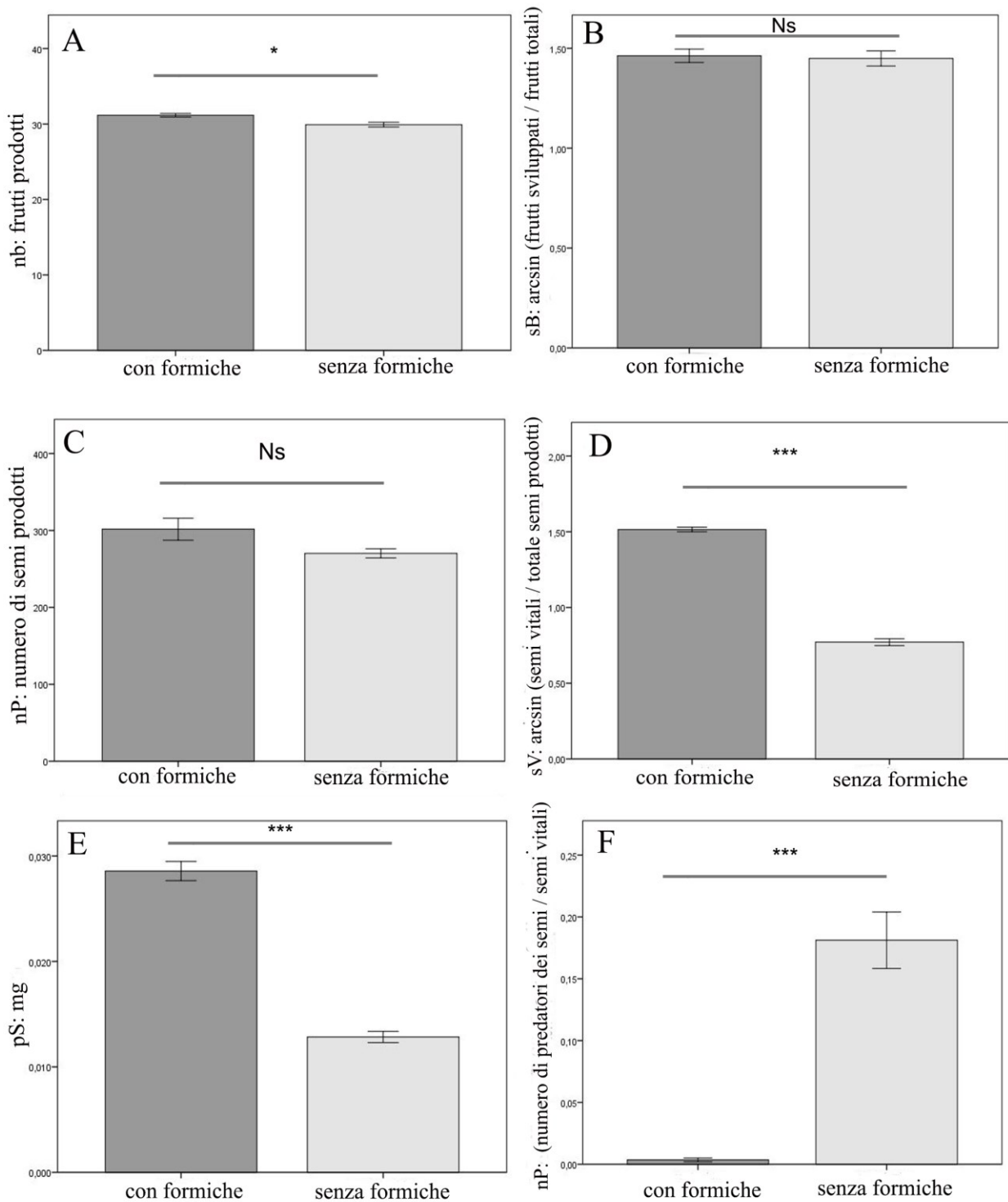


Fig 3.4 Effetti del trattamento (con formiche/ senza formiche) sui parametri relativi alla fitness della pianta di *V. sativa*. Le barre presenti negli istogrammi indicano i valori medi per ogni parametro analizzato (\pm errore standard, one-way Anova). In ogni grafico è mostrato il confronto tra i trattamenti (con formiche/senza formiche). Le variabili misurate: A) numero di frutti prodotti, B) arcsin frutti sviluppati/totale frutti prodotti, C) numero di semi prodotti, D) arcsin semi vitali/totale semi prodotti, E) peso dei semi vitali. F) numero di insetti predatori dei semi vitali G) numero di semi danneggiati/semi vitali. Per i parametri D/E/F le analisi statistiche evidenziano una differenza altamente significativa tra i trattamenti (***; $p < 0,001$); A (*; $p < 0,05$); per le variabili B/C non sono state evidenziate differenze statisticamente significative tra i trattamenti (cfr. paragrafo 3.3).

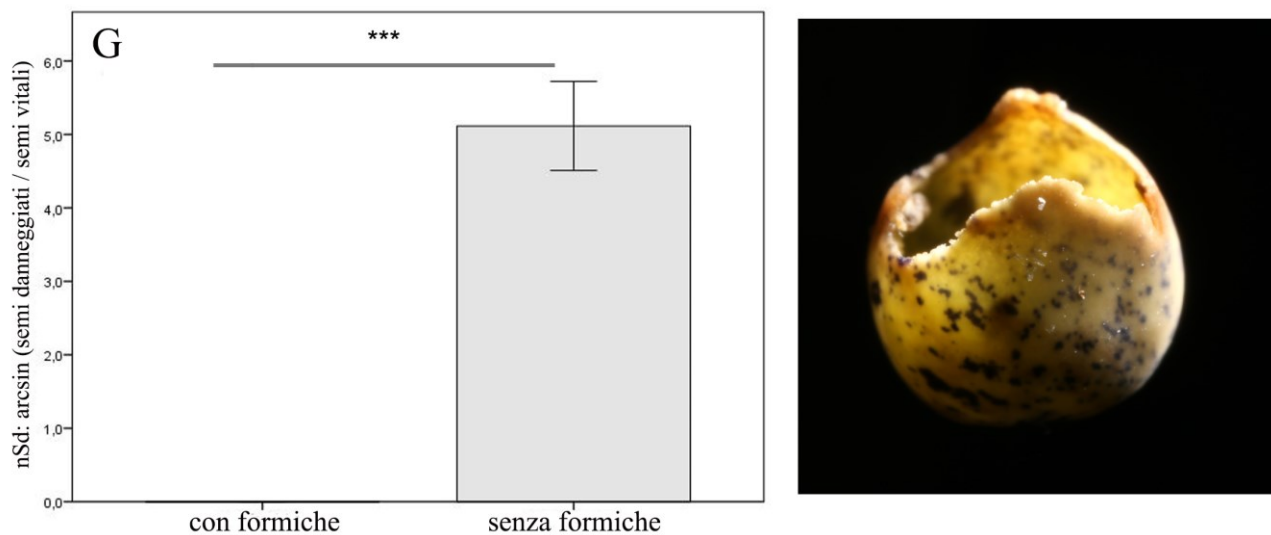


Fig 3.5 G) Le barre presenti nell' istogramma indicano il numero medio di semi danneggiati dai predatori (\pm errore standard, one-way Anova). Gli asterichi indicano il livello di significatività (***) $p < 0,001$ (cfr. parag 3.3).

3.4 Materiali e metodi (II)

3.4.1 Esperimenti su *Vicia faba*

Per la coltivazione di *Vicia faba* sono state tracciate due parcelle di terreno agricolo (3mx4m). Prima della semina il terreno è stato preparato effettuando una aratura il 03/02/2017 e una fresatura sette giorni prima della messa a dimora dei semi il 27/02/2017. Per la semina sono stati utilizzati semi certificati provenienti da agricoltura biologica (Symbiosys; Specie FA00015; Varietà Aguadulce Supersimonia; Rif.C/S-Lotto AF0665) e collocati a distanza di 30 cm. In totale sono state coltivate 100 piante (50 per parcella), suddivise in filari da 10 piante con distanza tra i filari di 50 cm. Alle piante è stata somministrata acqua (500 cl per pianta) 2 volte a settimana. Sia in fase di preparazione del terreno che di messa a dimora dei semi e, successivamente, per tutto il periodo di coltivazione non sono stati aggiunti concimi o ammendanti chimici nel terreno. Dopo 30 giorni dalla nascita delle piante, per ognuna è stato collocato un sostegno in legno (1,70 cm) (Fig 2.6 A). Ogni pianta è stata fissata al sostegno con l'ausilio di nastro elastico per agricoltura. Durante la stagione se necessario a seguito di allerta meteo arancione, sono state collocate reti protettive contro la grandine per l'intero perimetro delle coltivazioni. Per valutare l'effetto della presenza delle

formiche sulla fitness delle piante, su 25 piante per parcella appena germinate, sono stati collocati manicotti di nastro biadesivo per insetti lungo il fusto, utili a impedire l'accesso delle formiche.

Dopo un mese dalla germinazione, mediante uno scan sampling di 5 minuti per pianta è stato valutato:

- tasso di danno fogliare: numero di foglie danneggiate/foglie totali (Fd);
- numero di insetti masticatori per pianta (Pf).

Da da Marzo a Luglio 2017 sono stati effettuati 32 scan sampling (3 minuti pianta, 2 volte a settimana) per quantificare e descrivere la presenza delle formiche sulle piante. A maturazione è stata effettuata una raccolta dei frutti per ogni pianta registrando:

- numero totale di frutti (baccelli) prodotti (nB);
- indice di sviluppo dei frutti: frutti sviluppati/ frutti prodotti (sB);
- numero di semi prodotti (nS);
- tasso di semi vitali: semi vitali/totale semi (sV);
- seed mass: peso dei semi vitali (pS);
- numero di insetti predatori dei semi (nP);
- tasso di danneggiamento: numero di semi danneggiati / semi vitali (nSd).

In seguito alla raccolta, i semi sono stati stoccati per un periodo di osservazione di circa 20 giorni per valutare l'eventuale presenza di coleotteri nei semi.

3.4.2 Definizione delle categorie

- sB: consideriamo frutti completamente sviluppati, baccelli con semi privi di deformazioni e danni (Fig 2.6 B); non formati, i frutti di ridotte dimensioni, avvizziti con assenza di semi, o presenza di semi non sviluppati all'interno (Fig 3.6 C);
- nS: consideriamo i semi presenti all'interno dei frutti sviluppati. Classifichiamo vitali, semi in grado di germinare di dimensioni superiori a 1 cm, con assenza di lesioni o malformazioni (Fig 3.6 D). Definiamo semi non vitali, tutti i semi non in grado di geminare, pari o inferiori agli 1 cm, con alterazioni morfologiche (avvizzimento, alterazione della superficie e malformazioni) (Fig 2.6 E). Per distinguere le categorie è stato effettuato un test di germinabilità, n= 60 semi (30 per categoria) sono stati coltivati in celle termostate con la stessa quantità di acqua (2 volte a settimana per 15 giorni), T= 24°C con ciclo giorno notte 16/8 h;

- nP: larve e insetti presenti all'interno dei semi o dei baccelli in seguito alla raccolta (Fig 3.7 F);
- nSd: definiamo tutti i semi con presenza di fori e rimozione di materiale interno, evidenza di una predazione (Fig 3.7 G).

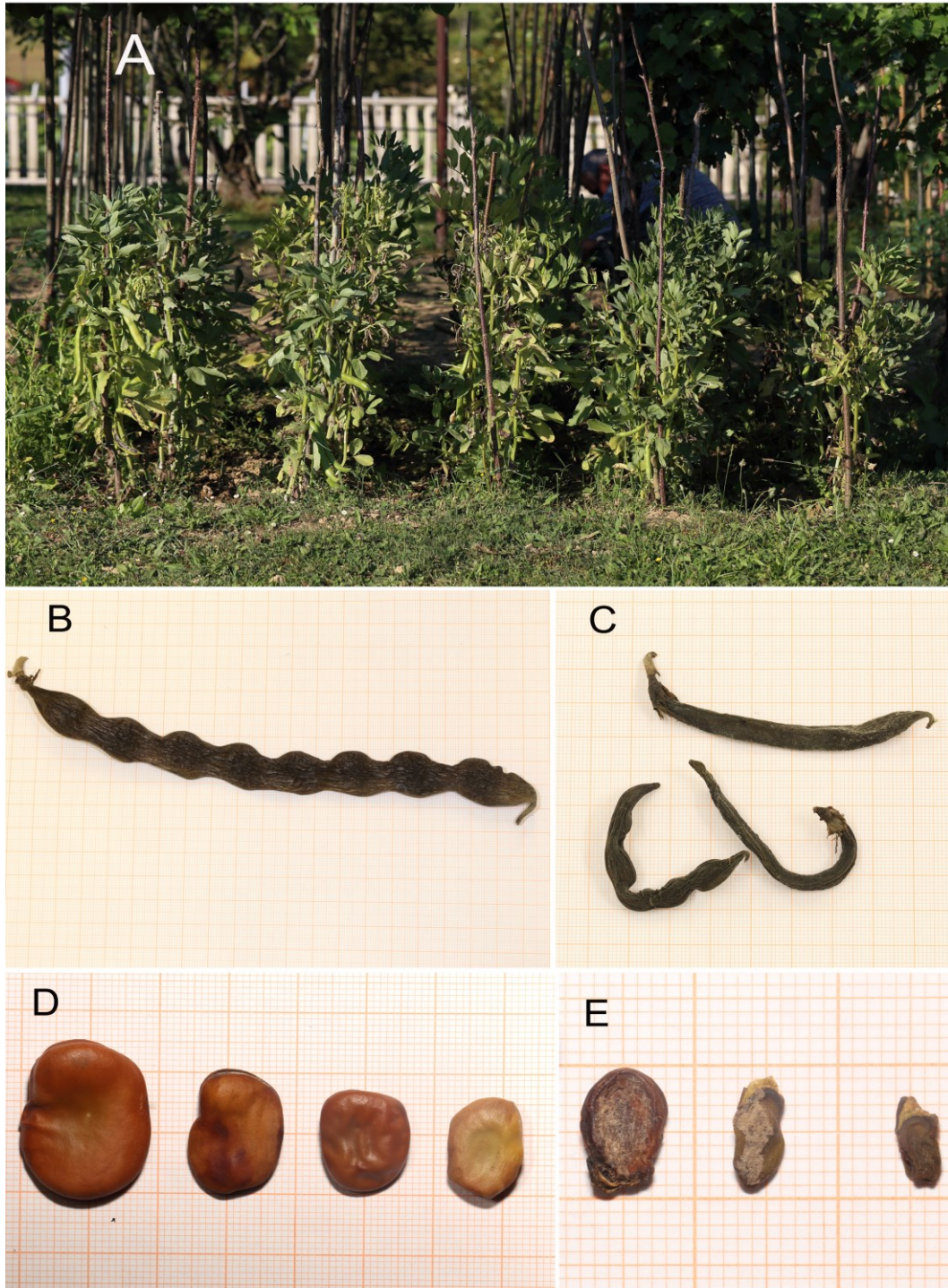


Fig 3.6 A) Coltivazione (parcella n°1) di *V. faba* in campo; B) frutti formati; C) frutti non formati; D) semi vitali privi di deformazioni e danni da insetti; E) semi non vitali.

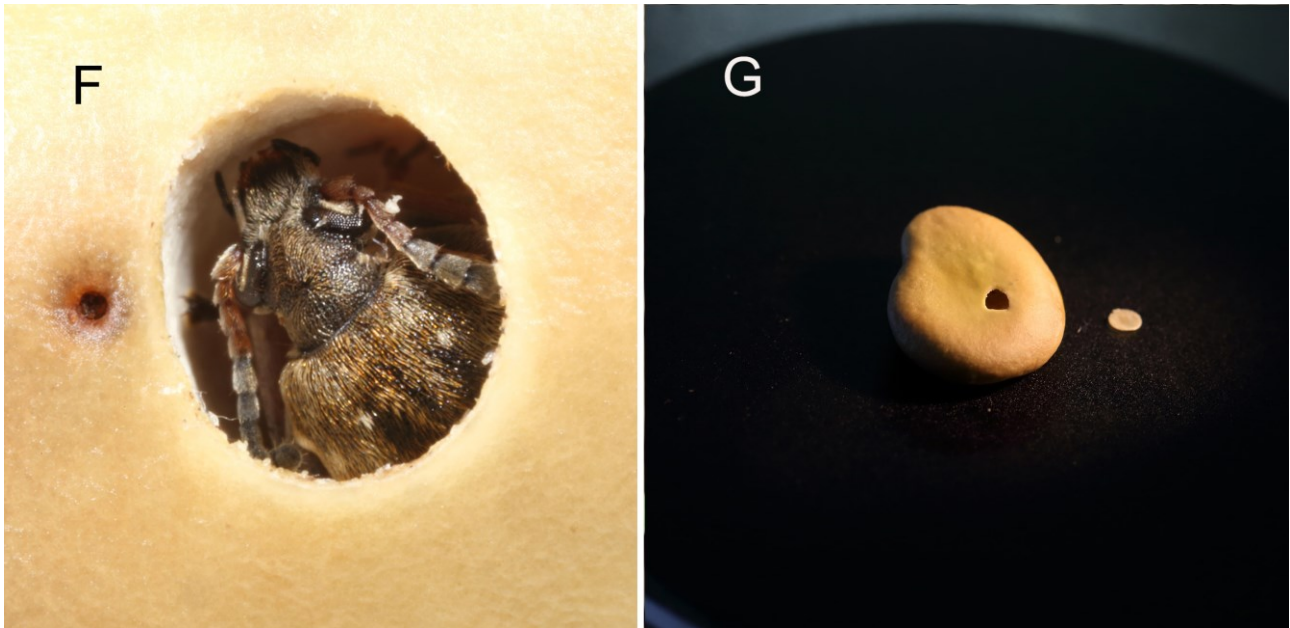


Fig 3.7 F) coleotteri presenti nei semi o nel baccello; G) seme di *V. faba* dopo l'uscita del coleottero.

3.4.3 Analisi statistica sugli esperimenti di *V. faba*

Per categorie nB, sB, nS, sV, pS, nP e nSd in funzione della presenza/assenza di formiche, è stata effettuata una analisi multivariata (MANOVA) per valutare complessivamente l'effetto dei trattamenti. Ogni variabile (nB, sB, nS, sV, pS, nP e nSd) è stata analizzata singolarmente in funzione del trattamento mediante una analisi della varianza (one-way ANOVA) per valutare gli effetti della presenza delle formiche. Per le categorie Fd, sB, sV e nSd è stata effettuata una trasformazione dei dati secondo la formula: $X = \arcsen(\sqrt{x})$, dove con x indichiamo il rapporto da calcolare. Tutte le analisi sono state effettuate mediante il programma IBM SPSS 14.0 (pacchetto Windows). Dalle analisi sono state escluse piante danneggiate o con presenza di consistenti danni dovuti ad agenti atmosferici.

3.5 Risultati degli esperimenti su *V. faba*

Sono state analizzate 74 piante. Dal numero iniziale di 100, sono state escluse 26 piante a causa di danni subiti a seguito di intensi eventi metereologici. Gli scan sampling hanno evidenziato 5 specie di formiche presenti sulle piante di *V. faba* liberamente accessibili: *Crematogaster scutellaris* è risultata la specie più abbondante presente sul 59% delle piante, *Lasius emarginatus* sul 17%, *Plagiolepis pygmaea* sul 10%, *Pheidole pallidula* sul 9%, *Camponotus vagus* sul 5%.

Per le componenti Fd (il numero di foglie danneggiate/ foglie totali) e Pf (il numero di insetti masticatori per ogni pianta) dopo un mese dalla germinazione, abbiamo evidenziato danni

consistenti sui margini fogliari delle piante con assenza di formiche (Fig 3.8 B) rispetto alle piante con formiche (Fig 3.8 A). Le analisi statistiche hanno evidenziato una differenza statisticamente significativa tra i trattamenti (ANOVA: $F_{(1,72)} = 253,1$; $p < 0,001$), con una diminuzione del numero di foglie danneggiate in presenza delle formiche (Fd: con formiche $0,15 \pm 0,051$; senza formiche $1,28 \pm 0,048$ se) (Fig 3.9 C). E' stato inoltre rilevato un effetto significativo del trattamento sul numero di insetti masticatori presenti sulle piante (*Sitona spp.*). (ANOVA: $F_{(1,72)} = 38,48$; $p < 0,001$); Le analisi evidenziano una riduzione significativa di insetti defogliatori in piante con presenza di formiche (Pf : con formiche $0,21 \pm 0,09$ se; senza formiche $1,6 \pm 0,20$ se) (Fig 3.9 D).

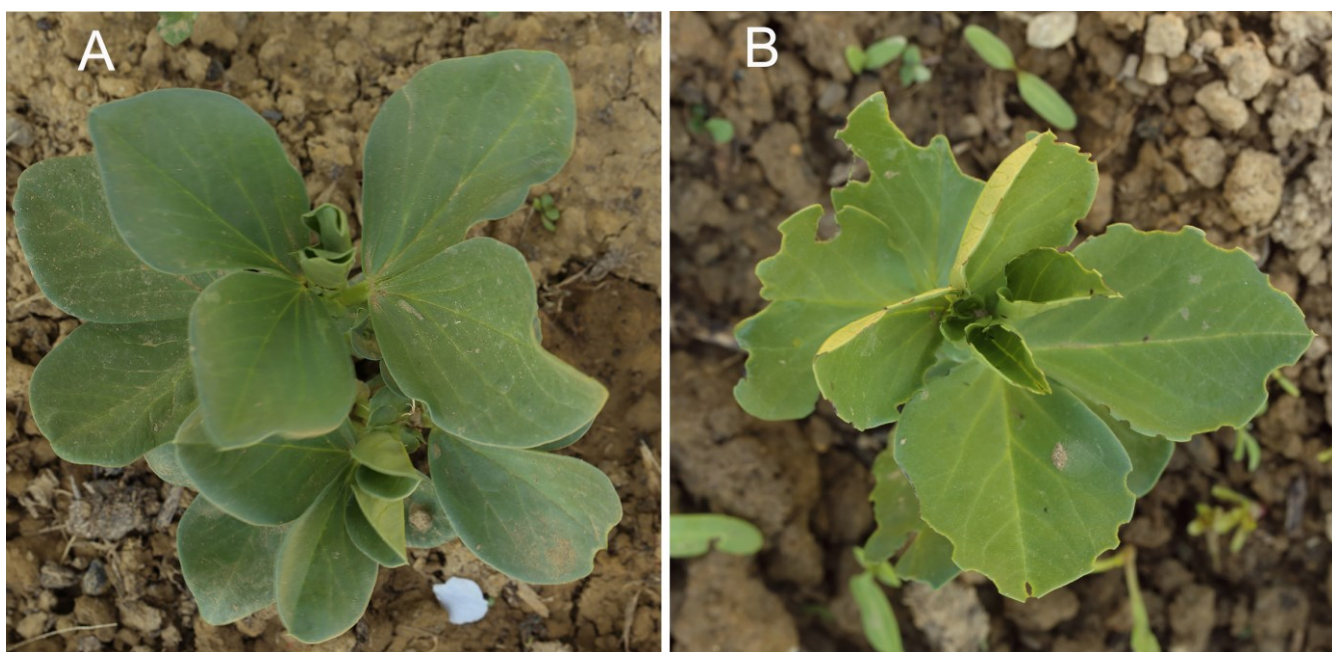


Fig 3.8 Piante di *V. faba* dopo un mese dalla germinazione: A) in presenza di formiche; B) in assenza di formiche.

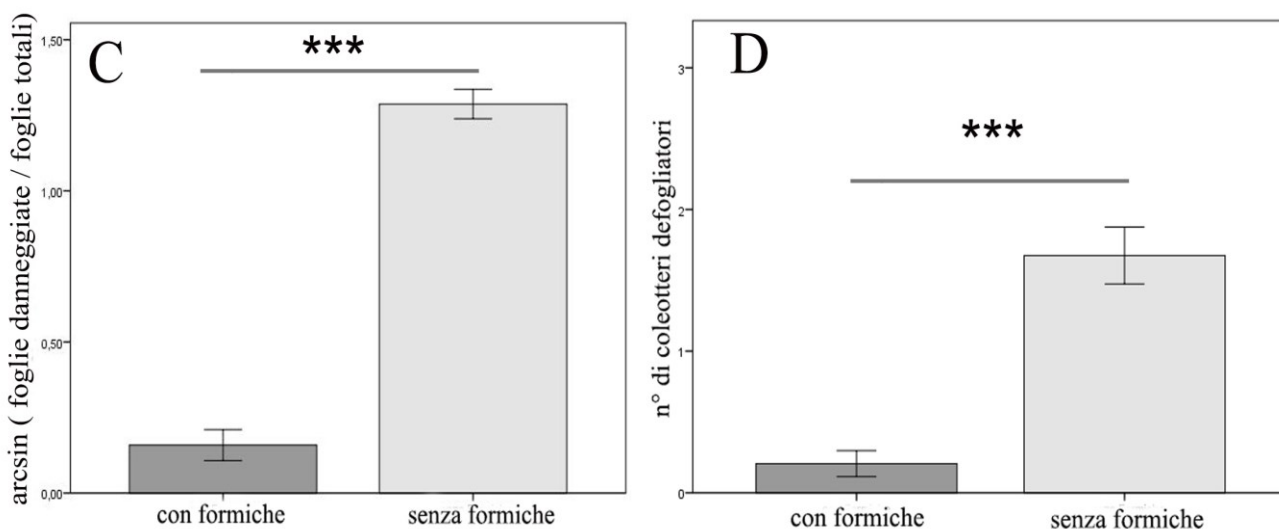


Fig 3.9 Effetti dopo un mese dalla germinazione in piante di *V. faba*. In ascissa sono presenti i trattamenti (con formiche e senza formiche). I grafici indicano: C) il numero medio di foglie danneggiate (arcsin x); D) numero medio di coleotteri defogliatori. Le barre presenti negli istogrammi indicano i valori medi per ogni parametro analizzato (\pm errore standard, one-way Anova). Le analisi statistiche evidenziano una differenza altamente significativa tra i trattamenti (***) ($p < 0,001$).

L'analisi multivariata sulle componenti nB, nS, sV, pS sB, nP e nSd evidenzia una differenza statisticamente significativa tra i trattamenti (MANOVA: $V = 0,61$, $F_{(9,64)} = 11,11$; $p < 0,001$). Tale risultato indica un effetto positivo esercitato delle formiche sui parametri inerenti la fitness della pianta. I risultati delle analisi condotte sulle singole categorie riportati qui di seguito descrivono:

- **nB** (numero di frutti prodotti $n = 295$): non sono state registrate differenze statisticamente significative tra i trattamenti in presenza e assenza di formiche (ANOVA: $F_{(1,72)} = 0,6$; $p = 0,44$; con formiche $3,7 \pm 0,27$ se; senza formiche $4,1 \pm 0,32$ se) (Fig 3.10 A);
- **sB** indice di sviluppo dei frutti (frutti sviluppati/totale frutti prodotti): la analisi ha evidenziato una differenza significativa tra i trattamenti (ANOVA: $F_{(1,72)} = 20,63$ $p < 0,001$), con un numero maggiore di frutti sviluppati in piante con formiche ($1,50 \pm 0,03$ se) rispetto a piante senza formiche ($1,10 \pm 0,07$ se) (Fig 3.10 B);
- **nS** (numero di semi prodotti $n = 1039$): le analisi evidenziano una differenza significativa tra i trattamenti nel numero di semi prodotti (ANOVA: $F_{(1,72)} = 40,9$ $p < 0,001$) (Fig 3.10 C). Infatti, le piante con presenza di formiche producono un numero maggiore di semi ($18,15 \pm 1,02$ se) rispetto a piante prive di formiche ($10,55 \pm 0,68$ se);
- **sV** percentuale di semi vitali (semi vitali/totale semi prodotti): le analisi non hanno evidenziato differenze statisticamente significative tra i trattamenti nella percentuale di semi vitali (ANOVA: $F_{(1,72)} = 1,50$ $p = 0,229$; con formiche $1,48 \pm 0,02$ se; senza formiche $1,41 \pm 0,03$ se) (Fig 3.10 D);
- **pS** seed mass (peso dei semi vitali $n = 994$): le analisi hanno dimostrato nuovamente una differenza altamente significativa tra i trattamenti (ANOVA: $F_{(1,72)} = 16,9$; $p < 0,001$). Questo evidenzia la presenza di semi mediamente più grandi in presenza delle formiche (mg $1,01 \pm 0,47$ se) rispetto a piante con assenza di formiche (mg $0,72 \pm 0,05$ se) (Fig 3.10 E);

A seguito della raccolta e controllo dei baccelli abbiamo individuato larve e coleotteri del genere *Bruchus spp.* presenti all'interno dei baccelli e all'interno dei semi.

- **nP**: (numero di insetti predatori dei semi/ semi vitali): le analisi hanno evidenziato nuovamente, una differenza altamente significativa tra i trattamenti (ANOVA: $F_{(1,72)}=27,9$; $p < 0,001$); registrando un numero inferiore di insetti nelle piante con presenza di formiche ($0,04 \pm 0,01$ se), rispetto a piante con assenza di formiche ($0,44 \pm 0,06$ se) (Fig 2.10 F). In relazione al numero di insetti predatori, la analisi sulla percentuale di semi danneggiati nella categoria **nSd** (numero di semi danneggiati dai predatori/ semi vitali $n = 171$), ha dimostrato una differenza altamente significativa tra i trattamenti (ANOVA: $F_{(1,72)}= 19,4$; $p < 0,001$). Anche in questo caso abbiamo registrato una minore percentuale di semi danneggiati in presenza delle formiche ($0,21 \pm 0,03$ se), rispetto a piante con assenza di formiche ($0,64 \pm 0,08$ se) (Fig 3.11 G).

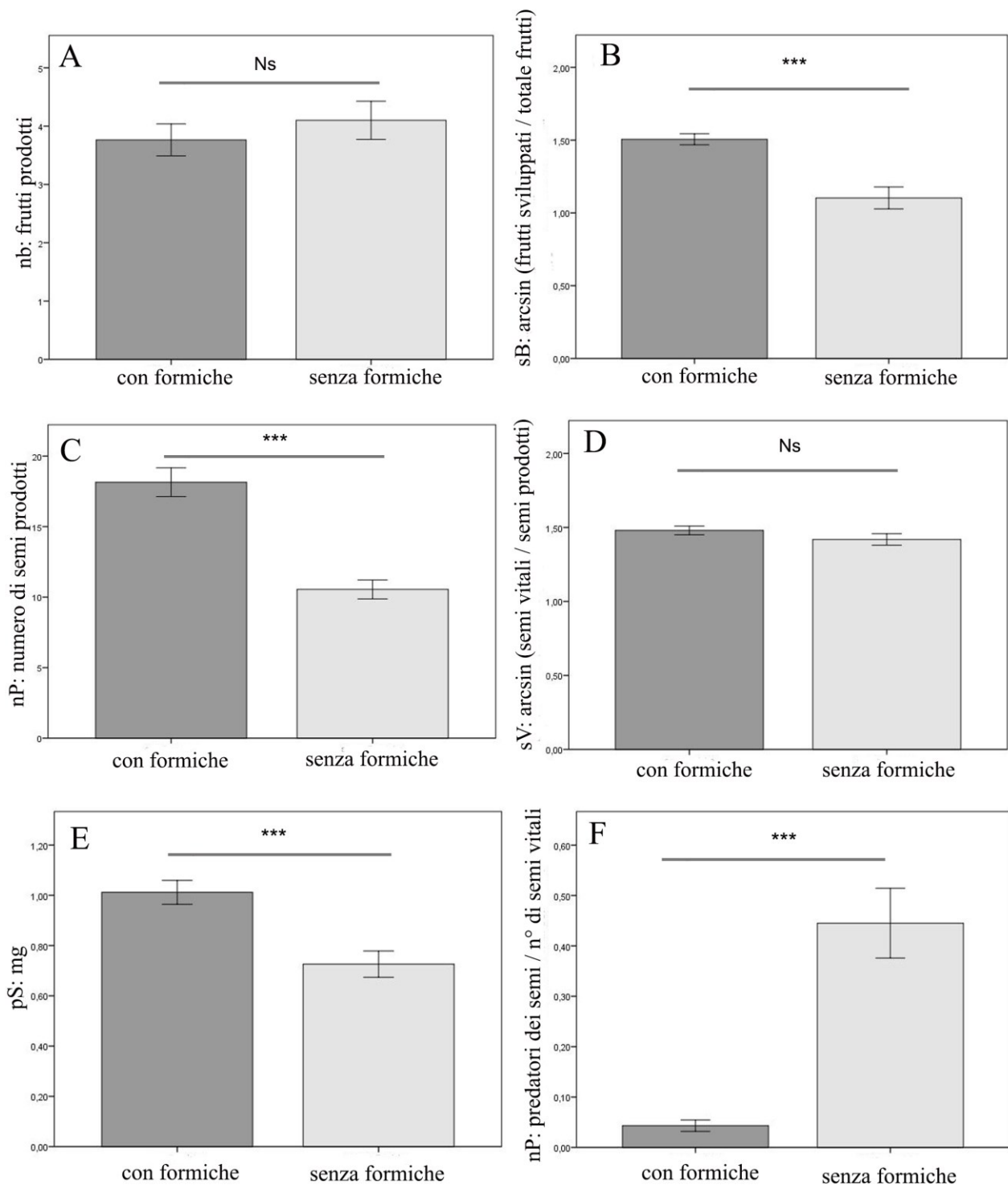


Fig 3.10 Effetti del trattamento (con formiche/ senza formiche) sui parametri relativi alla fitness della piante di *V. faba*. Le barre presenti negli istogrammi (\pm errore standard, one-way Anova) indicano i valori medi per ogni parametro analizzato: A) numero di frutti prodotti, B) arcsin frutti sviluppati/totale frutti prodotti, C) numero di semi prodotti, D) arcsin semi vitali/totale semi prodotti, E) peso dei semi vitali, F) numero di insetti predatori dei semi/ semi vitali G) numero di semi danneggiati / semi vitali. Per i parametri B/C/E/F le analisi statistiche evidenziano una differenza altamente significativa tra i trattamenti (***; $p < 0,001$); per i parametri A/D non sono state evidenziate differenze statisticamente significative tra i trattamenti (cfr. parag 3.5).

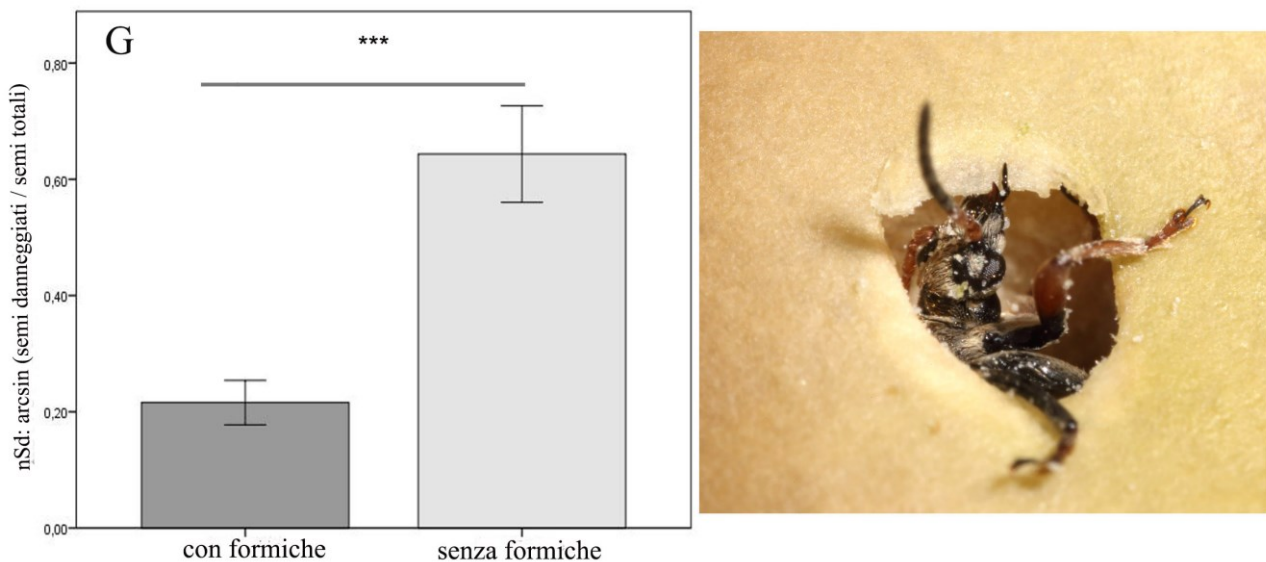


Fig 3.11 L'istogramma descrive i risultati per la variabile nSd : arcsin (semi danneggiati/ semi vitali). Le barre presenti nell'istogramma (\pm errore standard, one-way Anova) indicano il numero medio di semi danneggiati dai predatori in funzione del trattamento (formiche/senza formiche). Gli asterichi indicano il livello di significatività (***, $p < 0,001$) (cfr. parag 3.5).

3.6 Discussione e conclusioni

I risultati degli esperimenti evidenziano, per entrambe le specie vegetali utilizzate, un effetto positivo dovuto alla presenza delle formiche che si manifesta in un miglioramento di alcuni parametri correlati con la fitness della pianta. L'azione di difesa delle formiche si manifesta precocemente nella vita della pianta, portando ad una diminuzione del numero di predatori fogliari in una fase di maggiore vulnerabilità dello sviluppo. Sulle piante sono state identificate differenti specie di formiche. Come descritto in precedenti esperimenti (rif cap 1) *Crematogaster scutellaris* è risultata la specie più abbondante sulle piante. Grazie alle sue caratteristiche di polidomia, con colonie che possono raggiungere anche le 5000 unità questa specie è in grado di colonizzare ambienti diversi (Casevitz, 1972).

Il numero di baccelli prodotti da *V. faba* non risulta significativamente differente tra i trattamenti (presenza/assenza di formiche) a differenza di quanto riscontrato in *V. sativa*. Tale risultato tuttavia, potrebbe essere influenzato da un numero ridotto di campioni analizzati ($n=24$) e da una bassa variabilità nella produzione di frutti da parte delle piante di *V. sativa*.

Per quanto riguarda *V. faba*, la differenza nel rapporto tra il tasso di sviluppo dei frutti, risulta altamente significativa tra i trattamenti. Ciò vuol dire che le piante cresciute in presenza delle formiche aumentano le loro potenzialità riproduttive. Nel caso di *V. sativa* non è stata registrata una differenza significativa tra i trattamenti nel tasso di sviluppo dei frutti. Tuttavia considerando il numero totale di semi prodotti, è evidente un effetto della presenza delle formiche sulla qualità dei

semi, con una percentuale maggiore di semi vitali. Nel caso di *V. faba* tale effetto risulta invertito con un differenza significativa nel numero totale di semi prodotti ed un risultato non significativo tra i trattamenti nel tasso di semi vitali. Anche in questo caso il risultato può essere ricondotto a peculiarità nella fisiologia della pianta e a meccanismi compensativi; *V. faba* è, infatti, in grado di adattarsi a scarsità di acqua in diversi stadi di sviluppo, mantenendo comunque una ottima produttività di semi (Mwanamwenge et al, 1999).

Per quanto riguarda il parametro “peso dei semi”, l’effetto dei trattamenti è evidente per entrambe le piante. L’azione positiva esercitata dalle formiche fin dalle prime fasi di crescita delle piante, può aver influito favorendo un aumento della crescita dei semi. L’analisi dei frutti e dei semi ha evidenziato per entrambe le specie una diminuzione del numero di larve e coleotteri presenti, evidenziando una consistente azione di protezione da parte delle formiche. Tale difesa potrebbe essere di tipo attivo o passivo. Infatti, i dati in letteratura su modalità di accoppiamento e ovideposizione riguardano in modo particolare il coleottero bruchide *Bruchus pisorum*, considerato una specie invasiva di interesse economico a livello mondiale a causa dei suoi danni. Dopo l’accoppiamento e l’ovideposizione sui baccelli da parte delle femmine, le larve una volta schiuse penetrano nei semi e si sviluppano al loro interno nutrendosene. Tale modalità criptica ne impedisce il monitoraggio, rendendo necessari trattamenti chimici sui semi (Mendesil, 2016). Come accade in altri casi, le formiche, grazie alla loro presenza e attività di pattugliamento diffusa sulla pianta potrebbero interferire predando le femmine o, disturbandole al momento della ovideposizione (Grasso et al, 2015). Ulteriori evidenze sperimentali sulla pianta mirmecofita *Macaranga triloba* mostrano una consistente azione di protezione da parte della specie *Crematogaster borneensis*, caratterizzata anche da una pulizia e rimozione delle uova di insetti sulle foglie (Fiala et al, 1989). Varie specie di coleotteri del genere *Apion* in Europa sono considerate dannose per i semi di differenti specie di piante e, pertanto, di grande interesse economico per i loro danni anche sulle derrate alimentari. In modo analogo, è possibile che anche su *V. sativa* le formiche presenti sulle piante possano aver agito con azioni di disturbo, predazione o mediante azioni dirette di pulizia (Grasso et al, 2015). Pertanto, difendendo le piante e garantendo loro un numero maggiore di semi vitali, le formiche influenzano significativamente la loro fitness. Nel lungo cammino evolutivo di insetti e piante numerosi insetti fitofagi hanno sincronizzato il loro ciclo vitale con quello delle piante ospiti. In molti casi proprio nei riguardi delle Fabaceae, differenti insetti (Curculionidae e Chrysomelidae) hanno sincronizzato il loro ciclo di sviluppo facendo coincidere il termine con la fase di deiscenza dei semi. In alcune specie i semi sono infatti eiettati a distanza delle piante grazie ai meccanismi di apertura dei frutti e, nel caso in cui siano presenti, con essi anche i coleotteri al loro interno (Rodriguez et al, 2012). Cibandosi dell’interno dei semi i coleotteri li inattivano o li

distruggono impedendone la germinazione. Agendo sulle fasi precedenti la dispersione di seme, le formiche ne garantiscono quindi l'integrità, condizione essenziale per la futura germinazione.

CAPITOLO 4

Studio sulle interazioni tra formiche e piante mirmecofile: il caso di *Crematogaster scutellaris* (Hymenoptera; Formicidae) e *Vicia faba* (Fabales; Fabaceae)

4.1 Introduzione e scopo

Gli esperimenti in campo (cfr. cap3) hanno dimostrato un consistente effetto protettivo e una influenza da parte delle formiche su alcuni parametri inerenti la fitness delle piante di *Vicia faba*. Abbiamo scelto questa pianta come modello per ulteriori esperimenti volti a chiarire l'interazione con le formiche. Mediante esperimenti in laboratorio abbiamo analizzato l'interazione con la specie *Crematogaster scutellaris* per valutare possibili influenze sul comportamento delle formiche a seguito dell'assunzione di nettare extrafiore. *C. scutellaris* è stata scelta come specie modello per lo studio di queste relazioni poiché dagli studi sul campo (cfr. Cap2; Cap 3) è risultata la specie più abbondante nelle aree di studio e quella che con maggiore frequenza interagiva *V. faba*. In Italia la specie risulta ubiquitariamente distribuita su tutto il territorio. Presenta una grande flessibilità nella fondazione delle nuove colonie e nella costruzione del nido (Soria et al, 1994) Si rinviene in vari ambienti, dai muri alle rocce friabili (Forel et al, 1875), al legno marcescente o attaccato da funghi (Soria et al, 1994). Può nidificare sugli alberi senza danneggiarli entrando in stretta relazione con molte specie vegetali come pini e querce (Saulie, 1956, 1961; Casevitz, 1972). Da studi sulla dieta le operaie trasportano al nido sostanze zuccherine e porzioni solide derivanti dalla predazione di piccoli invertebrati, a organismi morti nell'ambiente circostante (Villagran et al, 1992; Santini et al, 2007). Il genere *Crematogaster* spesso rientra in complesse reti multitrofiche poiché instaura relazioni con afidi e con numerose piante mirmecofite e mirmecofile in tutto il mondo. Particolari specie hanno una importanza essenziale per gli organismi vegetali con cui stabiliscono rapporti mutualistici. Tra queste *Crematogaster mimosae* e *Crematogaster nigriceps* che, grazie alla loro attività sulle piante portano ad una riduzione degli insetti masticatori, favorendo un incremento del tasso fotosintetico fogliare di oltre il 30% rispetto a piante non pattugliate (King et al, 2010). Pertanto, in questa parte della ricerca sono stati valutati gli effetti dell'assunzione del nettare extrafiore su vari aspetti del comportamento delle formiche. Ciò allo scopo di verificare se vi siano elementi di manipolazione delle formiche nella relazione con la pianta. In particolare ci si è rivolti agli effetti su:

- a) grado di aggressività espressa dalle formiche nei confronti di possibili insetti fitofagi e di altre specie di formiche competitori, espressione di un potenziamento dell'azione difensiva delle formiche;
- b) parametri comportamentali relativi all'attività locomotoria. Ciò potrebbe essere connesso ad una manipolazione dei movimenti delle formiche per potenziarne l'attività esploratoria sulla pianta, con conseguente miglioramento delle prestazioni nella difesa;
- c) risposte a stimoli sociali (trail-following);

Sulle piante inoltre, è stato valutato l'effetto delle interazioni con le formiche, mediante l'analisi di differenti parametri legati al benessere e alla produzione di nettare extrafioreale.

4.2 Materiali e metodi (I)

4.2.1 Allevamenti e coltivazione delle piante in laboratorio

Per gli esperimenti sono stati utilizzati frammenti da 10 colonie di *C. scutellaris* composti da 200 individui. Le colonie sono state prelevate in natura, in alta Toscana nel comune di Villafranca in Lunigiana e presso il campus dell'Università di Parma. Le porzioni di colonie sono state collocate in contenitori di plastica (Ø: 20 cm; H: 10.5 cm) in presenza di alcuni grammi di materiale vegetale e porzioni di nido prelevate in natura assieme ad un dispenser di acqua. Le colonie sono state prelevate 48 ore prima di ogni esperimento e mantenute in cella termostata ad una temperatura di 23/24°C, con un ciclo giorno notte di 16/8h. Prima di essere sottoposte a test, le formiche sono state mantenute prive di alimentazione per almeno 24 ore. Come le coltivazioni in campo (rif cap3), per la coltivazione di *V. faba* in laboratorio sono stati utilizzati semi provenienti da agricoltura biologica (Symbiosys; Specie FA00015; Varietà Aguadulce Supersimonia; Rif.C/S-Lotto AF0665). I semi sono stati collocati singolarmente in vasetti in plastica rigida del diametro di 10,5 cm. Per la coltivazione è stato utilizzato terreno universale (Compo Sana Universal Soil). Le piante sono state coltivate in celle termostate con una temperatura compresa tra i 23-24°C. Per l'illuminazione artificiale sono state utilizzate lampade fitostimolanti con ciclo giorno notte 16/8 h. È stata effettuata una irrigazione manuale fornendo ad ogni pianta settimanalmente circa 600 ml di acqua. Per saggiarne l'aggressività, abbiamo utilizzato *Halyomorpha halys* (Hemiptera; Pentatomidae), un insetto fitofago di grande rilevanza in agronomia per i suoi danni a differenti colture (Maistrello et al, 2014, 2016a). Gli individui impiegati negli esperimenti sono stati allevati in laboratorio a partire da ovature prelevate in natura. Le cimici sono state allevate in contenitori areati (20cmx30cm) con dispenser di acqua e nutrite con ortaggi (carote, zucchini). Gli allevamenti sono stati mantenuti a 25-26 °C, con un'umidità del 50-55% ed un periodo giorno/notte di 16/8 h (Castracani et al, 2017).

Questo insetto presenta 5 stadi di sviluppo prima di raggiungere lo stadio immaginale (Maistrello et al, 2014). Per il nostro studio sono stati utilizzati individui del 5° stadio di sviluppo.

4.2.2 Effetti dell'assunzione di nettare extrafiore di *V. faba* da parte di *C. scutellaris*

Per valutare gli effetti sull'aggressività delle formiche, abbiamo utilizzato una potenziale preda e specie invasiva di grande interesse mondiale *H. halys* (Maistrello et al, 2014, 2016a, 2016b). In precedenti esperimenti presso il nostro laboratorio, è stata già verificata l'efficacia predatoria di questa formica nei confronti di *H. halys*, suggerendone il possibile utilizzo per la messa a punto di nuovi sistemi di controllo biologico conservativo (Castracani et al, 2017). Oltre a valutare l'aggressività diretta verso una potenziale preda, abbiamo effettuato test di aggressività diretta contro un possibile competitore interspecifico, una specie arboricola presente nello stesso ambiente e che sfrutta le stesse risorse, *Lasius niger* (Linnaeus, 1758). Mediante esperimenti in laboratorio, abbiamo ulteriormente indagato sugli eventuali effetti dovuti all'assunzione di nettare extrafiore analizzando mediante video tracking differenti parametri locomotori:

- distanza percorsa;
- velocità;
- mobilità;
- immobilità;

Le formiche sono state inoltre sottoposte a test per valutare la capacità di rispondere a uno stimolo sociale, rappresentato dal feromone di traccia rilasciato dalle operaie durante le attività di foraggiamento.

Dopo 24 ore di digiuno le arene nido contenenti le formiche sono state collegate ad una seconda arena (Ø: 20 cm; H: 10.5 cm) mediante un tubo trasparente della lunghezza di 10 cm e del diametro di circa 3mm, dove sono state collocate le piante sperimentali (Fig 4).

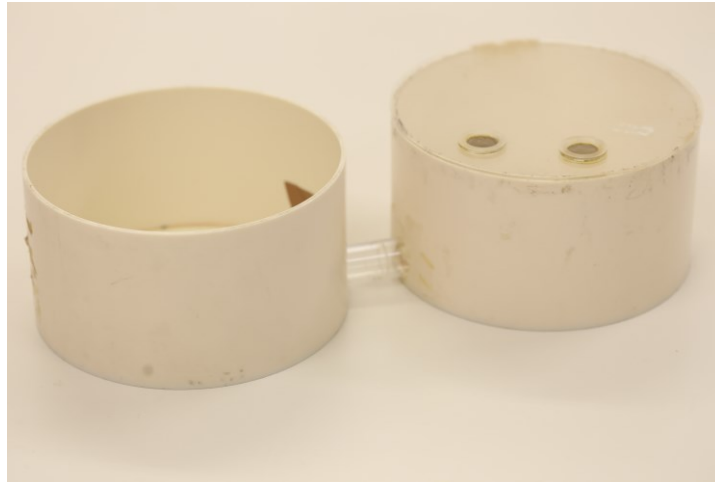


Fig 4 Arene sperimentali.

Per gli esperimenti sono state utilizzate piante di 10 giorni dal momento della germinazione. Alle formiche è stato fornito un accesso selettivo sulle piante mediante una pedana in legno (20cmx3cm). I test sono stati effettuati su formiche sottoposte a tre trattamenti di seguito descritti:

- 1) Formiche che si sono nutrite dai nettari per almeno 2 minuti;
- 2) In arena sono state inserite piante con nettari extraflorali schermati mediante carta di alluminio. In corrispondenza dei nettari mediante micro-capillari sono stati collocati 2 microlitri di soluzione a base di miele e acqua. Per gli esperimenti sono stati utilizzati soggetti che si sono nutriti per almeno 2 minuti dalla soluzione zuccherina;
- 3) Il terzo assetto sperimentale prevedeva accesso a piante con nettari schermati, senza fornire una fonte alimentare alternativa. Per gli esperimenti sono stati utilizzati individui che avevano accesso alle piante e le pattugliavano per il tempo di 1 minuto;

Le formiche marcate venivano reinserite nell'arena nido per 10 minuti prima di essere sottoposte a test. Per valutare gli effetti a seguito dell'assunzione di nettare extraflorale da parte delle formiche abbiamo effettuato esperimenti volti a chiarire differenti aspetti legati al comportamento come:

- aggressività;
- parametri locomotori;
- risposta a stimoli sociali;

4.2.3 Esperimenti di aggressività

- A) Aggressività diretta verso un insetto fitofago: la cimice *H. halys* (Fig 4.1 A). Per ciascuno dei trattamenti sopra descritti, sono stati testati differenti gruppi ciascuno composto da 5 operaie di *C. scutellaris* per nido (per un totale di 150 individui). I gruppi di formiche sono stati saggiati con singoli individui di *H. halys* allo stadio ninfale V (Fig 4.1B). Per i test sono

state utilizzate apposite arene circolari (fighting box: Ø: 11 cm; H: 1,5cm). Gli individui marcati di *C. scutellaris* sottoposti ai differenti trattamenti, dopo aver trascorso 10 minuti nell'arena nido venivano collocati nelle fighting box. Dopo 1 minuto veniva inserita *H. halys*. Mediante la tecnica del continuous-sampling per 30 minuti sono stati registrati i moduli comportamentali espressi dalle formiche e catalogati secondo un crescente livello di aggressività da 1 a 4 (1: investigazione e interesse; 2, 3, 4: rispettivamente aggressività bassa, media e alta). In particolare sono stati registrati i seguenti moduli comportamentali (numero e durata) di seguito classificati nel livello di aggressività corrispondente:

Livello 1: numero di antennamenti (per antennamento si intende un tamburellamento effettuato con le antenne);

Livello 2: numero di minacce manifestate con (A) sollevamento del gastro (gaster-rising), (B) apertura delle mandibole;

Livello 3: numero di morsi (l'individuo chiude le mandibole su una parte del corpo dell'opponente e poi le riapre);

Livello 4: numero di morsi continuati (l'individuo morde un'altro individuo per almeno 1 minuto). Oltre al numero dei morsi continuati ne è stata quantificata anche la durata.

Gli effetti dell'aggressione delle formiche sul fitofago sono stati studiati tramite l'analisi della curva di sopravvivenza ottenuta mediante 10 scan-sampling da 3 minuti ciascuno (uno ogni ora per le prime 8 ore e in seguito a 24 e 48 ore) durante i quali è stata valutata la condizione della preda.

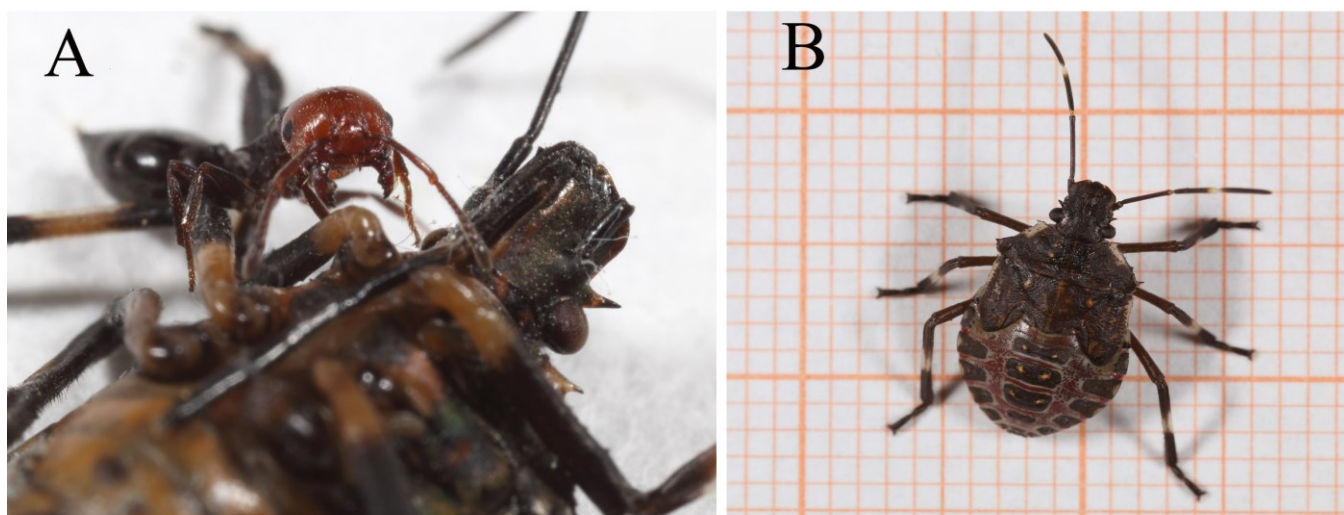


Fig 4.1 A) Attacco da parte di *C. scutellaris* su *H. halys*; B) Stadio ninfale V di *H. halys*.

B) Aggressione diretta verso un competitore interspecifico rappresentato dalla formica *L. niger* (Fig. 4.2 A-B). Per ogni trattamento sono state testate 10 operaie di *C. scutellaris* per nido per un totale di 300 individui. Per i test sono state utilizzate apposite fighting box circolari (\emptyset : 3,5 cm; H: 0,6 cm). Gli individui marcati di *C. scutellaris* sottoposti ai differenti trattamenti e dopo aver trascorso 10 minuti nell'arena nido venivano collocati nelle fighting box. Dopo 1 minuto veniva inserita nell'arena l'operaia di *L. niger*. I test sono stati filmati per 3 minuti e analizzati mediante il software open source Solomon Coder; valutando differenti moduli comportamentali, organizzati secondo un crescente livello di aggressività:

Livello 1) numero di antennamenti;

Livello 2) numero di minacce (A: gaster rising; B: mandibole aperte);

Livello 3) numero di morsi;

Livello 4) A: numero morsi continuati; B: Durata morsi continuati.

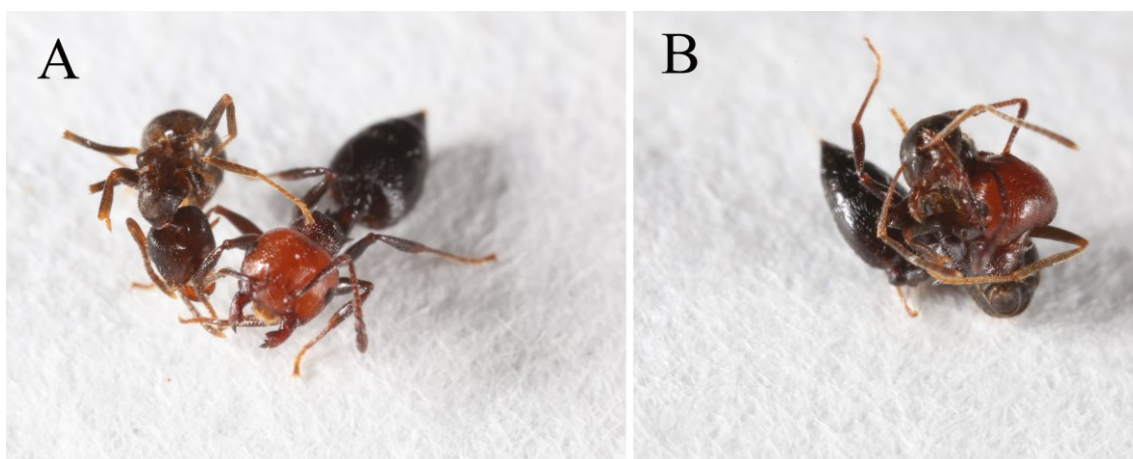


Fig 4.2 A) *C. scutellaris* in contatto con *L. niger*; B) Attacco da parte di *C. scutellaris* a *L. niger* con morso continuato.

4.2.4 Analisi statistiche

I moduli comportamentali sono stati analizzati mediante una analisi della Varianza a una via (one-way ANOVA) in funzione dei tre trattamenti (nettare, miele e nessuna alimentazione), seguiti da test post-hoc di Tukey per evidenziare eventuali differenze tra i gruppi. Per valutare il tasso di sopravvivenza del fitofago (*H. halys*) in funzione dei trattamenti, è stata eseguita una curva di sopravvivenza mediante il test non parametrico di Kaplan-Meier. Tutte le analisi sono state eseguite mediante il software IBM SPSS 24.0 (pacchetto Windows).

4.3 Risultati

4.3.1 Test di aggressività: *Crematogaster scutellaris* vs *Halyomorpha halys*

A) L'analisi dei comportamenti aggressivi manifestati verso *H. halys*, non ha evidenziato differenze significative tra i trattamenti nel numero di antennamenti (ANOVA: $F_{(2,27)} = 0,89$; $p = 0,43$) (Fig. 4.3-1). Per il livello 2 di aggressività le analisi statistiche hanno evidenziato una differenza statisticamente significativa nel numero di gaster-rising (ANOVA: $F_{(2,27)} = 12,48$; $p < 0,001$) (Fig 4.3-2A). In particolare, i soggetti che si sono cibati di nettare o che non hanno ricevuto alimentazione, effettuano un numero maggiore di minacce (gaster raising) rispetto a soggetti che hanno assunto miele (rif Tab 1 post-hoc test). Non è risultato significativo il numero di minacce a mandibole aperte tra tutti i trattamenti (ANOVA: $F_{(2,27)} = 1,52$; $p = 0,23$) (Fig 4.3-2B). L'analisi del livello 3 ha evidenziato una differenza statisticamente significativa nel numero di morsi tra tutti i trattamenti (ANOVA: $F_{(2,27)} = 15,12$; $p < 0,001$). In particolare l'analisi post-hoc mostra la presenza di tre gruppi: il primo composto da soggetti che si sono nutriti di nettare e che compiono un numero più elevato di morsi, rispetto al secondo gruppo con formiche che non si sono nutrite. Il terzo gruppo è composto da formiche che hanno assunto miele, per le quali è stato descritto il minor numero di morsi (Fig 4.3-3) (rif Tab 1). Anche nell'analisi del livello 4, che contempla manifestazioni del più alto livello di aggressività, è stata registrata una differenza altamente significativa fra i trattamenti (ANOVA: $F_{(2,27)} = 28,10$; $p < 0,001$). Abbiamo registrato una frequenza più alta di morsi continuati in formiche che si sono cibate di nettare rispetto a ciascuno degli altri trattamenti (rif Tab 1 post-hoc test) (Fig 3.1-4°). Anche l'analisi della durata dei morsi continuati ha evidenziato una differenza altamente significativa tra tutti i trattamenti (ANOVA: $F_{(2,27)} = 18,55$; $p < 0,001$). In questo caso formiche che si sono cibate di nettare, mantengono il contatto con la preda più a lungo mediante il morso continuato (rif Tab 1 post-hoc test), rispetto a formiche che non sono state nutrite o che si sono nutrite di miele (Fig 4.3-4B).

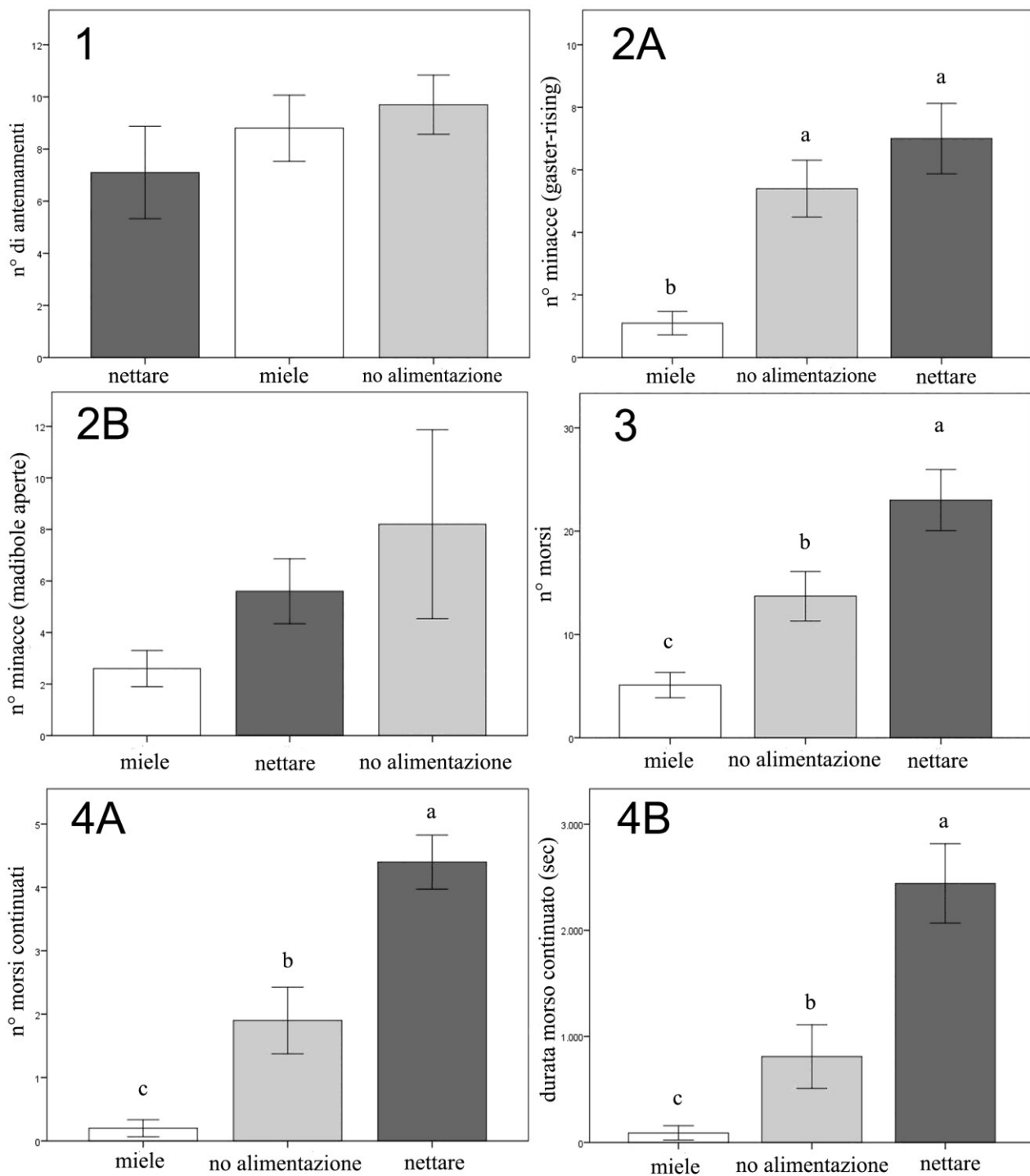


Fig 4.3 Effetti dei trattamenti alimentari sull'aggressività di *C. scutellaris* espressa nei confronti di *H. halys*. Le barre presenti negli istogrammi indicano i valori medi per ogni parametro analizzato (\pm errore standard, one-way Anova). In ascissa è mostrato il confronto tra i trattamenti (nettare, miele, nessuna alimentazione). Le variabili misurate sono organizzate secondo un livello crescente di aggressività 1-4: 1) numero di antennamenti; 2A) gaster-rising; 2B) mandibole aperte; 3) numero di morsi; 4A) morsi continuati; 4B) durata morsi continua. Le lettere presenti sulle barre negli istogrammi rappresentano i risultati del confronto tra i gruppi mediante test post-hoc di Tukey (rif Tab 1). All'interno degli istogrammi barre con lettere uguali non presentano differenze statisticamente significative. Per gli istogrammi 1 e 2B non sono state riscontrate differenze statisticamente significative tra i trattamenti (cfr. paragrafo 4.3.1).

test post-hoc di Tukey							
Variabile dipendente			Differenza fra medie (I-J)	Errore std.	Sig.	confidenza 95%	
						Limite inferiore	Limite superiore
Gaster-rising	nettare	miele	5,900*	1,221	,000	2,87	8,93
		no alimentazione	1,600	1,221	,402	-1,43	4,63
	miele	nettare	-5,900*	1,221	,000	-8,93	-2,87
		no alimentazione	-4,300*	1,221	,004	-7,33	-1,27
	no alimentazione	nettare	-1,600	1,221	,402	-4,63	1,43
		miele	4,300*	1,221	,004	1,27	7,33
Morsi	nettare	miele	17,900*	3,256	,000	9,83	25,97
		no alimentazione	9,300*	3,256	,021	1,23	17,37
	miele	nettare	-17,900*	3,256	,000	-25,97	-9,83
		no alimentazione	-8,600*	3,256	,035	-16,67	-,53
	no alimentazione	nettare	-9,300*	3,256	,021	-17,37	-1,23
		miele	8,600*	3,256	,035	,53	16,67
Morso continuato	nettare	miele	4,200*	,564	,000	2,80	5,60
		no alimentazione	2,500*	,564	,000	1,10	3,90
	miele	nettare	-4,200*	,564	,000	-5,60	-2,80
		no alimentazione	-1,700*	,564	,015	-3,10	-,30
	no alimentazione	nettare	-2,500*	,564	,000	-3,90	-1,10
		miele	1,700*	,564	,015	,30	3,10
Durata morso continuato	nettare	miele	2352,000*	395,613	,000	1371,11	3332,89
		no alimentazione	1632,000*	395,613	,001	651,11	2612,89
	miele	nettare	-2352,000*	395,613	,000	-3332,89	-1371,11
		no alimentazione	-720,000	395,613	,182	-1700,89	260,89
	no alimentazione	nettare	-1632,000*	395,613	,001	-2612,89	-651,11
		miele	720,000	395,613	,182	-260,89	1700,89

Tab 1 Confronti multipli di Tukey inerenti l'analisi dei comportamenti aggressivi manifestati verso *H. halys* in funzione dei trattamenti (nettare, miele, nessuna alimentazione).

Le analisi dello stato delle prede a seguito dei test hanno evidenziato una differenza tra i trattamenti nei tassi di sopravvivenza ($X^2_{(2)} = 138,50$; $p < 0,001$). Formiche che hanno assunto nettare uccidono più rapidamente le cimici; infatti nell'arco delle prime 4 ore di osservazione abbiamo un tasso di sopravvivenza di *H. halys* dello 0%, ovvero ogni preda è stata attaccata e uccisa. Al contrario, per le formiche che non hanno assunto alimenti, alle 4 ore registriamo ancora un tasso di sopravvivenza delle prede del 95%. Si evidenzia un effetto comparabile al nettare solo dopo 8 ore. Infine, nelle arene con formiche che hanno assunto miele, il tasso di sopravvivenza rimane del 100 % fino alle 48 ore. In questo caso le formiche non hanno ucciso le prede (Fig 4.4).

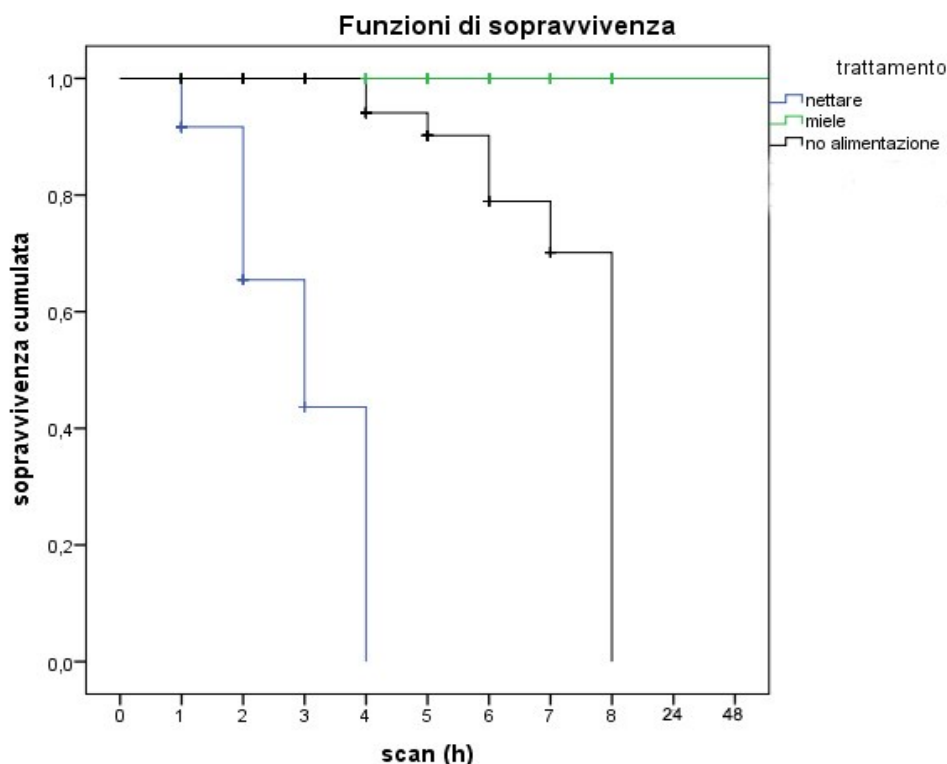


Fig 4.4 Curva di sopravvivenza di *H. halys* sottoposte a test di aggressività con *C. scutellaris*: la curva mostra in ordinata la % di sopravvivenza della preda in funzione dei tre trattamenti a cui sono state sottoposte le formiche (nettare, miele e nessuna alimentazione). In ascissa sono riportati gli scan-sampling in termini di ore dall'inizio dell'esperimento.

4.3.2 Test di aggressività: *Crematogaster scutellaris* vs *Lasius niger*

B) L'analisi dell'aggressività diretta verso *L. niger*, ha evidenziato differenze significative tra i trattamenti nel numero di antennamenti (ANOVA: $F_{(2,293)} = 5,10$; $p = 0,007$). I post hoc test hanno messo in evidenza la presenza di due gruppi distinti (rif Tab 2): il primo composto dalle formiche che hanno assunto nettare o miele e che presenta un numero maggiore di antennamenti, il secondo composto da formiche che non hanno assunto cibo e che presenta un numero minore di antennamenti (Fig 4.5-1). Per il livello 2 di aggressività le analisi statistiche hanno evidenziato una differenza statisticamente significativa tra i trattamenti (gaster rising: ANOVA: $F_{(2,294)} = 3,82$; $p = 0,002$; mandibole aperte: ANOVA; $F_{(2,294)} = 13,54$; $p < 0,001$). I post-hoc descrivono la presenza di due gruppi (rif Tab 2); il primo con formiche che hanno assunto nettare, un aumento dei comportamenti di minaccia; mentre non sono presenti differenze tra gli altri trattamenti (Fig 4.5-2°-2B). La analisi del livello 3 (n°morsi), non ha evidenziato differenze statistiche tra i trattamenti (ANOVA: $F_{(2,294)} = 1,51$; $p = 0,223$). Non sono state evidenziate differenze statisticamente significative tra i trattamenti per livello 4 nel numero di morsi continuati (ANOVA: $F_{(2,294)} = 1,79$; $p = 0,167$) e nella durata (ANOVA $F_{(2,294)} = 1,63$, $p = 0,198$) (Fig 4.54A-4B).

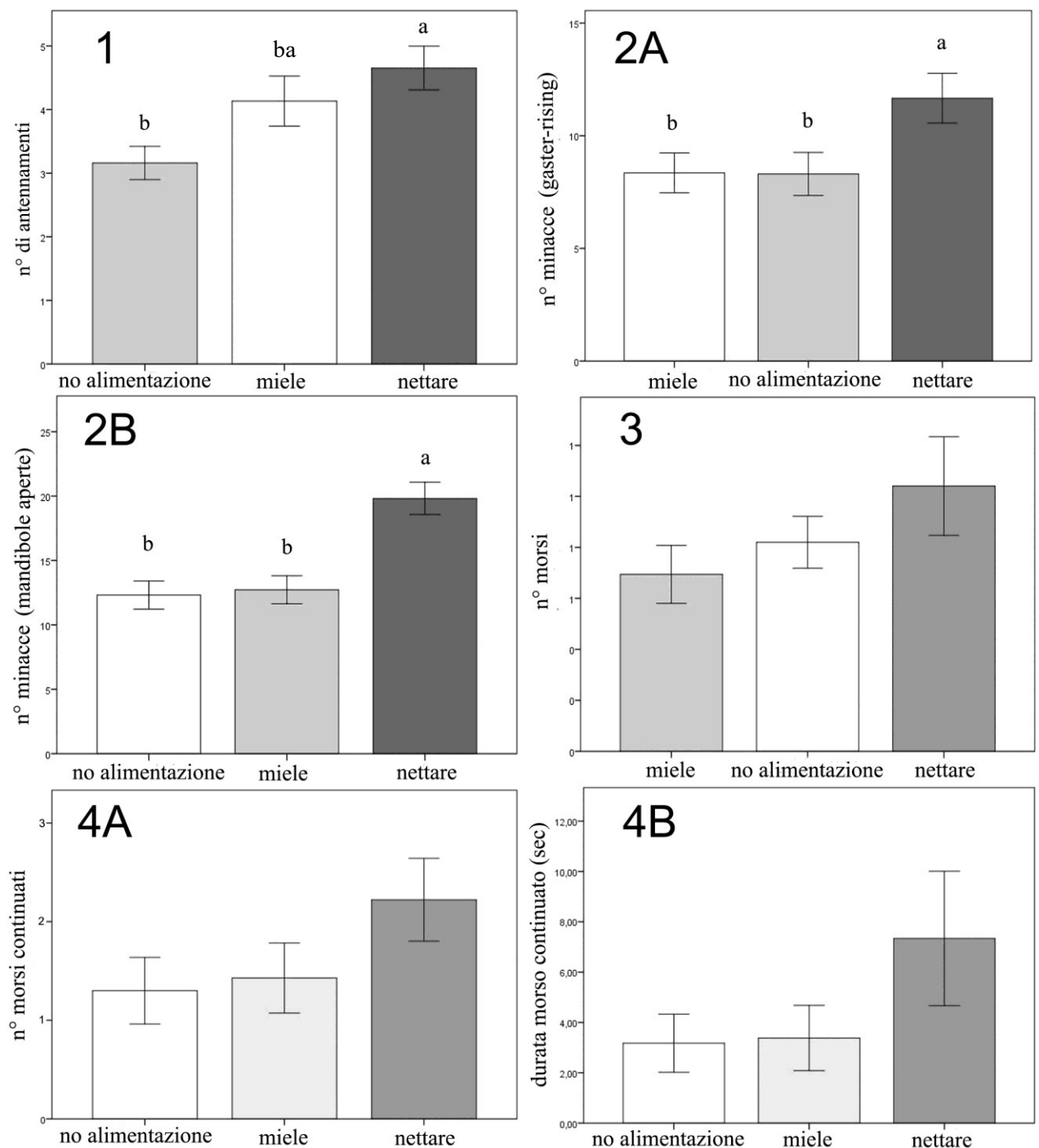


Fig 4.5 Effetti dei trattamenti alimentari sull'aggressività di *C. scutellaris* espressa nei confronti di *L. niger*. Le barre presenti negli istogrammi indicano i valori medi dei parametri analizzati (\pm errore standard, one-way Anova). In ascissa sono indicati i trattamenti (nettare, miele, nessuna alimentazione). Le variabili misurate sono organizzate secondo un livello crescente di aggressività 1-4: 1) numero di antennamenti; 2A) gaster-rising; 2B) mandibole aperte; 3) numero di morsi; 4A) morsi continuati; 4B) durata morsi continuati. Le lettere presenti sulle barre negli istogrammi rappresentano i risultati del confronto tra i gruppi mediante test post-hoc di Tukey (rif Tab 2). All'interno degli istogrammi barre con lettere uguali non presentano differenze statisticamente significative. Per gli istogrammi 3, 4A e 4B non sono state riscontrate differenze statisticamente significative tra i trattamenti (cfr. paragrafo 4.3.2).

test post-hoc di Tukey							
Variabile dipendente			Differenza fra medie (I-J)	Errore std.	Sig.	confidenza 95%	
						inferiore	superiore
Antennamenti	no alimentazione	miele	-,973	,475	,103	-2,09	,15
		nettare	-1,493 [*]	,475	,005	-2,61	-,37
	miele	no alimentazione	,973	,475	,103	-,15	2,09
		nettare	-,520	,478	,521	-1,65	,60
	nettare	no alimentazione	1,493 [*]	,475	,005	,37	2,61
		miele	,520	,478	,521	-,60	1,65
Mandibole aperte	no alimentazione	miele	-,414	1,622	,965	-4,24	3,41
		nettare	-7,508 [*]	1,618	,000	-11,32	-3,70
	miele	no alimentazione	,414	1,622	,965	-3,41	4,24
		nettare	-7,094 [*]	1,626	,000	-10,92	-3,26
	nettare	no alimentazione	7,508 [*]	1,618	,000	3,70	11,32
		miele	7,094 [*]	1,626	,000	3,26	10,92
Gaster-rising	no alimentazione	miele	,044	1,393	,999	-3,24	3,33
		nettare	-3,317 [*]	1,390	,046	-6,59	-,04
	miele	no alimentazione	-,044	1,393	,999	-3,33	3,24
		nettare	-3,361 [*]	1,397	,044	-6,65	-,07
	nettare	no alimentazione	3,317 [*]	1,390	,046	,04	6,59
		miele	3,361 [*]	1,397	,044	,07	6,65

Tab 2 Confronti multipli di Tukey inerenti l'analisi dei comportamenti aggressivi manifestati verso *L. niger* in funzione dei trattamenti (nettare, miele, nessuna alimentazione).

4.4 Materiali e metodi (II)

4.4.1 Effetti dell'assunzione del nettare extrafioreale su parametri locomotori espressi da *C. scutellaris*

Per ciascuno dei trattamenti (nettare, miele e nessuna alimentazione) sono state testate 8 operaie di *C. scutellaris* per nido per un totale di 240 individui. Dopo il trattamento e un periodo di 10 minuti trascorso in arena nido, gli individui marcati sono stati posizionati in arene (20cm x20cm; h= 3cm), con substrato di carta rimovibile dopo ogni esperimento, per escludere contaminazioni chimiche. Sopra l'arena era collocata una videocamera controllata in remoto su cavalletto e due set di luci fredde per garantire una illuminazione omogenea sull'arena. Agli individui posizionati in arena test veniva lasciato un tempo di ambientamento di 1 min prima di essere filmati per 5 minuti. Successivamente, i video sono stati analizzati mediante il software di video tracking Ethovision (Noldus) valutando i seguenti parametri legati alla attività locomotoria: 1) distanza (cm percorsi in arena), 2) velocità lineare (cm/sec), 3) mobilità: tempo trascorso in movimento (sec), 4) immobilità: tempo trascorso ferma (sec).

4.4.2 Analisi statistiche

I parametri locomotori sono stati analizzati mediante una analisi della Varianza a una via (one-way ANOVA) in funzione dei tre trattamenti (nettare, miele e nessuna alimentazione) seguiti da Tukey post-hoc test per una comparazione tra i gruppi. Tutte le analisi sono state eseguite mediante il software IBM SPSS 24.0 (pacchetto Windows).

4.5 Risultati: analisi dei parametri locomotori

Le analisi hanno evidenziato una differenza statisticamente significativa tra i trattamenti nella distanza percorsa (ANOVA: $F_{(2,237)} = 3,52$; $p = 0,03$). I test post hoc di Tukey evidenziano la presenza di due gruppi: il primo composto da formiche che hanno assunto nettare o miele (rif Tab 3) che percorrono una distanza maggiore rispetto a formiche che non hanno assunto alcun cibo (Fig. 4.6-1), e il secondo composto da formiche che non si sono nutrite, che percorrono una distanza minore. Le analisi sulla velocità hanno evidenziato una differenza ai limiti della significativa tra i trattamenti (ANOVA: $F_{(2,237)} = 3,10$; $p = 0,051$) (Fig 4.6-2). I post hoc descrivono la presenza di due gruppi: il primo composto da formiche che hanno assunto nettare e miele è associato a una velocità maggiore rispetto al secondo gruppo composto dalle formiche che non si sono nutrite. Nella analisi della mobilità i risultati evidenziano una differenza significativa tra i trattamenti (ANOVA: $F_{(2,237)} = 3,09$; $p = 0,04$). I post hoc test (rif Tab 3) evidenziano anche in questo caso la presenza di due gruppi: il primo composto da formiche che non si sono nutrite e da formiche che hanno assunto nettare, mostrano valori più alti di mobilità rispetto a formiche che si sono nutrite di miele (Fig 4.6-3). L'analisi della immobilità non ha evidenziato differenze statisticamente significative tra i trattamenti (ANOVA: $F_{(2,237)} = 0,57$; $p = 0,56$) (Fig 4.6-4).

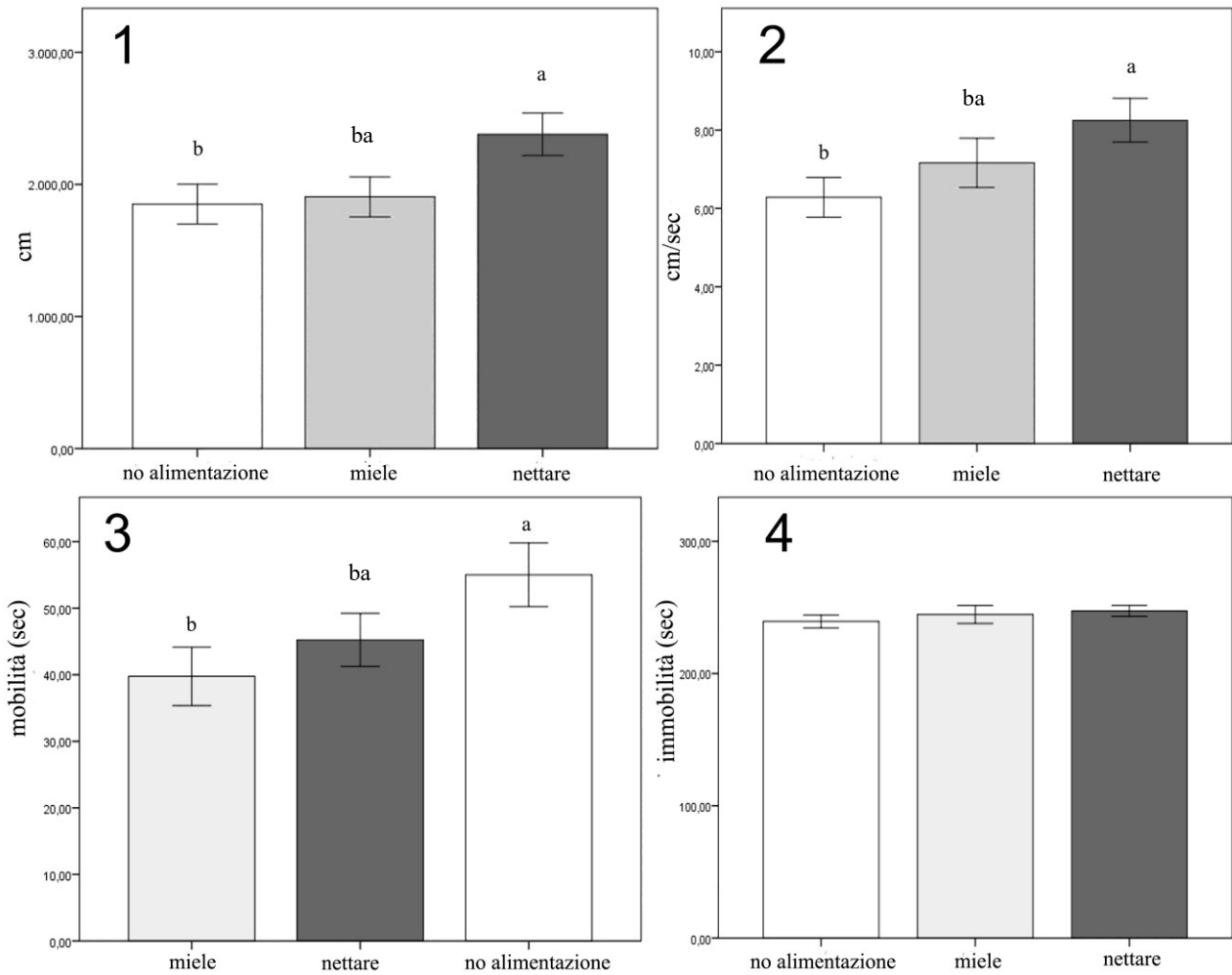


Fig 4.6: Effetti dei trattamenti alimentari sulle variabili locomotorie di *C. scutellaris*. Le barre presenti negli istogrammi indicano i valori medi (\pm errore standard, one-way Anova). Le differenze tra i trattamenti sono state valutate mediante one-way Anova seguita da test di post-hoc di Tukey. Le lettere presenti sulle barre negli istogrammi rappresentano i risultati del confronto tra i gruppi mediante test post-hoc di Tukey. Barre con lettere uguali non presentano differenze statisticamente significative (cfr. Tab3). Per l'istogramma 4 non sono state riscontrate differenze significative tra i trattamenti (cfr. parag 4.5).

test post-hoc di Tukey							
Variabile dipendente			Differenza fra medie (I-J)	Errore std.	Sig.	Intervallo di confidenza 95%	
						Limite inferiore	Limite superiore
Distanza (cm)	nettare	miele	473,66401	218,95216	,080	-42,7421	990,0701
		no alimentazione	529,05849	218,95216	,043	12,6524	1045,4646
	miele	nettare	-473,66401	218,95216	,080	-990,0701	42,7421
		no alimentazione	55,39447	218,95216	,965	-461,0117	571,8006
	no alimentazione	nettare	-529,05849	218,95216	,043	-1045,4646	-12,6524
		miele	-55,39447	218,95216	,965	-571,8006	461,0117
Velocità (cm/sec)	nettare	miele	1,08685	,80308	,367	-,8072	2,9809
		no alimentazione	1,96640	,80308	,040	,0723	3,8605
	miele	nettare	-1,08685	,80308	,367	-2,9809	,8072
		no alimentazione	,87955	,80308	,518	-1,0145	2,7736
	no alimentazione	nettare	-1,96640	,80308	,040	-3,8605	-,0723
		miele	-,87955	,80308	,518	-2,7736	1,0145
Mobilità durata (sec)	nettare	miele	5,48550	6,22236	,652	-9,1902	20,1612
		no alimentazione	-9,76950	6,22236	,261	-24,4452	4,9062
	miele	nettare	-5,48550	6,22236	,652	-20,1612	9,1902
		no alimentazione	-15,25500	6,22236	,040	-29,9307	-,5793
	no alimentazione	nettare	9,76950	6,22236	,261	-4,9062	24,4452
		miele	15,25500	6,22236	,040	,5793	29,9307
Immobilità durata (sec)	nettare	miele	2,70450	7,61567	,933	-15,2573	20,6663
		no alimentazione	7,96800	7,61567	,548	-9,9938	25,9298
	miele	nettare	-2,70450	7,61567	,933	-20,6663	15,2573
		no alimentazione	5,26350	7,61567	,769	-12,6983	23,2253
	no alimentazione	nettare	-7,96800	7,61567	,548	-25,9298	9,9938
		miele	-5,26350	7,61567	,769	-23,2253	12,6983

*. La differenza media è significativa al livello 0.05

Tab 3 Confronti multipli di Tukey inerenti l'analisi dei parametri di movimento in funzione dei trattamenti (nettare, miele, nessuna alimentazione).

4.6 Materiali e metodi (III)

4.6.1 Esperimenti per valutare la risposta a stimoli sociali (trail-following)

Per valutare la risposta a stimoli sociali è stata studiata la capacità da parte delle formiche di reagire in modo adeguato ai feromoni di traccia normalmente utilizzati da questa specie per la marcatura delle piste di foraggiamento. Il feromone di traccia di *C. scutellaris* viene sintetizzato da ghiandole situate nelle tibie delle zampe posteriori (ghiandole tibiali) con sbocco al limite tra tibia e tarso. L'estrazione del secreto ghiandolare è stata effettuata dissezionando tibia e tarso e immergendoli in una soluzione di esano (8 ghiandole x 80 µl di esano). La soluzione è stata mantenuta a 4 °C per 24 ore prima di essere testata. A seguito dei trattamenti (nettare, miele e nessuna alimentazione) dopo il periodo di latenza (10 minuti in arena nido) gli individui marcati sono stati fatti accedere all'arena sperimentale (28 cm x 20 cm; h= 4 cm), con substrato rimovibile per ogni esperimento, in modo da escludere l'effetto di contaminazioni chimiche. All'interno dell'arena è stata tracciata una linea di 15 cm mediante 15µl di soluzione contenente il feromone di traccia. Il test di trail-following veniva considerato positivo se la formica seguiva la traccia artificiale per almeno la metà del percorso marcato (7,5 cm), discostandosi al massimo di 1cm ai lati della linea. Questo in relazione al

movimento effettuato dalle formiche nel seguire le tracce chimiche, caratterizzato da un andamento sinusoidale. I soggetti per i quali il test è risultato negativo, ovvero che non sono stati in grado di seguire la traccia sono stati ri-saggiati a distanza di 2 ore, ciò allo scopo di verificare se l'effetto del trattamento sul trail-following fosse definitivo o temporaneo.

4.6.2 Analisi statistiche

E' stata condotta una analisi della Varianza a una via (one-way ANOVA) in funzione dei tre trattamenti (nettare, miele e nessuna alimentazione), seguita da test post-hoc di Tukey per evidenziare differenza tra i gruppi. Tutte le analisi sono state eseguite mediante il software IBM SPSS 24.0 (pacchetto Windows).

4.7 Risultati inerenti la risposta a stimoli sociali

I test non hanno evidenziato differenza tra i trattamenti. Tutti i soggetti hanno risposto in modo positivo alla pista marcata artificialmente con il feromone di traccia, non evidenziando variazioni comportamentali.

4.8 Materiali e metodi (IV)

4.8.1 Stima degli effetti delle interazioni tra le formiche e le piante su alcuni aspetti della biologia di *Vicia faba* registrati in laboratorio e sul campo

4.8.1.1 Esperimenti in laboratorio

Oltre a valutare i possibili effetti subiti dalle formiche a seguito dell'assunzione di nettare extraflorale, abbiamo studiato gli eventuali effetti sulla fitness della pianta provocati dalla presenza e interazione delle formiche. Per questa analisi abbiamo scelto parametri correlati allo sviluppo della pianta e alla produzione di nettare extraflorale. La coltivazione di piante di *V. faba* in condizioni controllate ci ha permesso di chiarire possibili effetti dovuti all'interazione delle formiche con le piante in assenza di fitofagi nelle fasi successive la germinazione; con particolare riguardo alle strutture che mediano questa interazione e al nettare secreto. Per valutarne i possibili effetti abbiamo misurato: Dimensione delle piante, numero di nettari prodotti, quantità di nettare secreto per pianta, dimensione delle zone secernenti nettare presenti sulle stipole.

Dopo 24 ore dalla germinazione (Fig 4.7) le piante (n=160), sono state collocate in contenitori in plastica rigida (39cmx28cm; h= 14 cm) con terreno universale (Compo Sana Universal Soil). Le arene, contenenti 10 piante ciascuna, sono state connesse ad arene nido (\varnothing : 20 cm; h: 10.5 cm)

ciascuna contenente un frammento di colonia di *C. scutellaris* (200 operaie). In totale sono stati utilizzati 8 nidi. Per le arene controllo le piante sono state coltivate in assenza di formiche. Per la coltivazione in laboratorio, le piante sono state mantenute in celle termostate con una temperatura tra i 23-24°C, illuminazione artificiale con ciclo giorno notte 16/8 h e, irrigazione manuale, fornendo ad ogni pianta settimanalmente circa 600 ml di acqua. Dopo circa 18 giorni le piante sono state analizzate valutando:

- A. dimensione delle piante (altezza delle piante in cm);
- B. numero di nettari extraflorali sviluppati;
- C. quantità di nettare secreto per pianta (μl);
- D. dimensione delle zone secernenti nettare (diametro delle porzione sulle stipole, secernente nettare e identificabile per una colorazione purpurea rispetto alla pianta) (Heneidak et al, 2007).

La misurazione morfometrica dei nettari extraflorali è stata effettuata attraverso il programma Zeiss Zen-core, mediante l'acquisizione di immagini tramite stereo microscopio (Zeiss Stemi 508 + Camera Axiocam ErC5s).



Fig 4.7 Piante germogliate da 24 h di *V. faba*.



Fig 4.8 Nettari extraflorali di *V. faba* presenti nella faccia adassiale delle stipole: nell'immagine a sinistra è ben evidente l'abbondante secrezione di nettare. Si noti l'area pigmentata di color porpora che rappresenta la zona secernente del nettario.

4.8.1.2 Esperimenti in campo

Per valutare le produzioni di nettare extraflorale in natura è stato necessario approntare una coltivazione appositamente dedicata a questo studio utilizzando una parcella di terreno agricolo (3x2m). Prima della semina, il terreno è stato preparato effettuando una aratura il 09/02/2018 e una fresatura 5 giorni prima della messa a dimore dei semi il 03/03/2018. Per la semina sono stati utilizzati semi certificati provenienti da agricoltura biologica (Symbiosys; Specie FA00015; Varietà Aguadulce Supersimonia; Rif.C/S-Lotto AF0665). In totale sono state coltivate 40 piante, suddivise in filari da 10 piante con distanza tra i filari di 50 cm. Alle piante è stata somministrata acqua (500 cl per pianta) 2 volte a settimana. Dopo 30 giorni dalla nascita delle piante per ognuna è stato collocato un sostegno in legno (1m) e ogni pianta è stata fissata al sostegno con l'ausilio di nastro elastico per agricoltura. Per valutare l'effetto della presenza delle formiche sulla produzione di nettare extraflorale, su gruppi di piante già a partire da 24 ore dopo la germinazione, sono state applicate strisce di nastro biadesivo per insetti, utili a impedire l'accesso delle formiche. Per impedire l'accesso di fitofagi e escludere variazioni della produzione del nettare extraflorale a seguito di danni causati da insetti masticatori (rif cap 3), su gruppi di piante sono state collocate coperture in rete anti insetto. I gruppi di piante sperimentali sono stati suddivisi come di seguito,

Gruppo1:

n=10 piante di *V. faba* (senza nastro biadesivo e senza rete anti insetti)

Gruppo2:

n=10 piante di *V. faba* (con nastro biadesivo e senza rete anti insetto)

Gruppo3:

n=10 piante (senza nastro biadesivo e con rete anti insetto)

Gruppo4:

n=10 piante (con nastro biadesivo e con rete anti insetto)

Dopo due mesi dalla germinazione (01/06/2018) è stato prelevato nettare extrafioreale dalle piante. Per ogni gruppo è stato valutato il numero di nettari e le quantità di nettare per singolo nettario utile per raggiungere il volume stimato pari a 8 µl.

4.8.2 Analisi statistiche

E' stata effettuata una analisi multivariata (MANOVA) sui parametri A: dimensione delle piante, B: numero di nettari sviluppati e C: quantità di nettare secreto; per valutare complessivamente gli effetti dei trattamenti. Successivamente tutti parametri sono stati analizzati singolarmente mediante una analisi della Varianza a una via (one-way ANOVA) in funzione dei trattamenti (con formiche e senza formiche). Tutte le analisi sono state eseguite mediante il software IBM SPSS 24.0 (pacchetto Windows).

Per la analisi sulla produzione di nettare extrafioreale in natura è stato effettuata una analisi della Varianza (two-way ANOVA) per valutare l'effetto del trattamento (con rete e senza rete) e della presenza delle formiche (presenza/assenza di formiche).

4.9 Risultati sugli effetti della presenza delle formiche sulle piante

4.9.1 Risultati degli esperimenti in laboratorio

Sono state analizzate 155 piante. La analisi multivariata ha evidenziato un effetto complessivamente positivo dovuto alla presenza e interazione delle formiche con le piante sperimentali (MANOVA: $V = 0,34$, $F_{(3, 151)} = 25,96$; $p < 0,001$). Infatti, è stato riscontrato un incremento delle dimensioni delle piante pattugliate dalle formiche (A: ANOVA: $F_{(1, 153)} = 52,70$; $p < 0,001$) rispetto a piante con assenza di formiche (Fig 4.9 A). E' stata evidenziata una differenza altamente significativa tra i trattamenti nello sviluppo di nettari extrafioreali (B: ANOVA: $F_{(1, 153)} = 42,30$; $p < 0,001$); con la formazione di un numero maggiore di nettari su piante con presenza di formiche (Fig 4.9 B). E' stata inoltre registrata una differenza significativa nella produzione di nettare extrafioreale (C: ANOVA: $F_{(1, 153)} = 15,50$; $p < 0,001$), con un incremento della produzione in piante con presenza di formiche (Fig 4.9 C). L'analisi statistica condotta sulle porzioni delle stipole secernenti nettare ha evidenziato anche in questo caso una differenza altamente significativa tra i due trattamenti (D: ANOVA: $F_{(1, 686)} = 45,53$; $p < 0,001$). Le piante con la presenza delle formiche hanno mostrato nettari con un incremento del diametro (µm) delle porzioni secernenti nettare extrafioreale presenti nelle stipole (Fig 4.9 D).

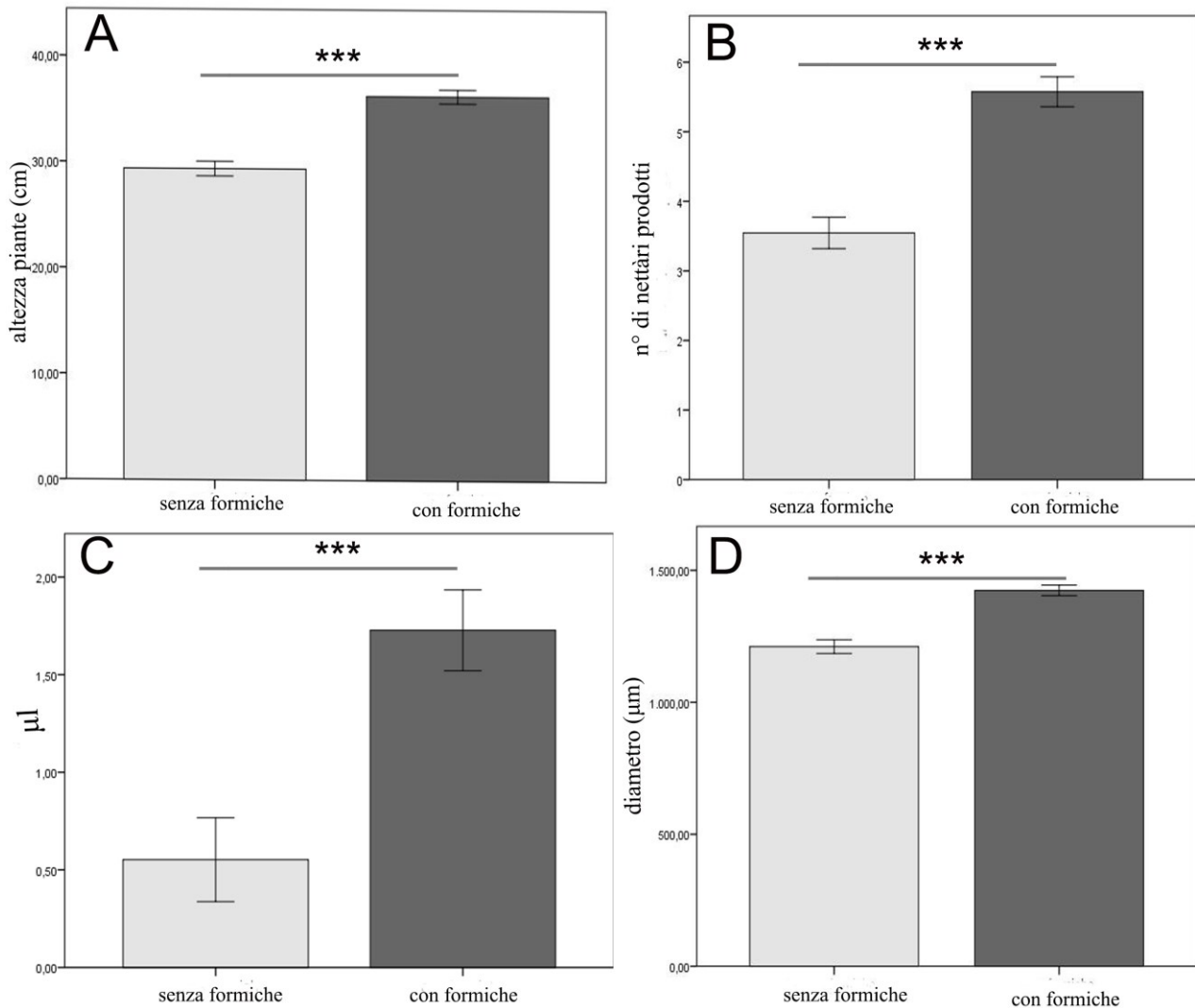


Fig 4.9 Le barre presenti negli istogrammi indicano i valori medi inerenti i parametri della pianta (\pm errore standard, one-way Anova). In ogni grafico è mostrato il confronto tra i trattamenti (con formiche/senza formiche). Le variabili indicate sono : A) dimensione delle piante; B) numero di nettari extraflorali prodotti dalla pianta; C) quantità di nettare prodotto per nettario; D) Diametro delle zone secernenti nettare (μm). Gli asterischi indicano il valore di significatività (***, $p < 0,001$).

4.9.2 Risultati degli esperimenti in campo

Le analisi statistiche hanno evidenziato una differenza altamente significativa nelle quantità secrete dai nettari, utili a raccogliere il volume stimato pari a $8 \mu\text{l}$ in presenza/assenza di formiche (ANOVA: $F_{(3, 250)} = 95,84$; $p < 0,001$). Piante con presenza di formiche producono un quantitativo maggiore di nettare extraflorale rispetto a piante senza formiche. La statistica evidenzia inoltre una differenza significativa per la presenza e assenza di reti anti insetto (ANOVA: $F_{(3, 250)} = 7,14$; $p = 0,008$); sia in presenza che in assenza di formiche le piante con reti presentano una maggiore quantità di nettare rispetto alle piante prive di rete. L'interazione tra i due fattori (presenza/assenza di formiche* presenza/assenza di reti) non è risultata significativa (ANOVA: $F_{(3, 250)} = 0,02$; $p = 0,882$).

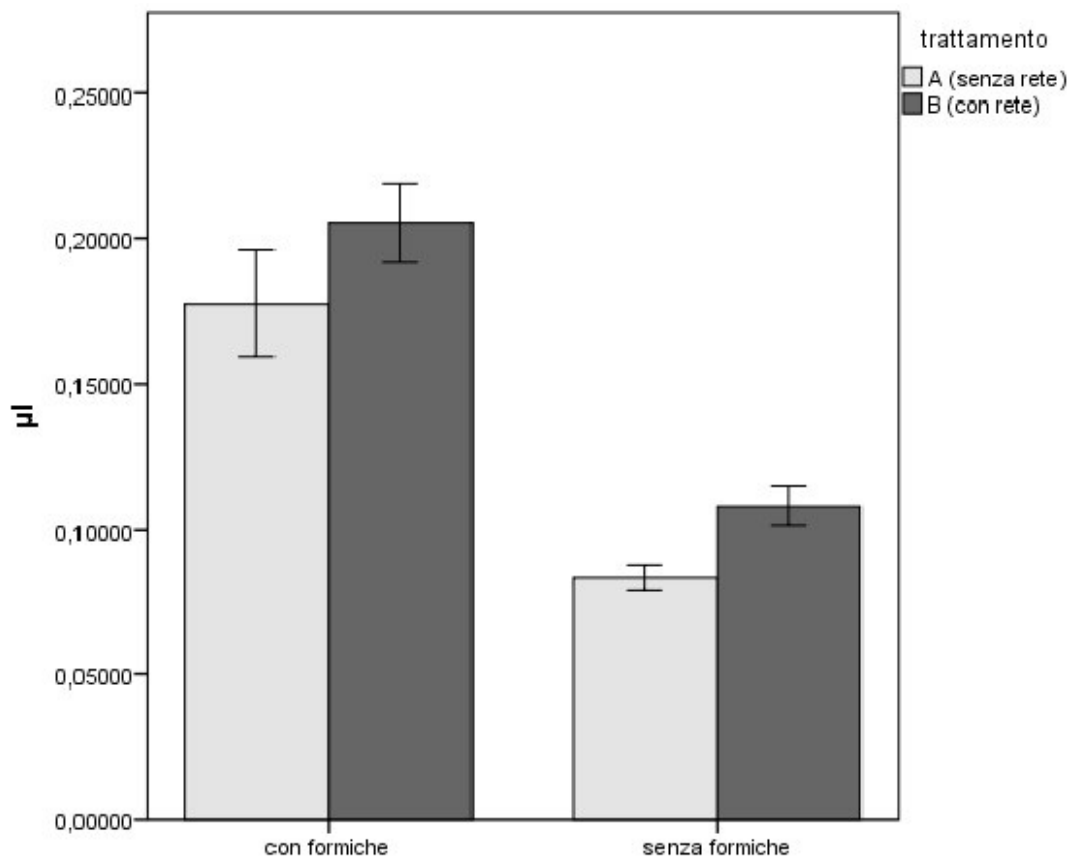


Fig 4.10 Le barre presenti nell' istogramma indicano il valore medio di μl prelevato dalle piante (\pm errore standard, two-way Anova), in funzione della (presenza/assenza formiche) e, della presenza/assenza della copertura anti-insetto (A:con rete; B: senza rete)

4.10 Discussione e conclusioni

I risultati sull'aggressività diretta verso la cimice fitofaga *H. halys* e possibile preda di *C. scutellaris* evidenziano un incremento dei valori più alti (livello 3 e livello 4) in formiche che si sono nutrite di nettare extraflorale. In particolare, è stato registrato un numero maggiore di morsi diretti verso la preda e un incremento di morsi continuati con una durata maggiore. Infatti le formiche che sono state nutrite con miele o che non hanno ricevuto alimentazione non presentano differenza nei valori relativi a questi livelli. La curva di sopravvivenza delle cimici mostra un abbattimento delle prede, evidenziando allo scan-sampling n°4 un tasso di sopravvivenza dello 0% con formiche che hanno assunto nettare. I valori relativi allo scan-sampling 4 per gli altri trattamenti evidenziano un tasso di sopravvivenza del 95% con formiche che non hanno assunto nessun alimento e del 100% con formiche che hanno assunto miele. Il tasso di sopravvivenza delle prede in presenza di formiche prive di alimentazione raggiunge lo 0% solo allo scan 8. Per le formiche che hanno assunto miele, il

tasso di sopravvivenza della preda rimane costante al 100% fino alle 48 ore, termine del monitoraggio sperimentale. Nell'aggressività diretta verso un'altra specie di formica (potenziale competitore di *C. scutellaris*) rappresentata da *L.niger*, le analisi hanno evidenziato un incremento dei livelli 1 e 2, inerenti interesse e bassa aggressività. Come in precedenza tra i gruppi che sono stati nutriti con miele o che non hanno ricevuto alimentazione non sono evidenti differenze statisticamente significative. *L. niger* si è mostrata una formica piuttosto aggressiva, dando inizio al (63%) degli attacchi. L'aumento dei livelli 1 e 2 (antennamenti e minacce) evidenzia un incremento della reattività degli individui che hanno assunto nettare in risposta a *L.niger*. Dati in letteratura evidenziano una variazione della iperattività da parte delle formiche in risposta all'assunzione di differenti concentrazioni di carboidrati e zuccheri (Gonzalez-Teuber et al, 2012). Tuttavia, è possibile che i sistemi motivazionali che sovrintendono i processi aggressivi manifestati nei confronti di potenziali prede e quelli legati all'aggressività competitiva siano diversi e diversamente suscettibili alle sostanze assunte. Ciononostante l'analisi dei parametri locomotori non ha evidenziato differenze tra l'assunzione di nettare e miele nei parametri connessi alla velocità e alla distanza. Per quanto riguarda il parametro connesso alla mobilità, a differenza degli altri parametri, formiche che hanno assunto nettare mostrano valori intermedi rispetto agli altri due trattamenti. Inoltre, non sono stati registrati effetti a seguito dell'assunzione di nettare extrafiore sulla capacità di seguire il feromone di traccia. Variazioni della quantità di nettare prodotto e del rapporto Carbonio/Azoto registrate nel nettare extrafiore a seguito dell'attacco di erbivori possono influenzare il comportamento predatorio delle formiche (Nepi et al, 2018). Ciò non sembra essere il caso degli esperimenti sopra descritti; Infatti, la totale assenza di danni nelle piante utilizzate per gli esperimenti in laboratorio suggerisce che la variazione nella quantità del nettare prodotto sia legata alla sola presenza delle formiche. Attualmente non siamo a conoscenza se la composizione del nettare subisca qualche variazione a seguito delle interazioni tra *V. faba* e le formiche; di conseguenza future analisi cercheranno di chiarire questo aspetto. Un'altra risposta correlabile alla presenza delle formiche da parte delle piante è sicuramente legata ad aspetti morfo-funzionali. Infatti, nelle piante pattugliate dalle formiche è stata evidenziata una variazione significativa di tutti i parametri analizzati rispetto alle piante non pattugliate. In particolare, è stato registrato un incremento nelle dimensioni delle piante, nel numero di nettari prodotti, nella quantità di nettare secreto e nelle dimensioni della porzione secernente nettare. Anche in natura è stata evidenziata una differenza nella produzione di nettare extrafiore con un incremento in piante con presenza di formiche. I risultati evidenziano tuttavia una differenza tra i trattamenti (con e senza reti anti-insetto). Piante con reti, sia in presenza, che in assenza di formiche, presentano una maggiore quantità di nettare. Questo risultato evidenzia la possibile presenza di altri insetti consumatori di nettare extrafiore a cui è stato impedito l'accesso dalla presenza delle reti. In letteratura sono state

descritte variazioni nel numero di nettari extraflorali prodotti su piante di *V. faba* in relazione al numero di foglie danneggiate (Mondor & Addicott, 2003) quindi, a seguito di un evento traumatico simulante l'attacco di erbivori. Altri studi hanno evidenziato variazioni nella produzione di corpi fruttiferi e secrezione di nettare extraflorale rispettivamente in piante di *Cercopia spp* e di *Inga vera* in relazione alla intensità luminosa durante la fasi di crescita (Bixenmann et al, 2011). Tuttavia i risultati ottenuti nel presente studio sulla produzione di nettare extraflorale sia in natura che in laboratorio, in assenza di predatori e danni fogliari, mettono in luce la probabile presenza di differenti meccanismi fisiologici implicati nella risposta alla presenza delle formiche e, nella regolazione e produzione del nettare extraflorale. Differenti studi evidenziano la presenza di sostanze come metaboliti secondari e alcaloidi nel nettare; Tali sostanze presenti nel nettare florale sono responsabili di modificazioni comportamentali negli insetti impollinatori (Baracchi et al, 2017). Esperimenti in laboratorio con differenti alcaloidi evidenziano una alterazione fisiologica e comportamentali della specie di formica *Myrmica sabuleti* (Cammaerts et al, 2014), con variazioni dei parametri locomotori e della memoria olfattiva. La presenza di tali sostanze come ben evidenziato dagli esperimenti eseguiti con *Prunus avium* (rif cap 5) potrebbe spiegare le alterazioni del comportamento riscontrate a seguito della assunzione di nettare extraflorale (Grasso et al, 2015; Nepi et al, 2018).

CAPITOLO 5

Mutualismo con *Prunus avium* mediato da nettàri extraflorali

5.1 Introduzione e scopo

Per lo studio sulle relazioni mutualistiche tra formiche e piante mirmecofile abbiamo preso in considerazione una seconda pianta modello presente su tutto il territorio Italiano e in Europa, sia in agroecosistemi che in ambiente naturale, *Prunus avium*. Durante gli studi preliminari in campo (rif cap 2) abbiamo osservato e identificato specie differenti di formiche interagire con i nettàri extraflorali presenti alla base della lamina fogliare e sul picciolo (Fig 5.1). Scopo del presente lavoro è stato analizzare le interazioni tra formiche e piante di *P. avium* presenti in natura. In particolare, lo studio si è focalizzato nel valutare gli effetti sul comportamento delle formiche a seguito dell'assunzione del nettare e i possibili effetti sulle piante dovuti alla presenza delle formiche. A tale scopo è stata condotta una serie di esperimenti sia in campo che in laboratorio con l'intento di studiare i seguenti aspetti della relazione tra formiche e pianta modello.

5.1.1 Ricerca sul campo

- A) possibili effetti di protezione sulle piante dovute alla presenza delle formiche;
- B) tempi di interazione con il nettàrio e di patrolling sulle piante;
- C) analisi della produzione di nettare extraflorale;
- D) tempo di permanenza sulle piante.

5.1.2 Ricerca in laboratorio: effetti dell'assunzione del nettare extraflorale

- E) effetti sull'aggressività delle formiche nei confronti di un insetto fitofago e potenziale preda (*H. halys*).
- F) analisi dei parametri connessi ad attività locomotoria;
- G) risposta a stimoli sociali (trail-following);



Fig 5.1 Apice della pianta *P. avium* e particolare dei nettari extraflorali presenti sul picciolo.

5.2 Materiali e metodi (I)

5.2.1 Esperimenti in campo

A) Possibili effetti di protezione sulle piante dovute alla presenza delle formiche

All'interno dell'area di studio sono stati individuati 6 plot con presenza di un numero totale di piante di *P. avium* (n=38). Per valutare gli effetti della presenza delle formiche, in seguito all'apertura delle gemme fogliari (24/03/2016), su parte delle piante (n=19) sono stati collocati manicotti di nastro biadesivo per insetti lungo il fusto, utili a impedire l'accesso delle formiche. Da Marzo a Giugno 2016 sono stati effettuati 11 scan sampling (2 volte a settimana, 5 minuti su tutta la pianta) per valutare:

A1 Il numero e la specie di formiche presenti sulle piante;

A2 La presenza e numero di insetti fitofagi sulla pianta;

Al termine del periodo sperimentale;

A3 Indice di danno fogliare (numero di foglie danneggiate/numero di foglie totali).

B) Tempi di interazione con i nettari e di patrolling sulle piante in natura

Le osservazioni erano rivolte ad animali focali, di cui veniva registrato ed analizzato il comportamento in relazione al nettario extraflorale con cui interagivano. In particolare, operaie di *Crematogaster scutellaris* (n= 100) che suggerivano dai nettari per almeno 1 minuto erano marcate e monitorate continuamente per 10 minuti (continuous sampling) (Fig 5.2 – 5.3). Per ciascun individuo veniva valutato in un tempo di osservazione di 10 minuti:

- B1** il numero di contatti con i nettari extraflorali: quante volte le formiche si sono fermate e hanno assunto nettare dal nettario;
- B2** il tempo totale trascorso sul nettario;
- B3** il tempo di pattugliamento sul resto della pianta.



Fig 5.2 Nettari extraflorali di *P. avium*. Si noti la goccia di nettare secreto dal nettario in primo piano.



Fig 5.3 Operaia marcata di *C. scutellaris* su nettari di *P. avium*.

C) Analisi della produzione di nettare extrafiore

In funzione dei trattamenti (con formiche, senza formiche) è stata valutata la produzione di nettare extrafiore da parte di piante in condizioni naturali (Fig 5.4 – 5.5). I campioni sono stati raccolti per 2 anni consecutivi (2015/2016) valutando il numero di nettari necessari per raccogliere 4 μ l per anno. I prelievi in natura sono stati effettuati mediante micro capillari (Drummond, MICROCAPS 0,5 μ l) dalle ore 7:00 alle ore 12:00 nel periodo compreso da Marzo a Giugno (2015-2016). Nel 2016 migliorando la procedura di raccolta, oltre a valutare il numero di nettari necessari per raccogliere la quantità di 4 μ l sono state misurate anche le quantità per singolo nettario.



Fig 5.4 Nettari di *P. avium* con goccioline di nettare.



Fig 5.5 Microfotografia 1:5 di una goccia di nettare extrafiorente secreto da un nettario di *P. avium*.

D) Tempo di permanenza delle formiche sulle piante

Ulteriori esperimenti in campo ci hanno permesso di valutare il tempo di permanenza delle formiche sulle piante. Differenti piante di *P. avium* (n= 30) sono state prelevate nell'area di studio in una fase precoce del loro sviluppo e fatte crescere in vaso per circa due anni. Successivamente durante nelle fasi sperimentali, sono state collocate in natura (circa 20 m dal margine boscato) in un areale con presenza di *C. scutellaris*. Le piante sono state posizionate a distanza di 1m le une dalle altre per una distanza di 10 m secondo la seguente suddivisione:

N= 10 piante con nettari extrafiorenti liberamente accessibili;

N= 10 piante con nettari extrafiorenti schermati (tramite fasce di carta di alluminio) (Fig 5.5);

N= 10 piante con nettari extrafiorenti chiusi con la aggiunta di spot di miele (2 μ l) su carta di alluminio.

Per ciascuna pianta sono stati marcati 5 esemplari di *C. scutellaris* che si alimentavano dai nettari per almeno 1 minuto (Fig 5.6). Per ogni formica marcata è stato valutato il tempo totale trascorso sulla pianta tramite uno scan sampling (2 min per ogni ora) della durata di 92 ore dalla marcatura.



Fig 5.5 Esempio di chiusura di nettari extraflorali di *P. avium* con fogli di alluminio.



Fig 5.6 *C. scutellaris* su nettari extraflorali di *P. avium*.

5.2.2 Analisi statistica

- A) Per valutare gli effetti della presenza delle formiche sulle piante è stata effettuata una analisi della varianza (one-way Anova) in funzione dei trattamenti (con formiche, senza formiche). Nella categoria A3 (numero di foglie danneggiate /numero di foglie totali), è stata effettuata una trasformazione dei dati secondo la formula: $X = \arcsen(\sqrt{x})$, dove con x indichiamo il rapporto da calcolare.
- B) Per i confronti tra tempi di interazione con il nettario e i tempi di pattugliamento (patrolling) sulla pianta è stato effettuato un test T per campioni appaiati.
- C) Per analizzare eventuali differenze nella produttività di nettare extraflorale abbiamo effettuato un test non parametrico (X^2 test) analizzando i vari anni di prelievi, in funzione dei trattamenti (con formiche, senza formiche). Per l'anno 2016 è stata effettuata inoltre

una analisi della varianza (one-way Anova) in funzione dei trattamenti sui quantitativi di nettare raccolti per singolo nettario.

- D) Il tempo di permanenza totale trascorso sulle piante per ogni formica è stato analizzato mediante una analisi della varianza (one-way ANOVA, in funzione dei tre trattamenti (nettare, miele e nessuna alimentazione). In questo caso per evidenziare possibili differenze tra i gruppi sono stati effettuati dei test post-hoc di Tukey.

Tutte le analisi sono state effettuate mediante il programma IBM SPSS 24.0 (pacchetto Windows).

5.3 Risultati degli esperimenti in campo

- A) Mediante scan sampling è stata individuata la presenza di 4 specie di formiche presenti sulle piante di *P. avium*: *Crematogaster scutellaris* sul 57% delle piante, *Lasius emarginatus* sul 18% delle piante, *Camponotus vagus* sul 15 % delle piante, *Plagiolepis pygmaea* sul 9% delle piante.

Le analisi dei dati inerenti il danneggiamento fogliare e la presenza di insetti fitofagi hanno dimostrato un consistente effetto protettivo fornito dalle formiche (Fig 5.7). Infatti piante con presenza di formiche presentano una diminuzione significativa del numero di foglie danneggiate (ANOVA: $F_{(1, 31)} = 60,11$; $p < 0,001$) e, una minore presenza di insetti fitofagi (ANOVA: $F_{(1,31)} = 60,11$; $p < 0,001$). Su piante senza formiche abbiamo registrato la presenza di coleotteri Curculionidi assenti nelle piante con formiche.

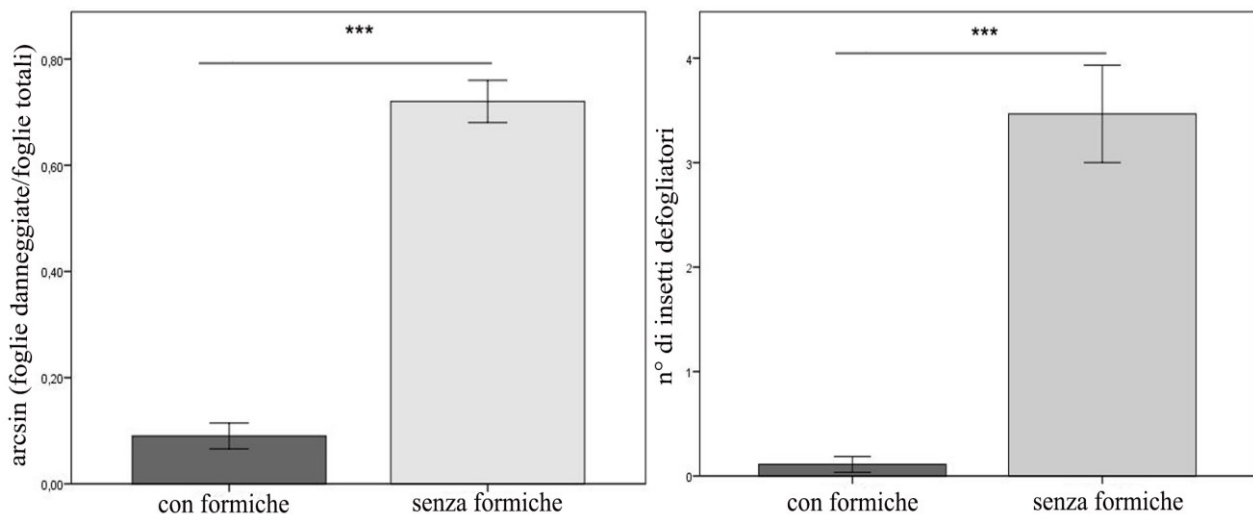


Fig 5.7 Effetti sulle piante dovuti alla presenza delle formiche. Le barre negli istogrammi (\pm errore standard, one-way Anova) indicano: A1) numero medio di foglie danneggiate in presenza /assenza di formiche; A2) numero medio di insetti defogliatori in presenza/assenza di formiche. Le analisi statistiche evidenziano una differenza altamente significativa tra i trattamenti (***) = $p < 0,001$).

B) Mediante il continuous sampling (10 min) abbiamo descritto il comportamento delle formiche in relazione ai nettari extraforali. I soggetti monitorati si muovono freneticamente sul nettario, sulla foglia e sul ramo. I prelievi del secreto dal nettario risultano brevi e ripetuti. Il numero medio di contatti con il nettario calcolato su 100 individui risulta di $(25,3 \pm 1,3 \text{ se})$. L'analisi statistica evidenzia una differenza significativa tra il tempo passato sul nettario e il tempo di patrolling ($t_{(98)} = -3,55$; $p = 0,001$). Il tempo medio passato sul nettario ($4,5 \text{ min} \pm 0,13 \text{ se}$) risulta inferiore al tempo medio passato in movimento ($5,8 \text{ min} \pm 0,13 \text{ se}$) (Fig 5.8). Le formiche in questo modo pur nutrendosi in modo ripetitivo e frenetico dai nettari, pattugliano in modo costante differenti parti della pianta garantendone la protezione.

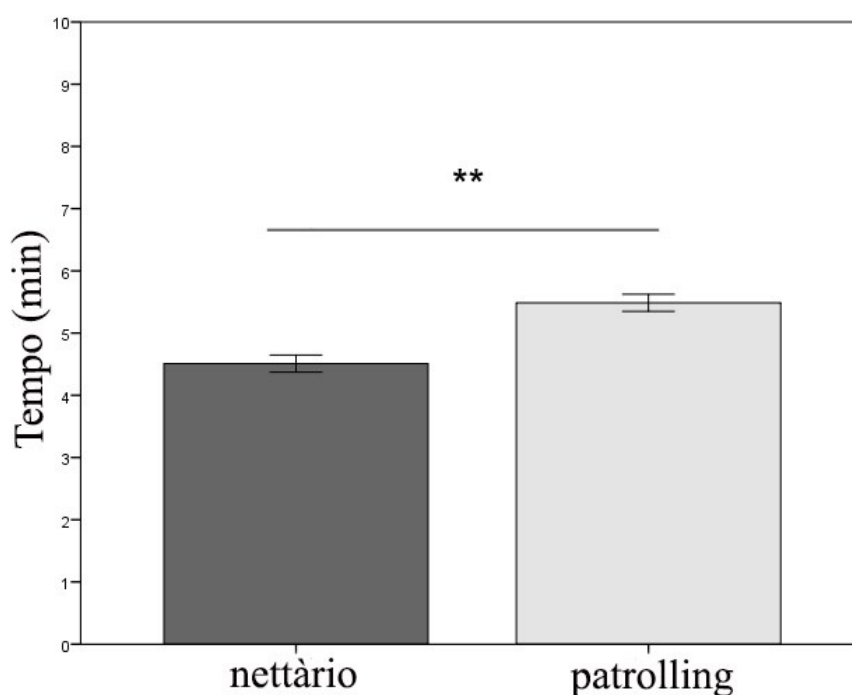


Fig 5.8 Analisi del continuous sampling: Le barre negli istogrammi (\pm errore standard, t-test) indicano tempo medio trascorso sui nettari e tempo medio in attività di patrolling. Le analisi hanno evidenziato una differenza statisticamente significativa (t-test, **: $p = 0,001$).

C) Per quanto riguarda la produzione di nettare, i risultati per entrambi gli anni (2015: $\chi^2_{(1)} = 365$; $p < 0,001$; 2016: $\chi^2_{(1)} = 407$; $p < 0,001$) hanno evidenziato una differenza altamente significativa tra i trattamenti (Fig 5.9). Piante con libero accesso da parte delle formiche secernono una maggiore quantità di nettare. Per ottenere la quantità stabilita di $4\mu\text{l}$ in piante con formiche sono stati necessari 94 nettari nel 2015 e 102 nettari nel 2016; a differenza delle piante prive di formiche dove sono stati necessari rispettivamente 217 nettari nel 2015 e 306 nettari nel 2016.

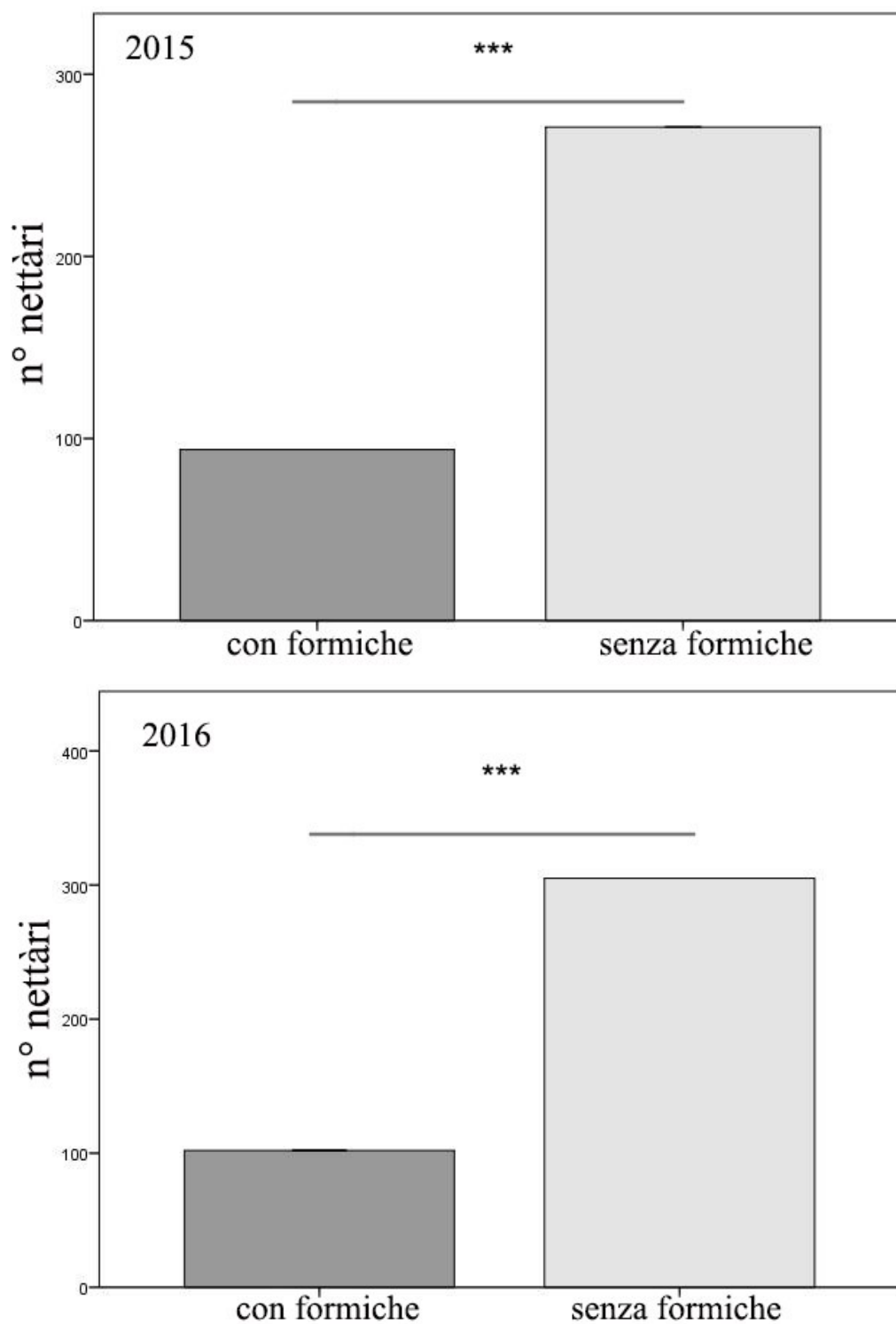


Fig 5.9 Le barre negli istogrammi (\pm errore standard, one-way Anova) indicano il numero medio di nettari necessario per la raccolta di 4 μ l di nettare extraflorale. In ascissa i trattamenti (con formiche-senza formiche). Le analisi statistiche (χ^2 test) evidenziano una differenza altamente significativa tra i trattamenti per entrambi gli anni di campionamento (***; $p < 0,001$).

Nel 2016 anche la analisi della Varianza (one-way Anova) effettuata sulle quantità secrete per nettario, evidenzia una differenza altamente significativa tra i trattamenti (ANOVA: $F_{(1, 406)} = 272,48$; $p < 0,001$). Infatti, piante con la presenza delle formiche scernono una quantità maggiore di nettare da ogni nettario ($0,039 \pm 0,0025$ se), rispetto a piante senza formiche ($0,013 \pm 0,037$ se) (Fig 5.10).

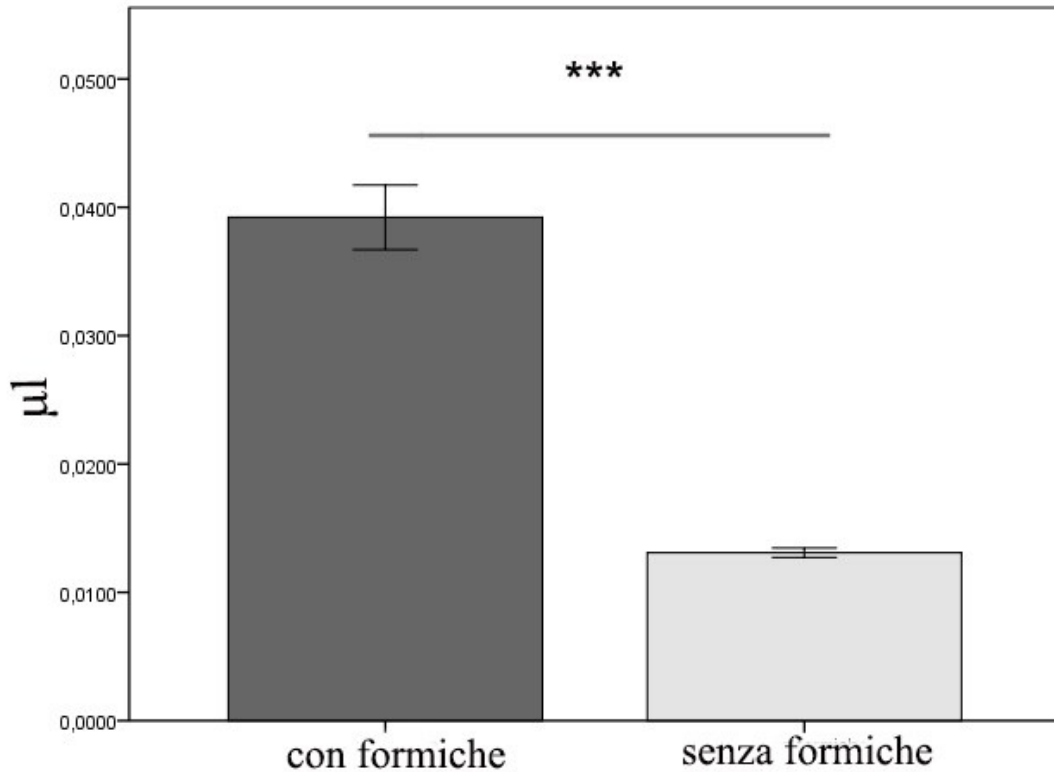


Fig 5.10 Le barre nell' istogramma (\pm errore standard, one-way Anova) indicano la quantità media di nettare secreto da piante di *P. avium* in funzione di trattamenti (presenza o assenza di formiche). La analisi statistica evidenzia una differenza altamente significativa tra i trattamenti (***: $p < 0,001$).

D) Risultati del tempo di permanenza sulla pianta

Le analisi evidenziano una differenza statisticamente significativa tra i trattamenti (ANOVA: $F_{(2, 147)} = 1051,66$; $p < 0,001$). I test post hoc di Tukey (rif Tab1) descrivono una differenza tra tutti i trattamenti. Formiche che hanno assunto nettare rimangono sulla pianta per un numero maggiore di ore ($89,80$ h \pm 2,3 se); rispetto a formiche che hanno assunto miele ($12,54$ h \pm 12,10 se) o che non si sono nutrite ($3,12$ h \pm 1,0 se) (Fig 5.11).

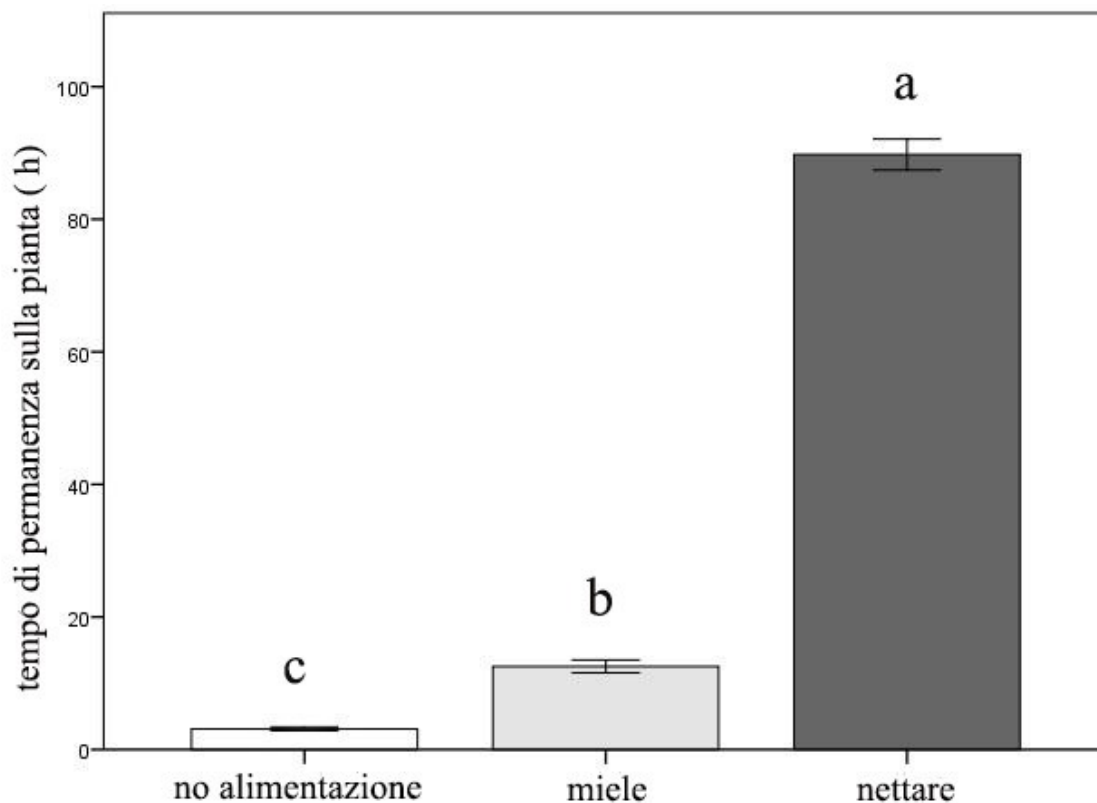


Fig 5.11 Le barre nell' istogramma (\pm errore standard, one-way Anova) indicano il tempo medio di permanenza di *C. scutellaris* sulle piante in relazione al trattamento (nettare, miele, nessuna alimentazione). Le lettere presenti sulle barre rappresentano i risultati del confronto tra i gruppi mediante test post-hoc di Tukey. Barre con lettere uguali non presentano differenze statisticamente significative.

Variabile dipendente: tempo di permanenza sulla pianta						
Tukey post-hoc test						
(I) trattamento		Differenza fra medie (I-J)	Errore std.	Sig.	Intervallo di confidenza 95%	
					Limite inferiore	Limite superiore
nettare	no alimentazione	86,640*	2,073	,000	81,73	91,55
	miele	77,220*	2,073	,000	72,31	82,13
no alimentazione	nettare	-86,640*	2,073	,000	-91,55	-81,73
	miele	-9,420*	2,073	,000	-14,33	-4,51
miele	nettare	-77,220*	2,073	,000	-82,13	-72,31
	no alimentazione	9,420*	2,073	,000	4,51	14,33

*. La differenza media è significativa al livello 0.05

Tab 1 Confronti multipli di Tukey inerenti l'analisi dei tempi di permanenza sulla pianta (one-way Anova) in relazione al trattamento (nettare, miele, no alimentazione).

5.4 Materiali e metodi (II)

5.4.1 Esperimenti in laboratorio per valutare gli effetti dell'assunzione del nettare extrafioreale

5.4.1.1 Condizioni di stabulazione delle formiche e coltivazione delle piante

Per gli esperimenti in laboratorio volti a studiare gli effetti dell'assunzione del nettare sul comportamento delle formiche sono stati utilizzati frammenti da 10 di colonie di *C. scutellaris* composti da 200 individui. Le colonie sono state prelevate in natura, in alta Toscana nel comune di Villafranca in Lunigiana. Le porzioni di colonie sono state collocate in contenitori di plastica (\varnothing : 20 cm; h= 10.5 cm) in presenza di alcuni grammi di materiale vegetale e, porzioni di nido prelevate in natura assieme ad un dispenser di acqua. Le colonie sono state prelevate 48 ore prima degli esperimenti e mantenute in cella termostata ad una temperatura di 23/24°C con un ciclo giorno notte di 16/8 h. Prima di essere sottoposte a test le formiche sono state mantenute prive di alimentazione per almeno 24 ore. Per le coltivazioni sono state utilizzate piante di circa due anni di *Prunus avium* prelevate in natura, nei pressi del paese di Fornoli e allevate in vaso (\varnothing : 25 cm; h= 20 cm). In fase di trapianto è stato prelevato terriccio in bosco, setacciato grossolanamente e amalgamato con terriccio universale (Compo Sana Universal Soil). Le piante sono state mantenute a temperatura ambiente in una serra aperta con irrigazione manuale fornendo ad ogni pianta settimanalmente circa 1 l di acqua. Durante lo svolgimento degli esperimenti, le piante sono state mantenute in celle termostate con una temperatura tra i 23-24°C. Per l'illuminazione artificiale sono state utilizzate lampade fitostimolanti con ciclo giorno notte 16/8 h + 1l di acqua la settimana.

5.4.1.2 Effetti dell'assunzione di nettare extrafioreale sul comportamento delle formiche.

Dopo 24 ore di digiuno le arene nido sono state collegate ad una seconda arena (\varnothing : 40 cm; h= 20 cm) mediante un tubo trasparente della lunghezza di 10 cm e del diametro di circa 3 mm, dove sono state collocate le piante sperimentali. Alle formiche è stato fornito un accesso selettivo sulle piante mediante una pedana in legno (20cm x 3cm). I test sono stati effettuati su formiche sottoposte a tre trattamenti.

1) Soggetti che assumevano nettare dai nettari per almeno 2 minuti (le formiche venivano marcate con vernice atossica sul torace (Fig 5.3), per essere facilmente riconosciute).

2) Soggetti che assumevano una soluzione zuccherina a base di miele e acqua per almeno 2 minuti. In arena sono state inserite piante con nettari extrafioreali schermati con carta di alluminio. In corrispondenza dei nettari extrafioreali schermati, mediante micro-capillari venivano depositati 2

microlitri di soluzione. Come in precedenza, le formiche venivano marcate per un loro successivo riconoscimento.

3) Soggetti che avevano accesso a piante con nettari schermati ma sulle quali non trovavano alimento. Anche in questo caso le formiche venivano marcate.

Le formiche sperimentali venivano reinserite nell'arena nido per 10 minuti prima di essere sottoposte a test. Per valutare gli effetti a seguito dell'assunzione di nettare extraflorale da parte delle formiche abbiamo effettuato esperimenti volti a chiarire differenti aspetti legati al comportamento delle formiche:

- A) aggressività espressa nei confronti di un insetto fitofago;
- B) parametri legati all'attività locomotoria;
- C) risposta a stimoli sociali (trail-following).

A) Aggressività espressa nei confronti di un insetto fitofago

Come nei precedenti esperimenti su *Vicia faba*, anche in questo caso è stata scelto come insetto modello la cimice *Halyomorpha halys*. Gli individui impiegati negli esperimenti sono stati allevati in laboratorio, a partire da ovature prelavate in natura, in contenitori areati (20cmx30cm) con dispenser di acqua e nutriti con verdure. Gli allevamenti sono stati mantenuti a 25-26 °C, con un'umidità del 50-55% ed un periodo giorno/notte di 16/8 h. In funzione dei trattamenti sono state testate simultaneamente 5 operaie di *C. scutellaris* per nido per un totale di 150 individui testati con un individuo di *H. halys* allo stadio V (Castracani et al, 2017). Per i test sono state utilizzate fighting box circolari (Ø: 11 cm; h= 1,5cm). Mediante la tecnica del cotinuous-sampling per 30 minuti sono stati identificati differenti moduli comportamentali organizzati secondo un crescente livello di aggressività da 1 a 4: Livello 1 indice di un'investigazione e interesse, Livello 2 bassa aggressività, Livelli 3 media aggressività, Livello 4 alta aggressività. Per ciascun livello di aggressività sono stati considerati vari comportamenti.

Livello 1) numero di antennamenti (per antennamento si intende un tamburellamento ripetuto effettuato con le antenne nei confronti di un altro individuo);

Livello 2) numero di minacce (A: gaster-rising; B: mandibole aperte);

Livello 3) numero di morsi (l'individuo chiude le mandibole su una parte del corpo dell'opponente e poi le riapre);

Livello 4) A-numero morsi continuati (il morso dura per almeno 1 minuto); B-durata morsi continuati.

Successivamente, per valutare gli effetti sulla cimice, sono stati effettuati 10 scan sampling, uno ogni ora per un totale di 8 ore e in seguito dopo 24 e 48 ore. Durante gli scan-sampling è stata valutata la condizione della preda (viva o morta).

B) Parametri legati all'attività locomotoria.

In funzione dei trattamenti (nettare, miele e nessuna alimentazione) sono state testate 8 operaie di *C. scutellaris* per nido per un totale di 240 individui. A seguito dei trattamenti e del periodo di latenza (10 minuti in arena nido) gli individui marcati sono stati posizionati in arene (20cmx20 cm; h=3cm), con substrato rimovibile per escludere contaminazioni chimiche tra un esperimento e l'altro. Gli individui sono stati filmati per 5 minuti. Successivamente i video sono stati analizzati mediante il software di video tracking Ethovision (Noldus) valutando differenti parametri indicativi sull'attività locomotoria espressa:

- distanza (cm percorsi in arena);
- velocità (cm/sec);
- mobilità (tempo trascorso in movimento, sec);
- immobilità (tempo trascorso senza camminare, sec).

C) Risposta a stimoli sociali (trail-following)

Per valutare la risposta a stimoli sociali è stata indagata la capacità da parte delle formiche di rispondere ai feromoni di traccia, nel caso di *C. scutellaris* prodotto dalle ghiandole tibiali delle zampe posteriori. Per la preparazione dell'estratto ghiandolare, tibia e tarso venivano dissezionate ed immerse in una soluzione di esano (8 ghiandole x 80 µl di esano). La soluzione è stata mantenuta a 4 °C per 24 ore prima di essere testata, ciò allo scopo di favorire l'estrazione del feromone. A seguito dei trattamenti e del periodo di latenza (10 minuti in arena nido) gli individui marcati sono stati posizionati in arena (28 cm x 20 cm; h= 4 cm) con substrato in carta rimovibile per escludere contaminazioni chimiche. All'interno dell'arena è stata tracciata una linea di 15 cm mediante 15 µl di soluzione contenente il feromone di traccia. Per valutare la capacità diseguire la traccia è stata considerata una area di riferimento dell'ampiezza di 1 cm a destra e sinistra rispetto alla linea tracciata con il feromone. (Fig 5.12). La risposta delle formiche veniva considerata positiva se veniva percorsa una distanza di almeno 7,5 cm muovendosi all'interno della area di riferimento ai lati della traccia. All'opposto venivano considerati negativi alla risposta, tutti i soggetti che non manifestavano questa modalità di movimento in presenza della traccia, effettuando percorsi al di fuori della zona contrassegnata (Fig 5.13). I soggetti sperimentali sono stati saggiati ulteriormente a distanza di 2 h dal trattamento per verificare una eventuale reversibilità dell'effetto del trattamento.

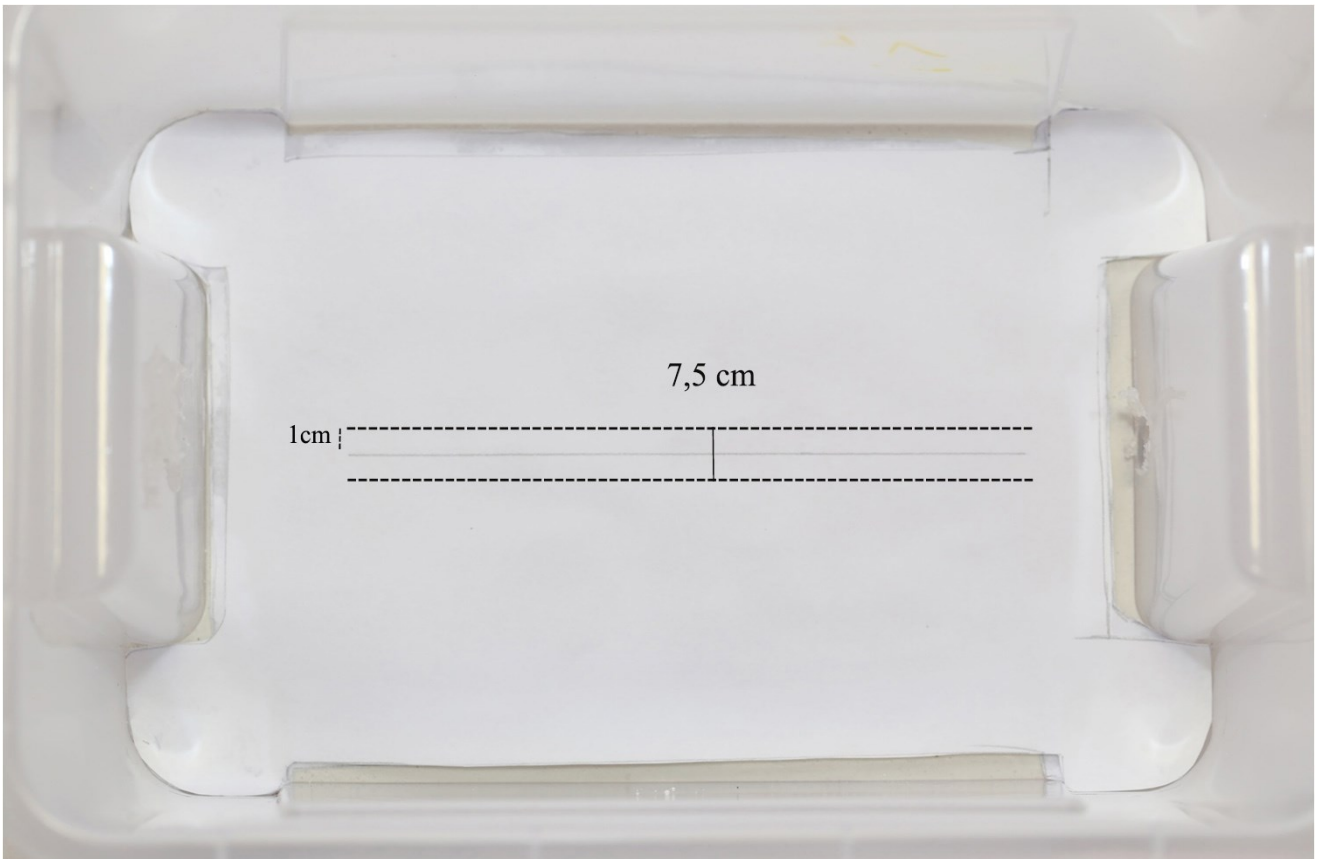


Fig 5.12 Arena test per la valutazione del trail-following espresso dalle formiche nei confronti di una traccia artificiale.

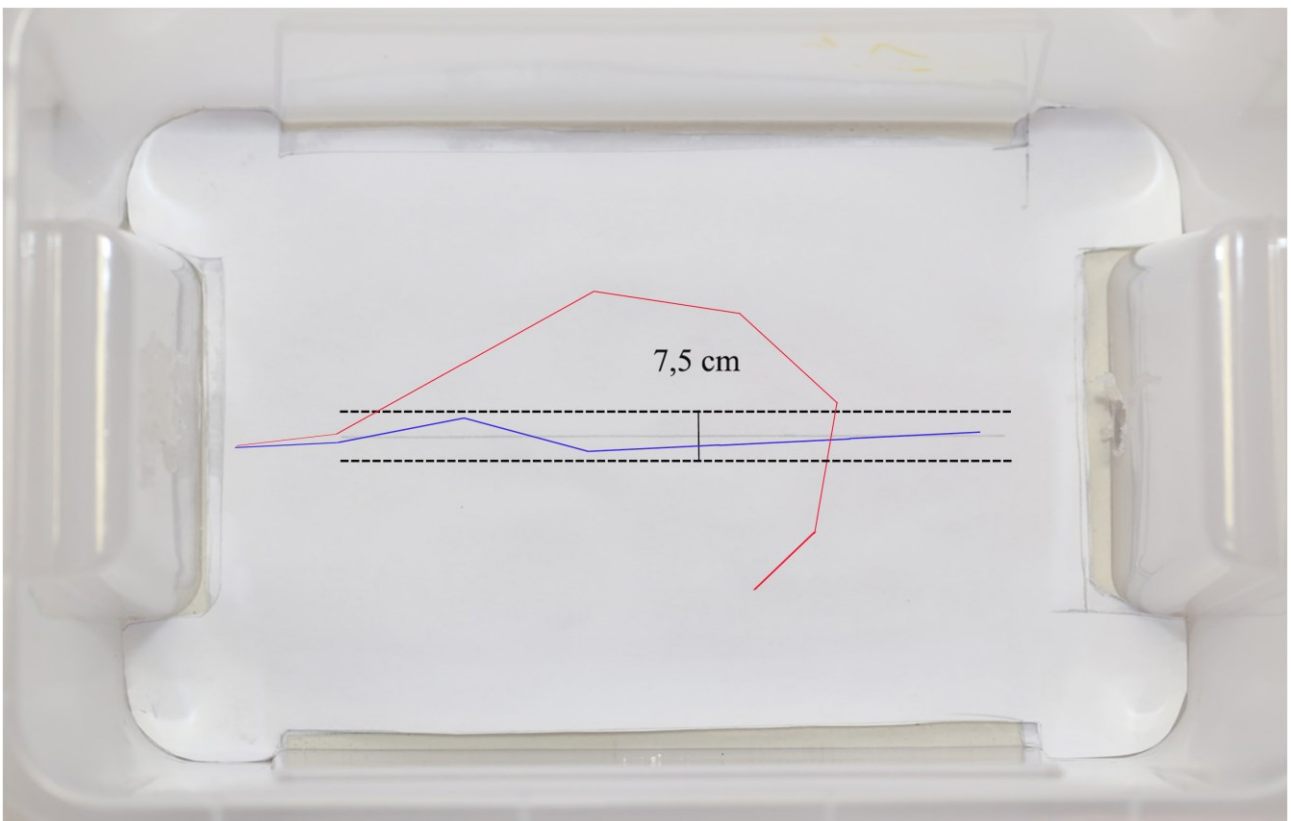


Fig 5.13. Valutazione del trail-following espresso dalle formiche nei confronti di una traccia artificiale. In azzurro un tracciato considerato positivo e in rosso un tracciato considerato negativo.

5.4.2 Analisi statistiche

A) I moduli comportamentali sono stati analizzati mediante una analisi della Varianza a una via (one-way ANOVA) in funzione dei tre trattamenti (nettare, miele e nessuna alimentazione) seguita da Tukey post-hoc test per evidenziare differenze tra i gruppi. Per valutare l'effetto sulle cimici (*H. halys*) in funzione dei trattamenti è stata prodotta una curva di sopravvivenza, analizzata mediante il test non parametrico Kaplan-Meier. Tutte le analisi sono state eseguite mediante il software IBM SPSS 24.0 (pacchetto Windows).

B) I parametri locomotori sono stati analizzati mediante analisi della Varianza a una via (one-way ANOVA) in funzione dei tre trattamenti (nettare, miele e nessuna alimentazione) seguiti da Tukey post-hoc test per evidenziare eventuali differenze tra i gruppi. Tutte le analisi sono state eseguite mediante il software IBM SPSS 24.0 (pacchetto Windows).

C) Per valutare la capacità di risposta a uno stimolo sociale (trail-following) da parte delle formiche in funzione dei trattamenti, è stata condotta una analisi della varianza a una via (one-way ANOVA) seguita da Tukey post-hoc test per evidenziare differenza tra i gruppi. Tutte le analisi sono state eseguite mediante il software IBM SPSS 24.0 (pacchetto Windows).

5.5 Risultati degli esperimenti in laboratorio

A) Analisi dell'aggressività: Le analisi inerenti i test di aggressività nei confronti di *H. halys* non hanno evidenziato una differenza statisticamente significativa tra i trattamenti nel numero di antennamenti (ANOVA: $F_{(2, 27)} = 1,6$; $p = 0,22$) (Fig 5.14-1). Per il livello 2 di aggressività è stata registrata una differenza altamente significativa nel numero di minacce (gaster-rising: ANOVA: $F_{(2, 27)} = 9,9$; $p = 0,001$; mandibole aperte ANOVA: $F_{(2,27)} = 9,9$; $p = 0,001$) (Fig 5.14- 2A; 2B). In particolare, le formiche che si sono cibate di nettare effettuano un numero maggiore di minacce rispetto agli altri trattamenti (Tab 2). L'analisi del livello 3 ha evidenziato una differenza statisticamente significativa tra i trattamenti nel numero di morsi (ANOVA: $F_{(2,27)} = 13,90$; $p < 0,001$). I risultati dei post-hoc (Tab 2) evidenziano che formiche che hanno assunto nettare manifestano il numero più alto di morsi, mentre non sono presenti differenze tra gli altri trattamenti (Fig 5.14-3). Anche nell'analisi del livello 4, il livello più alto di aggressività, la statistica dimostra una differenza altamente significativa tra tutti i trattamenti (ANOVA: $F_{(2,27)} = 20,22$; $p < 0,001$). Anche in questo caso è stata registrata una frequenza più alta di morsi continuati (Tab 2) in formiche che si sono cibate di nettare (Fig 5.14-4°). Tuttavia, non è stata registrata differenza tra i trattamenti nella durata dei morsi continuati (ANOVA: $F_{(2,27)} = 0,90$; $p = 0,43$) (Fig 5.14-4B).

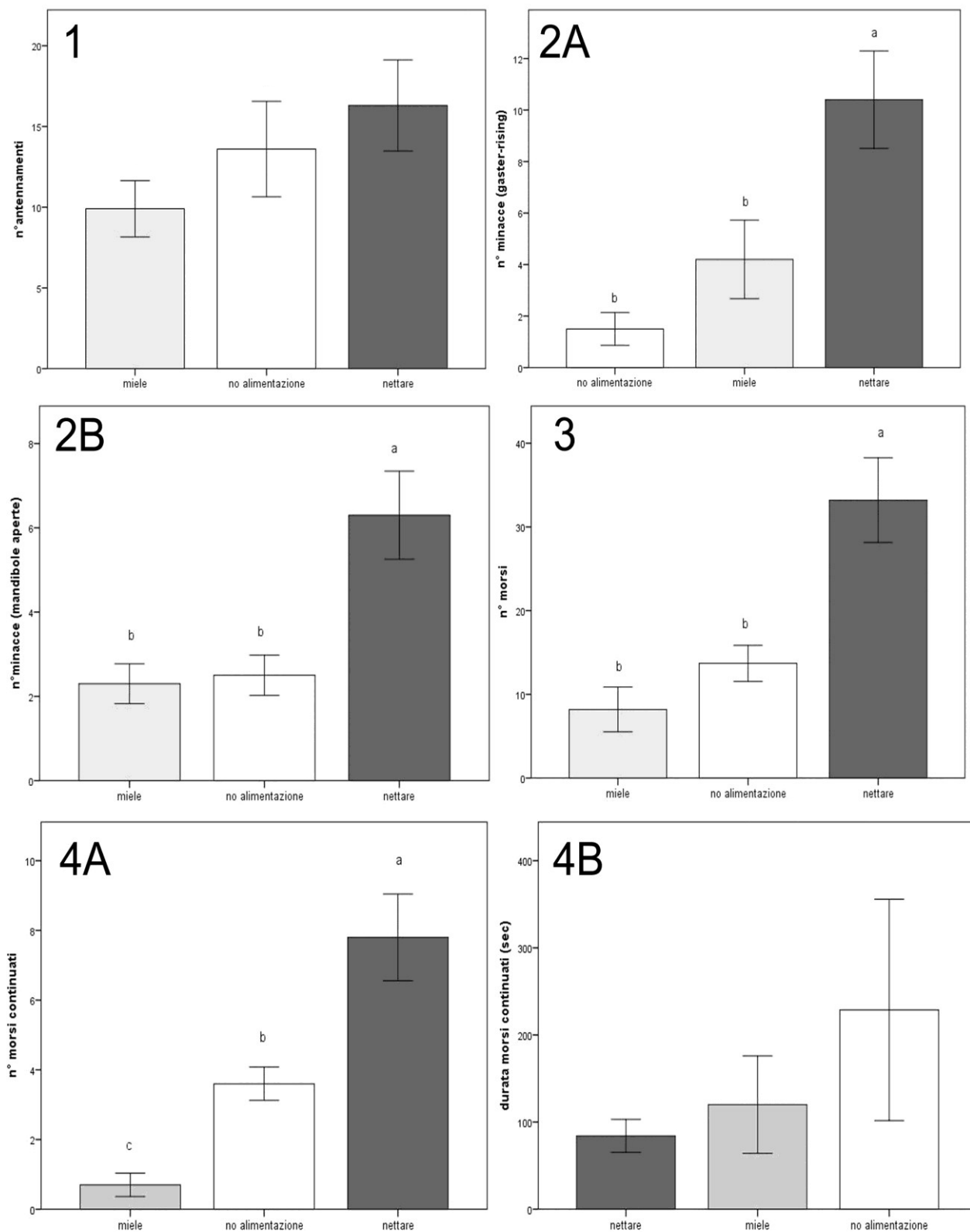


Fig 5.14 Le barre presenti negli istogrammi (\pm errore standard, one-way Anova) indicano il numero medio di comportamenti aggressivi manifestati da *C. scutellaris* nei confronti della cimice fitofaga *H. halys*. In ogni grafico è mostrato il confronto tra i trattamenti (nettare, miele e nessuna alimentazione). Le variabili misurate sono organizzate secondo un ordine crescente di aggressività (1-4): 1) numero di antennamenti; 2A) gaster-rising; 2B) mandibole aperte; 3) numero di morsi; 4A) morsi continuati; 4B) durata morsi continuati. Le lettere presenti sulle barre rappresentano i risultati del confronto tra i gruppi mediante Tukey post-hoc test (Tab 2). Barre con lettere uguali non presentano differenze statisticamente significative. Per gli istogrammi 1 e 4B, le analisi statistiche non hanno evidenziato differenze tra i trattamenti (cfr. pgrf 5.5).

test post-hoc di Tukey							
Variabile dipendente			Differenza fra medie (I-J)	Errore std.	Sig.	confidenza 95%	
						Limite inferiore	Limite superiore
Gaster-rising	nettare	miele	6,200*	2,052	,015	1,11	11,29
		niente	8,900*	2,052	,001	3,81	13,99
	miele	nettare	-6,200*	2,052	,015	-11,29	-1,11
		niente	2,700	2,052	,399	-2,39	7,79
	no alimentazione	nettare	-8,900*	2,052	,001	-13,99	-3,81
		miele	-2,700	2,052	,399	-7,79	2,39
Mandibole aperte	nettare	miele	4,000*	1,014	,001	1,49	6,51
		niente	3,800*	1,014	,002	1,29	6,31
	miele	nettare	-4,000*	1,014	,001	-6,51	-1,49
		niente	-,200	1,014	,979	-2,71	2,31
	no alimentazione	nettare	-3,800*	1,014	,002	-6,31	-1,29
		miele	,200	1,014	,979	-2,31	2,71
Morsi	nettare	miele	25,000*	4,987	,000	12,64	37,36
		niente	19,500*	4,987	,002	7,14	31,86
	miele	nettare	-25,000*	4,987	,000	-37,36	-12,64
		niente	-5,500	4,987	,521	-17,86	6,86
	no alimentazione	nettare	-19,500*	4,987	,002	-31,86	-7,14
		miele	5,500	4,987	,521	-6,86	17,86
Morso continuato	nettare	miele	7,100*	1,122	,000	4,32	9,88
		niente	4,200*	1,122	,002	1,42	6,98
	miele	nettare	-7,100*	1,122	,000	-9,88	-4,32
		niente	-2,900*	1,122	,040	-5,68	-,12
	no alimentazione	nettare	-4,200*	1,122	,002	-6,98	-1,42
		miele	2,900*	1,122	,040	,12	5,68

Tab 2 Confronti multipli di Tukey (ne-way Anova) inerenti i moduli comportamentali in relazione al trattamento (nettare, miele, no alimentazione).

Le analisi della curva di sopravvivenza hanno evidenziato una differenza statisticamente significativa tra i trattamenti nei tassi di sopravvivenza delle prede ($\chi^2_{(2)} = 53,82$; $p < 0,001$). Formiche che hanno assunto nettare uccidono più rapidamente le prede. Infatti già dopo 4 ore si registra un abbattimento del tasso di sopravvivenza delle cimici a circa il 60% che nell'arco delle 24 ore si riduce a zero, poiché tutte le cimici sono state attaccata e uccisa. Per formiche che non hanno assunto alimenti registriamo un risultato comparabile il giorno successivo alle 48h. In ultimo, nelle arene con formiche che hanno assunto miele si evidenzia alle 24h un tasso di sopravvivenza ancora dell'80%. (Fig 5.15).

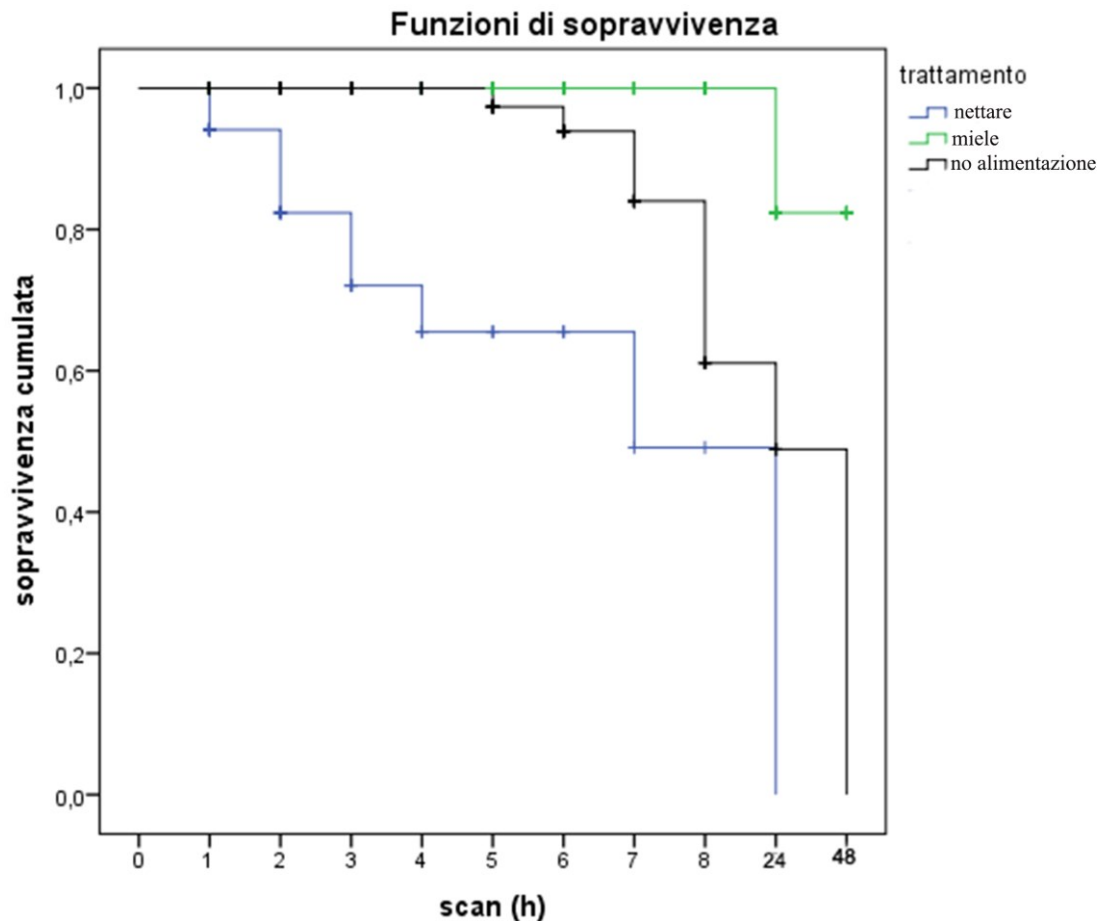


Fig 5.15 Curva di sopravvivenza di *H. halys* in presenza di *C. scutellaris*: la curva mostra la % di sopravvivenza della preda in funzione dei tre trattamenti a cui sono state sottoposte le formiche (nettare, miele e nessuna alimentazione). In ascissa sono riportati gli scan-sampling in termini di ore dall'inizio dell'esperimento.

B) Analisi dei parametri sull'attività locomotoria: Le analisi statistiche hanno dimostrato una differenza significativa tra i trattamenti nella distanza percorsa (ANOVA: $F_{(2, 116)} = 14,82$; $p < 0,001$). I test post-hoc evidenziano che le formiche che hanno assunto nettare percorrono in arena una distanza maggiore ($278 \text{ cm} \pm 18 \text{ se}$) rispetto a formiche che hanno mangiato miele ($151 \text{ cm} \pm 17 \text{ se}$) e a formiche che non hanno mangiato ($187 \text{ cm} \pm 16 \text{ se}$). Tra gli altri trattamenti non è stata rilevata differenza significativa (per i dettagli sui post-hoc cfr. Tab3-1) (Fig 5.16-1). Anche la analisi sulla velocità ha evidenziato una differenza altamente significativa tra i trattamenti. (ANOVA: $F_{(2, 116)} = 17,56$; $p < 0,001$). Anche in questo caso i test post-hoc (Tab 3-2) mostrano che le formiche che hanno assunto nettare si muovono in arena ad un velocità maggiore ($0,97 \text{ cm/sec} \pm 0,06 \text{ s e}$), rispetto alle formiche che hanno assunto miele ($0,50 \text{ cm/sec} \pm 0,05 \text{ se}$) e che non si sono nutrite ($0,64 \text{ cm/sec} \pm 0,05 \text{ se}$) (Fig 5.16-2). L'effetto della assunzione di nettare rispetto agli altri trattamenti è evidente anche nell'analisi della mobilità (ANOVA: $F_{(2, 116)} = 13,23$; $p < 0,001$) (Fig 5.16-3). In particolare, le formiche che si sono cibate di nettare hanno manifestato una mobilità

maggiore ($91 \text{ sec} \pm 7,2 \text{ se}$) rispetto a formiche che hanno mangiato miele ($37,00 \text{ sec} \pm 7,4 \text{ se}$) e formiche che non hanno mangiato ($58,4 \text{ sec} \pm 7,7 \text{ se}$) (per i dettagli sui post-hoc cfr. Tab3-4). L'analisi della immobilità ha evidenziato differenze statistiche tra i trattamenti (ANOVA: $F_{(2, 116)} = 15,21$; $p < 0,001$). Come in precedenza i post hoc test di Tukey mostrano la presenza di due gruppi; formiche che hanno assunto miele ($260 \text{ sec} \pm 7,3 \text{ se}$) e che non si sono alimentate ($240 \text{ sec} \pm 7,7 \text{ se}$) non presentano differenze statisticamente significative, rispetto al gruppo di formiche che hanno assunto nettare ($202 \text{ sec} \pm 7,4 \text{ se}$) che evidenzia i valori più bassi di immobilità (Fig 5.16-4) (Tab3-4).

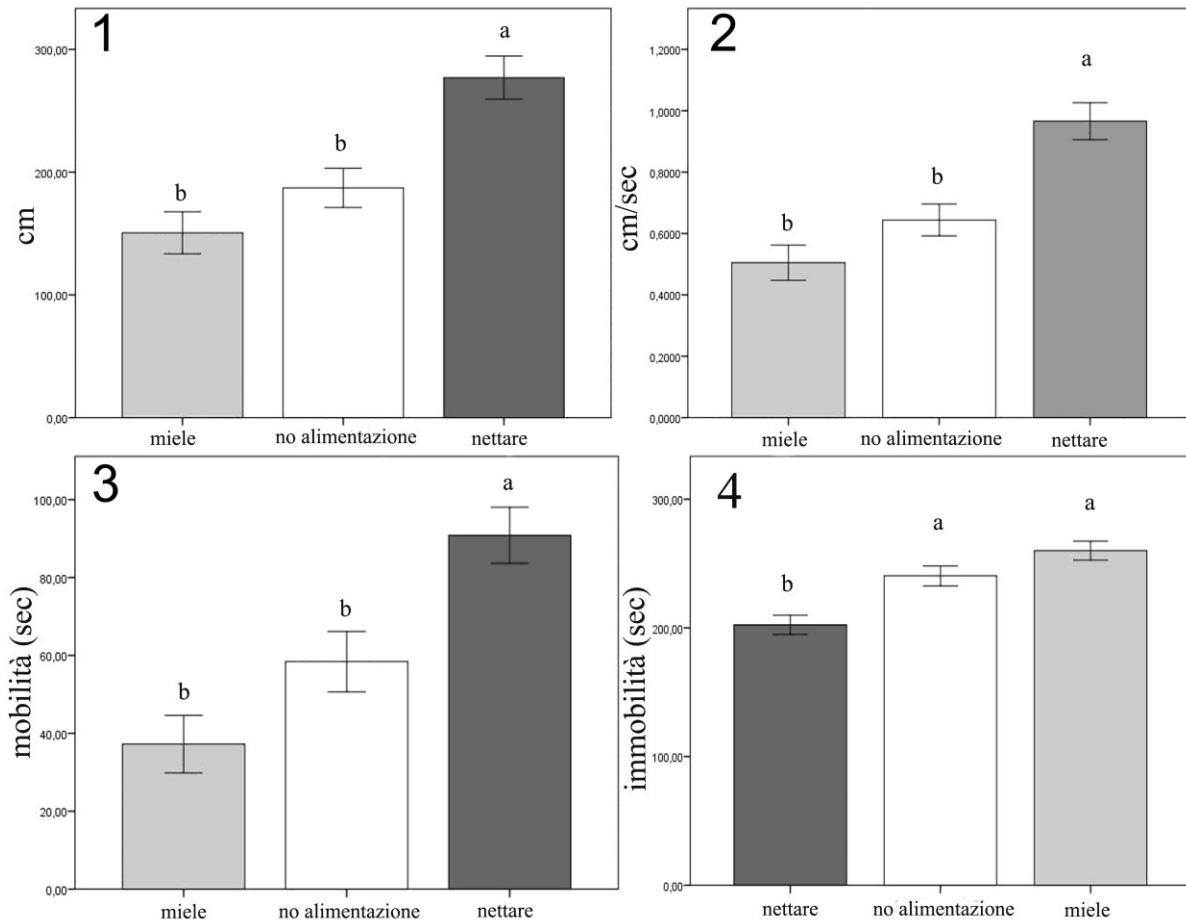


Fig 5.16: Effetti dei trattamenti alimentari sulle variabili locomotorie di *C. scutellaris*. Le barre presenti negli istogrammi (\pm errore standard, one-way Anova) indicano i valori medi. Le lettere presenti sulle barre rappresentano i risultati del confronto tra i gruppi mediante Tukey post-hoc test. Barre con lettere uguali non presentano differenze statisticamente significative (per i dettagli sui post-hoc cfr. Tab3- 1-2-3-4).

test post-hoc di Tukey							
Variabile dipendente		Differenza fra medie (I-J)	Errore std.	Sig.	confidenza 95%		
					Limite inferiore	Limite superiore	
Distanza	nettare	miele	126,34871*	23,86330	,000	69,6931	183,0044
		no alimentazione	89,73300*	24,01579	,001	32,7153	146,7507
	miele	nettare	126,34871*	23,86330	,000	-183,0044	-69,6931
		no alimentazione	-36,61572	24,01579	,283	-93,6334	20,4020
	no alimentazione	nettare	-89,73300*	24,01579	,001	-146,7507	-32,7153
		miele	36,61572	24,01579	,283	-20,4020	93,6334

Variabile dipendente 2			Differenza fra medie (I-J)	Errore std.	Sig.	95%	
						Limite inferiore	Limite superiore
velocità	nettare	miele	,4613289*	,0798078	,000	,271851	,650807
		niente	,3221189*	,0803178	,000	,131430	,512807
	miele	nettare	-,4613289*	,0798078	,000	-,650807	-,271851
		niente	-,1392100	,0803178	,197	-,329898	,051478
	no alimentazione	nettare	-,3221189*	,0803178	,000	-,512807	-,131430
		miele	,1392100	,0803178	,197	-,051478	,329898

Variabile dipendente 3			Differenza fra medie (I-J)	Errore std.	Sig.	confidenza 95%	
						Limite inferiore	Limite superiore
Mobilità	nettare	miele	53,60800*	10,49454	,000	28,6921	78,5239
		no alimentazione	32,42562*	10,56159	,007	7,3505	57,5007
	miele	nettare	-53,60800*	10,49454	,000	-78,5239	-28,6921
		no alimentazione	-21,18238	10,56159	,115	-46,2575	3,8927
	no alimentazione	nettare	-32,42562*	10,56159	,007	-57,5007	-7,3505
		miele	21,18238	10,56159	,115	-3,8927	46,2575

Variabile dipendente 4			Differenza fra medie (I-J)	Errore std.	Sig.	Intervallo di confidenza 95%	
						inferiore	superiore
Immobilità	nettare	miele	-57,61200*	10,61808	,000	-82,8212	-32,4028
		no alimentazione	-37,99903*	10,68593	,002	-63,3693	-12,6288
	miele	nettare	57,61200*	10,61808	,000	32,4028	82,8212
		no alimentazione	19,61297	10,68593	,163	-5,7573	44,9832
	no alimentazione	nettare	37,99903*	10,68593	,002	12,6288	63,3693
		miele	-19,61297	10,68593	,163	-44,9832	5,7573

Tab 3 Confronti multipli di Tukey (one-way Anova) inerenti i parametri dell'attività locomotoria in relazione ai trattamenti alimentari (nettare, miele, no alimentazione).

C) Risposta a stimoli sociali (trail-following). Le analisi hanno evidenziato una differenza altamente significativa tra i trattamenti (ANOVA: $F_{(2, 197)} = 1127$; $p < 0,001$). Le formiche che hanno assunto nettare manifestano un comportamento alterato nella risposta al feromone di traccia, mostrando nel 90% dei casi l'incapacità di seguire la traccia (Fig 5.17). Al contrario, le formiche che hanno assunto miele o che non si sono alimentate mostrano un normale comportamento di trail-following. L'effetto dell'assunzione del nettare sul comportamento delle formiche è risultato reversibile, poiché i soggetti saggiati nuovamente dopo 2 ore non hanno evidenziato difficoltà nella risposta al feromone di traccia. In questo caso, l'analisi statistica non ha evidenziato differenze significative tra i trattamenti (ANOVA: $F_{(2,197)} = 1,01$; $p = 0,36$) (Fig 5.18).

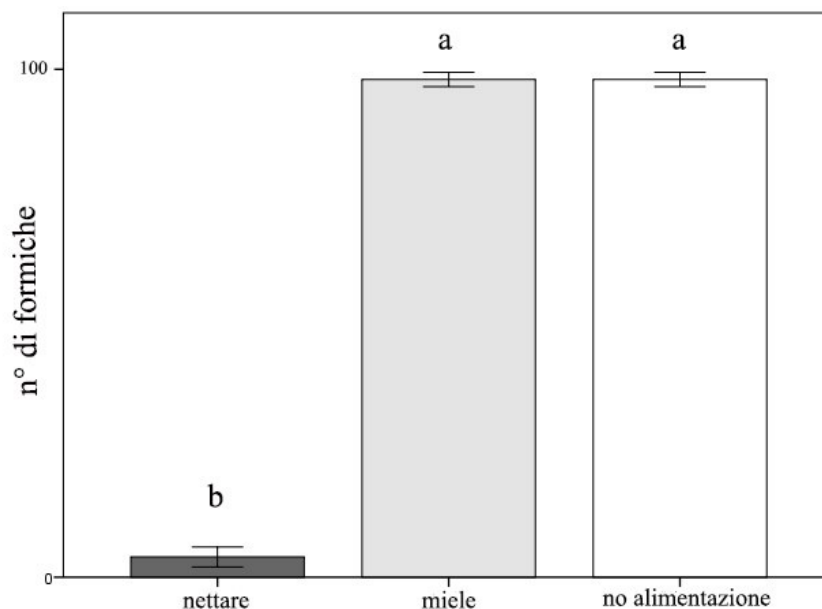


Fig 5.17 Le barre presenti nell'istogramma (\pm errore standard, one-way Anova) indicano il numero medio di formiche che reagiscono al feromone di traccia dopo 15 min. Le lettere presenti sulle barre indicano i risultati dei test post hoc di Tukey; barre con lettere uguali non presentano differenze statisticamente significative.

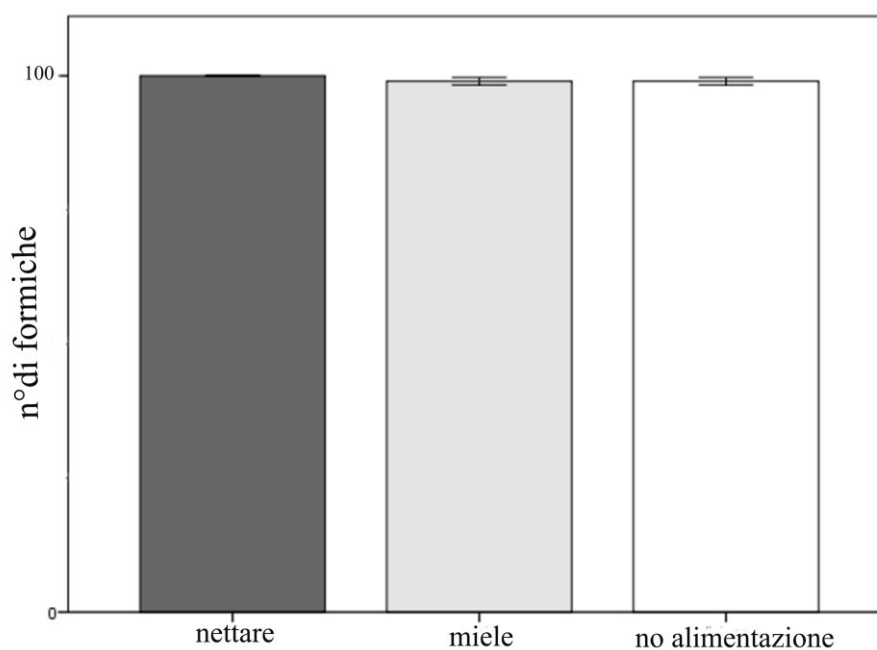


Fig 5.18 Le barre presenti nell'istogramma (\pm errore standard, one-way Anova) indicano il numero medio di formiche che reagiscono al feromone di traccia dopo 2 ore. Le analisi statistiche non hanno evidenziato differenze tra i trattamenti (cfr. pgrf 5.5 C).

5.6 Discussione e conclusioni

Gli esperimenti condotti su *P. avium* evidenziano, come dimostrato anche per gli altri modelli vegetali (rif cap3), un consistente effetto di protezione da parte delle formiche, con una riduzione del numero di insetti masticatori sulle piante e una consistente diminuzione del danno fogliare. La

stima della quantità di nettare secreto evidenzia una differenza significativa con una produzione maggiore di nettare da parte di piante con presenza di formiche. Studi presenti in letteratura descrivono una sincronizzazione nell'incremento di nettare secreto in piante di *Prunus serotina* in relazione allo sviluppo del bruco di *Melacosoma americanum* (Tilman, 1978; Mathews, 2005). Infatti i bruchi defogliatori di questo lepidottero possono provocare consistenti danni sulle piante. Variazione del numero di nettari extraflorali e della quantità di nettare sono state descritte per *P. avium* tramite esperimenti di laboratorio in seguito a danni fogliari meccanici indotti artificialmente sulle piante (Pulice & Packer, 2008). I risultati ottenuti nel presente studio, in condizioni naturali e in laboratorio evidenziano una situazione differente. Infatti, pur in presenza di coleotteri defogliatori, le piante in assenza di formiche producono un quantitativo minore di nettare rispetto alle piante con presenza di formiche. In questo caso infatti, la presenza delle formiche coincide con una consistente diminuzione dei coleotteri rispetto alle piante senza formiche. I risultati sono coerenti con quanto descritto in precedenza sulla produzione di nettare extraflorale in *Vicia faba* (rif cap 4). Anche in questo caso sia in esperimenti in laboratorio che in campo abbiamo evidenziato una maggiore produzione di nettare extraflorale in piante prive di danni fogliari con la sola presenza delle formiche. I dati da noi ottenuti suggeriscono per entrambe le specie vegetali, una risposta nella fisiologia della produzione del nettare, strettamente legata alle interazioni con le formiche e, diversa da quanto ottenuto tramite danni meccanici artificiali (Mondor & Addicott, 2003). Nostre osservazioni comportamentali e analisi preliminari di tipo microscopico e fisiologico suggeriscono che tale reazione potrebbe essere innescata dalle azioni meccaniche esercitate sul nettario dalle formiche nelle fasi di assunzione del nettare (Grasso et al, 2015; Nepi et al, 2018). Questo anche in accordo con dati riportati per altre piante modello come *Arabidopsis thaliana* in cui danni fogliari o alterazioni meccaniche provocati da insetti masticatori, possono innescare risposte fisiologiche con variazioni del profilo proteico della pianta (Truong et al, 2018).

Gli esperimenti in natura hanno inoltre evidenziato una variazione di differenti parametri comportamentali nelle formiche che si sono cibate di nettare extraflorale. I risultati evidenziano una differenza altamente significativa tra i trattamenti nel numero di ore passate sulla pianta. Formiche che si sono cibate di nettare rimangono sulla pianta per un numero maggiore di ore. Tale effetto risulta coerente con la risposta al feromone di traccia, infatti anche in questo caso le formiche che hanno assunto nettare extraflorale mostrano una modificazione del comportamento e, dopo alcuni minuti dalla assunzione, non rispondono adeguatamente allo stimolo sociale. Tale effetto tuttavia non risulta irreversibile, infatti i soggetti testati dopo due ore sono in grado nuovamente di seguire la traccia. La permanenza continuativa per vari giorni sulla pianta a seguito dell'assunzione del nettare potrebbe essere, almeno in parte, spiegabile con questo deficit indotto nella capacità di trail-following; attività che regola gli spostamenti delle foraggiatrici e delle operaie da e verso la colonia.

Questa presenza continuativa sulla pianta, associata ad una attività esplorativa intensa e frenetica, potrebbe garantire alla pianta un efficiente livello di protezione. Le visite sui nettari brevi e ripetute potrebbero consentire alla formica di reiterare l'assunzione di nettare mantenendo costanti gli effetti sul suo comportamento e quindi, una alta capacità di movimento e esplorazione delle zone circostanti al nettario. A supporto di tali considerazioni gli effetti sui parametri di locomozione che, anche in questo caso, evidenziano una alterazione del comportamento. Infatti per formiche che hanno assunto nettare è possibile descrivere un maggior tasso di mobilità, una maggiore distanza percorsa ed una velocità più alta rispetto agli altri trattamenti. La presenza di peculiari metaboliti secondari o la variazione del profilo chimico del nettare indotta dalla pianta a seguito della interazione con le formiche potrebbe spiegare le alterazioni comportamentali evidenziate nei vari esperimenti (Grasso et al, 2015; Nepi et al, 2018). Le formiche, in ogni caso, sembrano essere suscettibili all'assunzione di vari alcaloidi (ad es. caffeina, nicotina, cocaina). I test di laboratorio condotti su *Myrmica sabuleti* hanno fatto registrare variazioni nella loro attività locomotoria (Cammaerts et al, 2014).

In conclusione, i dati raccolti nel presente lavoro supportano, l'ipotesi di una stretta relazione tra formiche e piante caratterizzata anche da elementi di manipolazione. Manipolando il comportamento delle formiche tramite metaboliti secondari, le piante ottimizzerebbero e massimizzerebbero la azione delle formiche quali "body guard" (sistema di difesa indiretta). Questo azione di controllo può rappresentare un meccanismo per stabilizzare le interazioni con il partner. In questa ottica molte interazioni tra formiche e piante potrebbero nascondere fenomeni di "mutualismo coercitivo" mediato da sostanze presenti nel nettare extrafioreale (Grasso et al, 2015; Nepi et al. 2018) come dimostrato nel caso di *Acacia cornigera*. Il nettare extrafioreale di questa pianta infatti determina una manipolazione fisiogastrica della formica *Pseudomirmex ferrugineus*. Il nettare assunto dalle formiche contiene alcune proteine (chitinasi) che inattivano l'enzima invertasi, presente nel tratto digerente delle formiche e in grado di scindere il saccarosio. Tale inattivazione porta le formiche a nutrirsi esclusivamente del nettare della pianta privo di saccarosio (Heil et al, 2005). L'ipotesi manipolativa è corroborata da alcuni studi condotti sul nettare floreale che hanno evidenziato la presenza di differenti sostanze neuroattive in grado in grado di condizionare il comportamento degli insetti pronubi (Baracchi et al, 2017; Nepi et al, 2018).

I dati preliminari da noi raccolti sembrano supportare questa ipotesi (Nepi et al, 2017), ulteriori analisi, fisiologiche, chimiche e di metabolomica sul nettare di *P. avium* in fase di realizzazione con la collaborazione del Prof. Massimo Nepi dell'Università di Siena e il Prof. Stefano Mancuso dell'Università di Firenze; associate ad appropriati esperimenti comportamentali dovrebbero chiarire definitivamente questo interessante fenomeno.

CAPITOLO 6

Interazione tra formiche e piante del genere *Quercus* spp mediate da galle di *Andricus quercustozae*

6.1 Introduzione e scopo

Le galle vengono definite come escrescenze anomale del tessuto della pianta. Tali escrescenze possono essere causate da insetti parassiti o altri organismi (Redfern & Shirley, 2002; Price, 2005). Le prime stime risalenti a circa cinquanta anni fa stimavano a circa 13000 insetti responsabili della formazione di galle, più recentemente le stime superano le 132000 specie (Mani, 1964; Stone & Schönrogge, 2003; Shorthouse et al, 2005; Espírito-Santo & Fernandes, 2007). I meccanismi alla base della formazione delle galle sono ancora poco conosciuti (Stone et al, 2002; Schönrogge et al, 2000), evidenze in letteratura suggeriscono che non sia il galligeno a produrre e iniettare nei vari tessuti della piante sostanze in grado di provocare una crescita anomala del tessuto. La sua formazione infatti sarebbe dovuta a sostanze rilasciate successivamente dall'uovo e dalla larva durante le fasi di crescita (Stone et al, 2002; Ronquist et al, 2015). In letteratura vengono fornite differenti interpretazioni sul significato evolutivo delle galle. La “nutrition hypothesis”, secondo cui la manipolazione del tessuto consente una ottimizzazione nella ricerca di cibo da parte della larva; La “microenvironment hypothesis” in cui queste strutture rappresenterebbero un rifugio contro stress abiotici e la “enemy hypothesis” secondo cui le galle rappresenterebbero un rifugio per i galligeni contro i predatori (Schönrogge et al, 2000). In letteratura sono descritti casi particolari che descrivono da parte di galle (indotte da alcune specie di galligeni) la produzione di nettare extrafiorente che media l'interazione con differenti insetti tra cui anche le formiche (Aranda-Rickert et al, 2017). I risultati descrivono che la presenza delle formiche, garantita dal consumo di nettare extrafiorente, ha evidenziato una diminuzione della mortalità del galligeno ad opera di altri imenotteri parassitoidi (Fernandes et al, 1999). Le galle infatti supportano differenti comunità di insetti parassiti e dei loro predatori. Inoltre rappresentano un rifugio per altri insetti come coleotteri e lepidotteri considerati occupanti secondari. Tali strutture, in seguito allo sfarfallamento del galligeno, risultano un ambiente ideale per accogliere le colonie di formiche. In letteratura sono presenti scarse informazioni sulle specie ritrovate all'interno di queste strutture (Torossian, 1972; Espadaler & Nieves, 1983). Le galle possono mediare l'interazione tra differenti specie di formiche e le piante. Nel presente studio sono state prese in considerazione galle indotte da *Andricus quercustozae* (Fig 6.1). Tale specie appartenente al gruppo dei *Cynipini* è stata studiata in Spagna in relazione a differenti specie del genere *Quercus*.

In assenza di dati esaustivi sulla presenza, colonizzazione e, in assenza di dati sui possibili effetti dovuti alla presenza delle formiche sulle piante, il presente studio si propone di valutare:

- 1) field survey: quantificare le specie di formiche presenti nelle galle e la loro topografia sulla pianta, in funzione della posizione sulla pianta e delle dimensioni delle galle, con particolare attenzione alla specie più abbondante *C. scutellaris*;
- 2) esperimento in campo: Tasso di colonizzazione annuo e scelta della galla in relazione alla posizione della galla sulla pianta e alla dimensione con particolare attenzione alla specie più abbondante *C. scutellaris*;
- 3) descrizione dell'architettura interna delle galle in relazione alla specie di formica presente;
- 4) analisi dell'area e del volume di scavo;
- 5) analisi degli eventuali effetti della presenza delle formiche sul benessere della pianta.



Fig 6.1 Galle di *Andricus quercustozae*.

6.2 Field survey

6.2.1 Materiali e metodi

6.2.1.1 Area di studio e selezione delle galle

Il field survey e gli esperimenti sono stati condotti in un'area boschiva in alta Toscana in località Lunigiana nei pressi del paese di Fornoli-MS (44°15'17.5"N 9°58'04.9"E; altitudine ca. 75 m). Nell'area sono state collezionate galle di *Andricus quercustozae* (Hymenoptera; Cynipidae) su piante di *Quercus spp.* Sono state raccolte solo galle sulle piante che presentavano il foro di uscita

dell'insetto galligeno. Tutte le misure sono state condotte presso il laboratorio di mirmecologia dell'Università di Parma.

6.2.1.2 Raccolta dati

Le galle sono state collezionate in un'area di 300 m² nel periodo compreso tra Ottobre e Novembre 2016. Durante la fase di raccolta per ogni galla è stata misurata l'altezza dal suolo e assegnato un codice identificativo. Successivamente in laboratorio ogni galla è stata controllata e sono state escluse galle con evidenti danni (porzioni mancanti) o con presenza di segni visibili di parassitizzazione da parte di altri artropodi oltre le formiche (ragni o coleotteri). Per le galle selezionate è stata misurata: l'altezza (distanza tra il punto di attacco sul ramo e l'apice della galla), la larghezza (dimensione maggiore sulla linea perpendicolare all'altezza). Successivamente ogni galla è stata sezionata in due parti. La sezione è stata ottenuta tagliando la galla lungo la linea dell'altezza e, considerando come riferimento il foro di uscita del cinipede, collocato nella porzione mediana di una metà della galla (Fig 6.2). Per ogni galla è stato analizzato il contenuto valutando la specie di formica presente e la presenza della regina, di operaie e uova. I campioni raccolti sono stati identificati mediante l'ausilio di chiavi dicotomiche (Hölldobler & Wilson, 1990; Bolton, 1994). La discriminazione a livello di specie è stata realizzata con la collaborazione del Dr. Fabrizio Rigato (Museo di Storia Naturale di Milano).

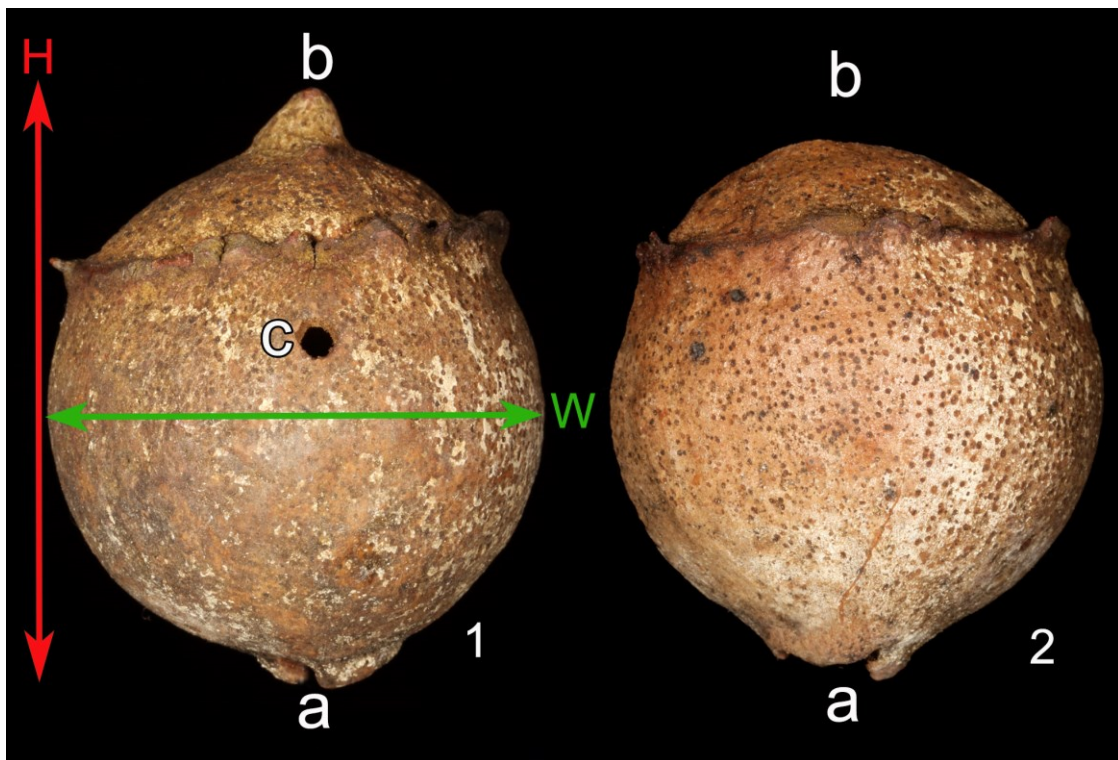


Fig 6.2 L'immagine mostra i parametri misurati sulle galle e la procedura di taglio. La linea verticale (H) identifica l'altezza, misurata come la distanza tra il punto di inserimento della galla sul ramo dell'albero (a) e l'apice opposto (b). La linea orizzontale (W) identifica la larghezza, misurata come la distanza maggiore perpendicolare all'altezza. Ogni galla è stata divisa in due metà (1, 2) in relazione alla linea (H), mantenendo il foro del galligeno (c) nella metà di una delle due galle.

6.2.1.3 Analisi statistiche

Per valutare eventuali differenze tra le specie è stata condotta una analisi della varianza (one-way Anova) in funzione di tre variabili: 1) posizione sulla pianta, 2) altezza della galla, 3) larghezza della galla. Le specie costituiscono il fattore fisso e quando necessario sono stati condotti dei test Post Hoc di Tukey.

Per *C. scutellaris*, la specie che ha colonizzato il maggior numero di galle (Fig 6.3), sono state create 4 categorie in funzione della composizione delle colonie: 1) galle con regina, 2) galle con regina, operaie e prole, 3) galle con operaie e prole, 4) galle con sole operaie. In funzione delle categorie è stata effettuata una analisi della Vairanza (one-way Anova) per valutare differenze nella scelta in funzione della dimensione delle galle e della loro posizione sulla pianta. Tutte le analisi sono state effettuate mediante il programma IBM SPSS 14.0 (pacchetto Windows).



Fig 6.3 *C. scutellaris* in galle di *A. quercustozae*.

6.2.2 Risultati

Dopo la selezione preliminare, sono state misurate e analizzate 100 galle. L'analisi ha evidenziato 74 galle colonizzate dalle formiche: 39 galle con *Crematogaster scutellaris* (Olivier, 1792), 1 *Crematogaster scutellaris nigra* (Krausse, 1912), 1 con *Camponotus fallax* (Nylander, 1856), 1 con *Camponotus lateralis* (Olivier, 1792), 9 galle con *Colobopsis truncata* (Spinola, 1808), 4 con

Dolichoderus quadripunctatus (Linnaeus, 1771), 6 con *Temnothorax albipennis* (Curtis, 1854), 5 con *Temnothorax aveli* (Bondroit, 1918), 1 con *Temnothorax niger* (Forel, 1894), 1 con *Temnothorax nylanderi* (Foerster, 1850), 1 con *Temnothorax parvulus* (Schenck, 1852), 5 con *Temnothorax unifasciatus* (Latreille, 1798). Le 26 galle rimanenti sono state classificate come segue: 21 vuote, 4 con presenza di muffe, 1 con coleotteri.

Composizione delle colonie:

Tutte le specie del genere *Temnothorax* e del genere *Camponotus* presentano galle con regina operaie e uova. *C. truncata* presenta 8 galle con operaie e 1 galla con regina, operaie e prole. Invece *D. quadripunctatus* presenta tutte le galle con solo operaie. Infine *C. scutellaris* presenta 3 galle con solo regina, 14 galle con regina operaie e prole, 20 galle con operaie e prole e 3 galle con solo operaie.

Dalle analisi sono state escluse galle con $n < 5$ (4 galle con muffa, 1 galla con coleotteri, *D. quadripunctatus*, *Camponotus spp*, *C. scutellaris nigra*). Per la analisi statistiche, le galle con presenza del genere *Temnothorax* sono state organizzate in un solo gruppo (*Temnothorax spp*).

L'analisi statistica condotta su 88 galle, ha evidenziato una differenza statisticamente significativa nella dimensione e posizione delle galle in funzione delle specie presenti (Posizione sulla pianta: $F_{(3,84)} = 52,26$; $p < 0,001$; Altezza della galla: $F_{(3,84)} = 12,26$; $p < 0,001$; Larghezza della galla: $F_{(3,84)} = 23,76$; $p < 0,001$). In relazione alla posizione sulla pianta i Tuckey Post Hoc tests hanno mostrato la presenza di 3 differenti gruppi. *C. scutellaris* e *C. truncata* hanno colonizzato galle in posizioni più alte sulla pianta, le galle vuote si trovano nella posizione più bassa della pianta, mentre le galle colonizzate da *Temnothorax spp* formano un gruppo in posizione intermedia. Per quanto riguarda la altezza della galla, si evidenziano 2 gruppi: galle più grandi sono colonizzate da *C. scutellaris* e *C. truncata*, mentre galle più piccole sono colonizzate da *Temnothorax spp* o sono vuote. Per la larghezza, i Post Hoc Tests evidenziano la presenza di 3 gruppi: *C. scutellaris* e *C. truncata* hanno colonizzato galle più larghe, le galle vuote sono le più strette, mentre le galle colonizzate da *Temnothorax spp* formano un gruppo in posizione intermedia (Fig 6.4).

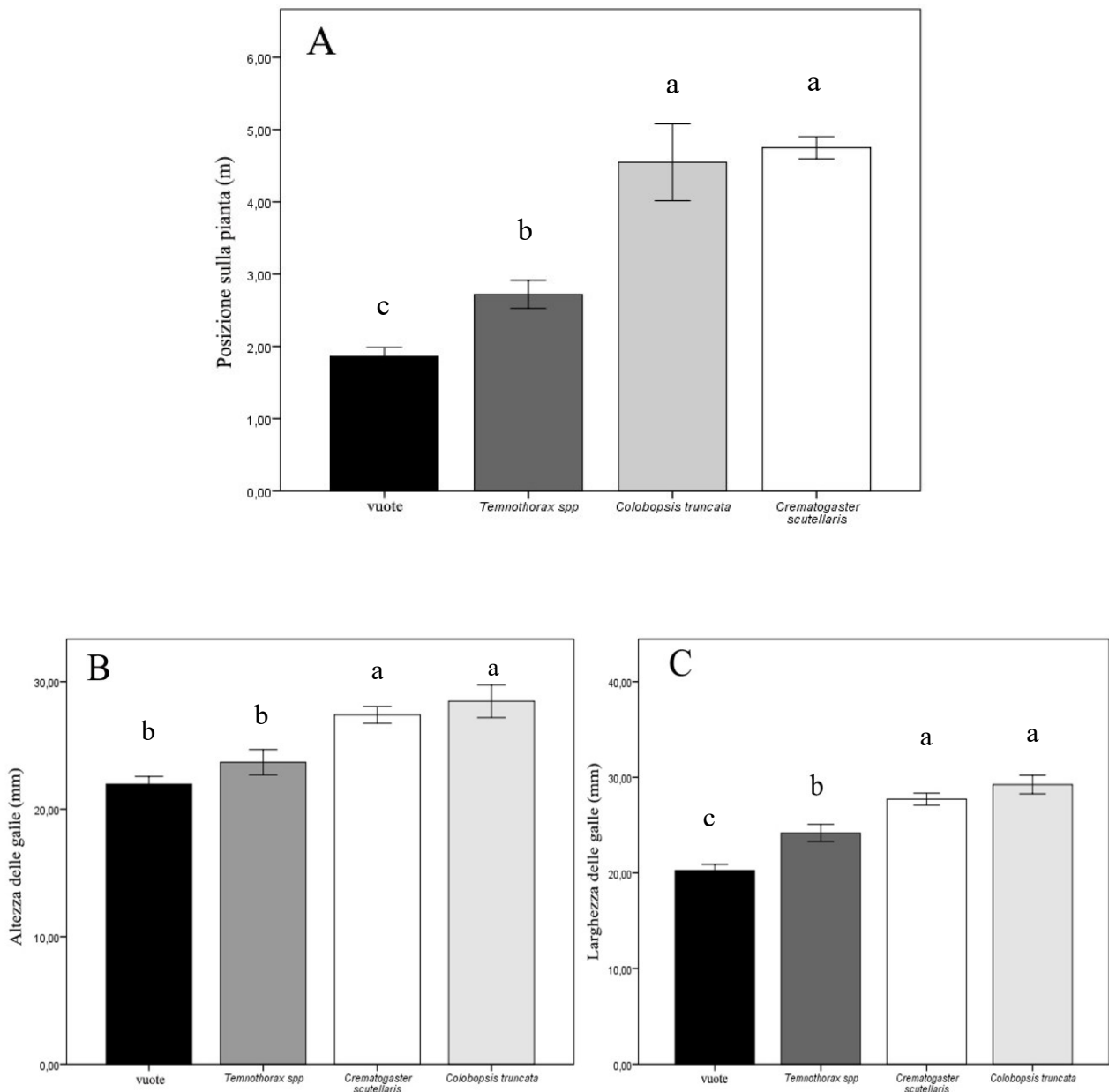


Fig 6.4 Le barre presenti negli istogrammi indicano i valori medi per ogni parametro analizzato (\pm errore standard, one-way Anova). Le variabili indicate sono: A) Poizione della galla sulla pianta m. B) Altezza della galla mm e C) larghezza delle galle mm. In ascissa sono presenti le differenti colonizzazioni delle galle analizzate. Le lettere presenti sulle barre indicano i risultati dei test post hoc di Tukey. Barre con lettere uguali non presentano differenze statistiche.

Per le successive analisi statistiche, le galle di *C. scutellaris* (n=39) sono state divise in due categorie:

- a) galle con regina (n=17);
- b) galle senza regina (n=22).

L'analisi della Varianza ha evidenziato una differenza statisticamente significativa nelle dimensioni delle galle in funzione della presenza della regina (Altezza della galla: $F_{(1,37)}= 17,49$; $p < 0,001$; Larghezza della galla: $F_{(1,37)}=19,41$; $p < 0,001$). Galle con regina presentano dimensioni ridotte

rispetto a galle senza regina (Altezza della galla: con regina mm $24,9 \pm 0,9$ se; senza regina mm $29,6 \pm 0,7$ se); (larghezza della galla: con regina $25,2 \pm 0,6$ mm; senza regina $30,0 \pm 0,8$ mm). L'analisi non ha evidenziato differenze statistiche in funzione della posizione sulla pianta ($F_{1,37}=1,96$; $p=0,169$; con regina m $4,6 \pm 0,2$ se; senza regina m $5,0 \pm 0,2$ se) (Fig 6.5).

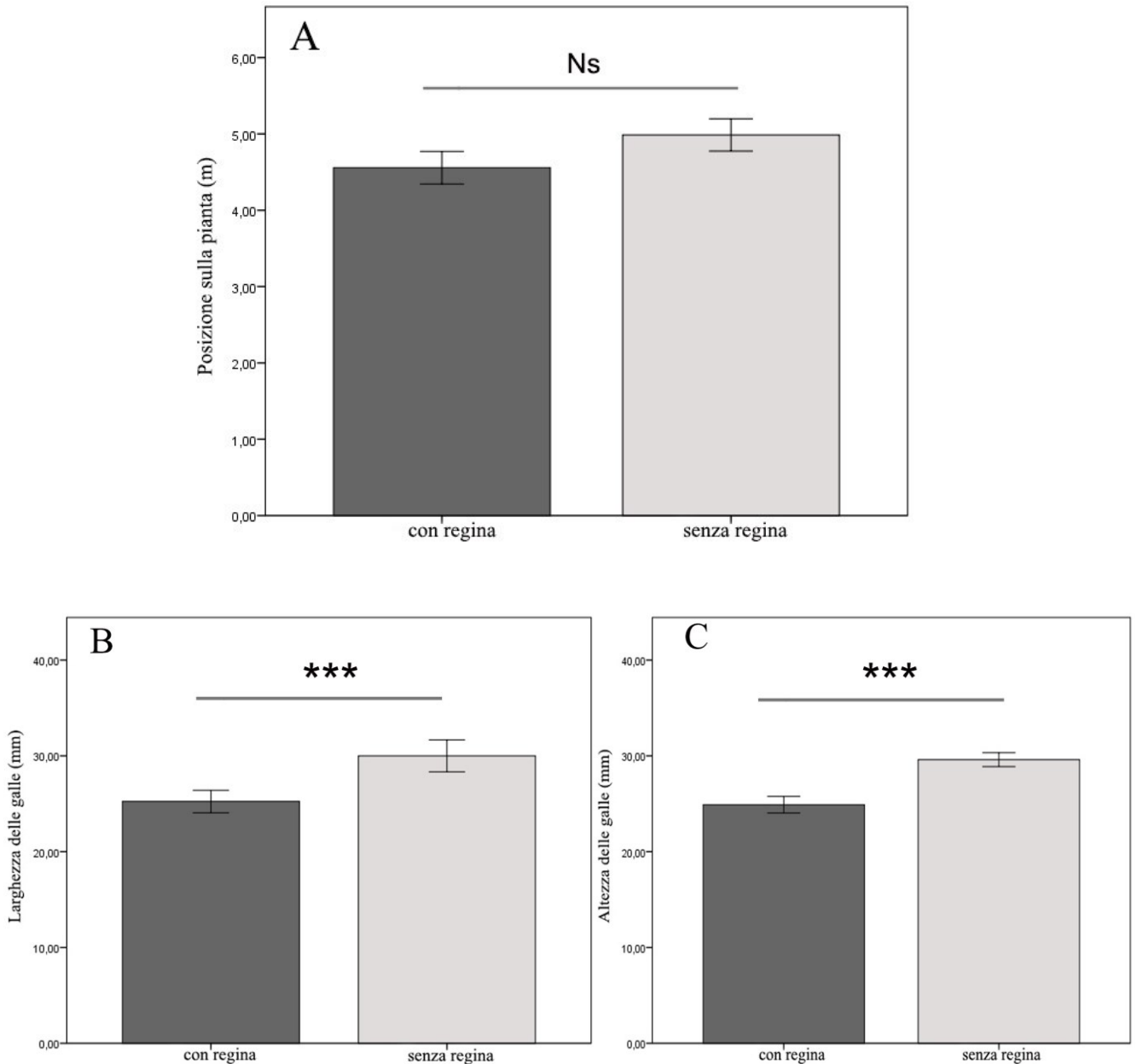


Fig 6.5 Le barre presenti negli istogrammi indicano i valori medi delle proporzioni delle galle colonizzate da *C. scutellaris* in relazione alla presenza/assenza della regina (\pm errore standard, one-way Anova). Le variabili indicate sono: A) Poizione della galla sulla pianta in funzione del tipo di colonizzazione. B) Altezza e C) Larghezza delle galle in relazione al tipo di colonizzazione. Gli asterischi presenti nel grafico indicano il livello di significatività (***; $p < 0,001$).

6.3 Tasso di colonizzazione delle galle e analisi dell'architettura interna

6.3.1 Materiali e metodi

A) Nell'area sperimentale che ha interessato il survey è stato selezionato un secondo set di galle $n=187$ nel periodo compreso da Ottobre a Novembre 2015. Sono state selezionate galle prive del foro di uscita del galligeno. Ogni galla è stata isolata mediante una cappuccio in rete in modo da evitare la colonizzazione da parte di formiche e altri artropodi. Un anno dopo (Ottobre -Novembre 2016) le galle sono state ispezionate. Sono state escluse ($n=76$) galle che non mostravano il foro di uscita del cinipide, galle danneggiate, colonizzate da formiche o altri artropodi o con presenza di danni strutturali. 111 galle sono risultate idonee e a queste è stata rimossa la copertura in rete. Dopo un anno (Ottobre -Novembre 2017) le galle sono state raccolte per valutare il tasso di colonizzazione e le specie di formiche interessate. Durante la fase di raccolta sono state escluse le galle danneggiate. Per ogni galla è stata misurata l'altezza dal suolo e assegnato un codice identificativo. Successivamente in laboratorio per ogni galla è stata misurata l'altezza (distanza tra la punto di attacco sul ramo e l'apice della galla) e la larghezza (porzione più larga della galla perpendicolare all'altezza) (Fig 6.2). Successivamente ogni galla è stata sezionata in due parti come in precedenza. Per ogni galla è stato analizzato il contenuto valutando: la specie di formica presente e la presenza di regina, operaie e prole. I campioni raccolti sono stati identificati mediante l'ausilio di chiavi dicotomiche (Hölldobler & Wilson, 1990; Bolton, 1994). La discriminazione a livello di specie è stata realizzata con la collaborazione del Dr. Fabrizio Rigato (Museo di Storia Naturale di Milano). Per *C. scutellaris*, la specie che ha colonizzato il maggior numero di galle, sono state create 4 categorie in funzione della composizione delle colonie: 1) galle con regina; 2) galle con regina, operaie e prole; 3) galle con operaie e prole; 4) galle con sole operaie.

Per valutare eventuali differenze tra le specie è stata condotta una analisi della varianza (one-way Anova) in funzione di tre variabili: 1) Posizione sulla pianta, Dimensioni della galla: 2) Altezza; 3) Larghezza. Le specie costituiscono il fattore fisso e quando necessario sono stati condotti dei test Post Hoc di Tukey. Per *C. scutellaris*, in funzione delle categorie è stata effettuata una analisi della Vairanza (one-way Anova) per valutare differenze nella dimensione delle galle. Tutte le analisi sono state effettuate mediante il programma IBM SPSS 24.0 (pacchetto Windows).

- B) Per le galle sezionate è stata effettuata una analisi dell'architettura interna. Le porzioni delle galle sono state descritte in modo qualitativo in funzione della forma, posizione dello scavo, proporzione di materiale rimosso e della presenza di particolari strutture. Le galle sono state classificate in 4 gruppi in funzione della specie (*Temonthorax spp*, *C. truncata*, *C. scutellaris* e vuote). Galle colonizzate da *C. scutellaris* sono state ulteriormente suddivise in 4 categorie in accordo con la composizione delle colonie come per il field survey: 1) galle con regina, 2) galle con regina, operaie e prole, 3) galle con operaie e prole, 4) galle con solo operaie.
- C) 8 galle per ognuno dei 7 precedenti gruppi (vuote, *Temonthorax spp*, *C. truncata*, e *C. scutellaris* con regina, *C. scutellaris* con regin, operaie e prole, *C. scutellaris* con operaie e prole e *C. scutellaris* con solo operaie) sono state analizzate per quantificare la proporzione di materiale rimosso nello scavo. Per ciascuna metà di ogni galla è stata ricavata una immagine 2D mediante la tecnica del focus stacking con l'ausilio di uno stereo microscopio (Zeiss Stemi 508, the Axiocam Erc 5s). I gruppi di galle rappresentano il fattore fisso e le differenze nell'area di scavo sono state investigate utilizzando una analisi della varianza (one-way Anova) e test Poct hoc di Tukey.
- D) Il volume di scavo delle galle colonizzate da *C.scutellaris* è stato valutato inoltre con l'utilizzo di calchi interni. Per i calchi è stata utilizzata una soluzione di acqua e alginato. La soluzione è stata versata in ogni porzione di galla e lasciata asciugare per 24h. Successivamente i calchi sono stati rimossi e assemblati con l'ausilio di colla poliuretanica. Il volume di scavo è stato calcolato mediante differenza di volume in acqua, in cilindri calibrati. Le galle sono state classificate come segue: 1) galle con regina; 2) galle con regina; operaie e prole; 3) galle con operaie e prole; 4) galle con solo operaie; 5) galle vuote. I gruppi di galle rappresentano il fattore fisso e, le differenze nel volume di scavo sono state investigate utilizzando una analisi della varianza (one-way Anova) e test Poct hoc di Tukey. Tutte le analisi sono state effettuate mediante il programma IBM SPSS 24.0 (pacchetto Windows).

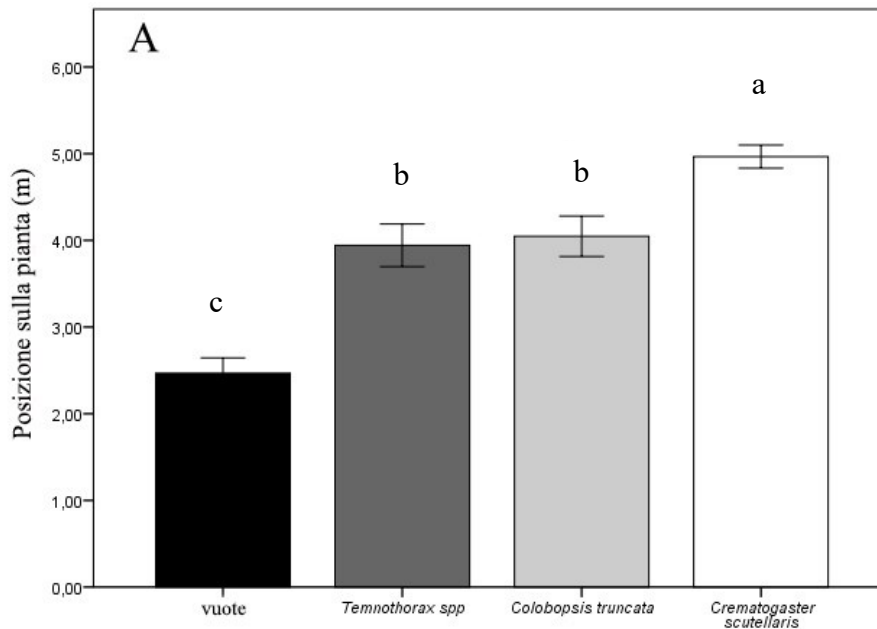
6.3.2 Risultati

A) Le 94 galle analizzate hanno mostrato il seguente contenuto: 69 galle con *Crematogaster scutellaris* (Composizione delle colonia: 23 galle con regina, 9 galle con regina operaie e prole, 28

galle con operaie e prole, 9 galle solo operaie), 12 galle con *Colobopsis truncata* (Composizione delle colonie: 9 galle con operaie, 3 galle con regina, operaie e prole), 3 con *Dolichoderus quadripunctatus* (Composizione delle colonie: solo operaie), 7 con *Temnothorax albipennis* (Composizione delle colonie: regina, operaie e prole), 3 con *Temnothorax unifasciatus* (Composizione delle colonie: regina, operaie e prole). Le rimanenti 17 galle sono state classificate come segue: 16 vuote, 1 con presenza di muffe.

Dalle analisi sono state escluse galle con $n < 5$ (galle con muffa, *D. quadripunctatus*). Per le analisi statistiche, le galle con presenza del genere *Temnothorax* sono state organizzate in un solo gruppo (*Temnothorax spp.*).

La analisi statistica ($n = 107$) ha evidenziato una differenza significativa nella dimensione delle galle e nella loro posizione sulle piante in relazione alle specie (Posizione sulla pianta: $F_{(3,103)} = 28,22$; $p < 0,001$; Altezza: $F_{(3,103)} = 15,90$; $p < 0,001$; Larghezza: $F_{(3,103)} = 21,36$; $p < 0,001$). Riguardo alla posizione sulla pianta, i test post-hoc di Tukey mostrano la presenza di 3 gruppi. *C. scutellaris* ha colonizzato galle in posizioni più alte sulla pianta, le galle vuote si trovano in posizione più bassa mentre le galle colonizzate da *Temnothorax spp* e *C. truncata* formano un gruppo in posizione intermedia. Per quanto riguarda le dimensioni della galla (altezza e larghezza in mm) si evidenziano 2 gruppi: galle più grandi sono colonizzate da *C. scutellaris*, *C. truncate* e *Temnothorax spp*, mentre le galle più piccole sono vuote (Fig 6.6).



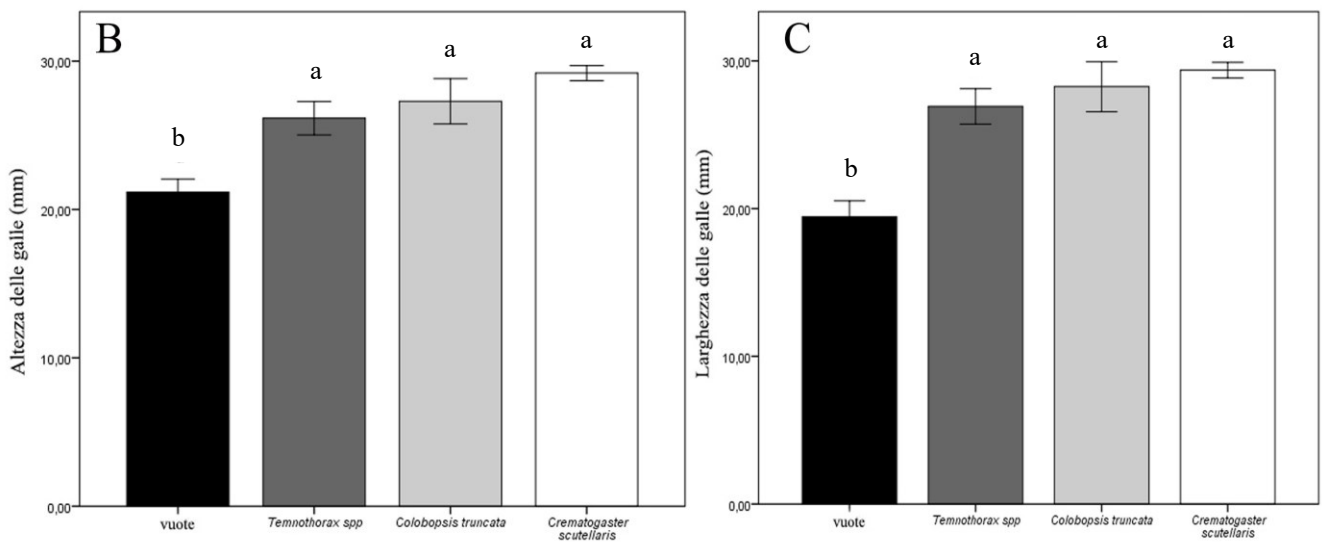


Fig 6.6 Esperimento 1: Le barre presenti negli istogrammi indicano i valori medi (\pm errore standard, one-way Anova) relativi a: A) poizione della galla sulla pianta; B) altezza in mm e C) larghezza delle galle in mm, in relazione al tipo di colonizzazione. In ascissa sono presenti le differenti tipologie di colonizzazione. Le lettere presenti sulle barre indicano i risultati dei test post hoc di Tukey. Barre con lettere uguali non presentano differenze statisticamente significative.

Per quanto riguarda la composizione della colonia nelle galle colonizzate da *C. scutellaris* (n=69), sono state divise in due categorie:

- a) galle con regina (n = 32),
- b) galle senza regina (n = 37).

L'analisi della Varianza ha evidenziato una differenza statistica nelle dimensioni delle galle in funzione della presenza della regina (Altezza della galla: $F_{(1,67)} = 15,471$; $p < 0,001$; Larghezza della galla: $F_{(1,67)} = 9,40$; $p = 0,003$). Galle con regina presentano dimensioni ridotte rispetto a galle senza regina (Altezza della galla: con regina, mm $27,0 \pm 0,8$ se; senza regina, mm $30,6 \pm 0,6$ se); (Larghezza della galla: con regina, mm $27,5 \pm 0,8$ se; senza regina, mm $30,6 \pm 0,6$ se). L'analisi non ha evidenziato differenze statistiche in funzione della posizione sulla pianta ($F_{(1,67)} = 0,90$; $p = 0,347$; con regina m $4,8 \pm 0,2$ se; senza regina m $5,1 \pm 0,2$ se) (Fig 6.7).

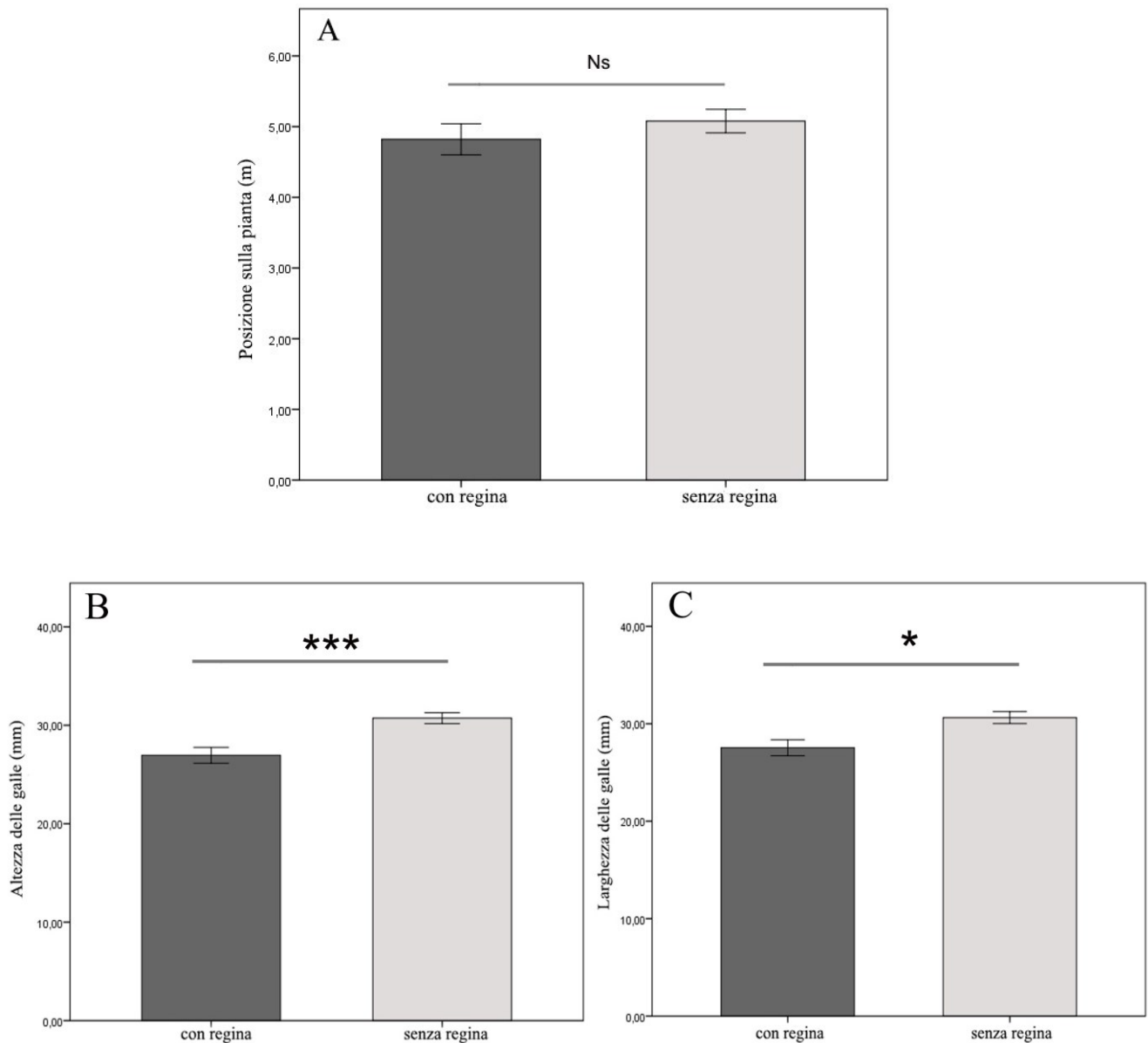


Fig 6.7 Le barre presenti negli istogrammi (\pm errore standard, barre verticali) indicano i valori medi delle galle colonizzate da *C. scutellaris* in funzione della presenza/assenza della regina. Le variabili indicate sono: A) Poizione della galla sulla pianta, B) Altezza delle galle in mm, C) Larghezza delle galle in mm. Gli asterischi presenti nel grafico indicano il livello di significatività (***, $p < 0,001$; *, $p < 0,005$).

B) Per quanto riguarda l'analisi qualitativa dell'architettura interna delle galle, le galle vuote presentano un'area cava con forma caratteristica (Fig 6.8 A) dove può essere ancora visibile il puparium del cinipide posizionato centralmente.

In galle occupate da *C. truncata* lo spazio cavo normalmente presente all'interno delle galle è ancora visibile ma è stato ampliato e l'area di scavo è concentrata nella porzione inferiore della galla. Lo scavo è organizzato in gallerie e camere di piccole dimensioni distribuite in modo radiale. A differenza di ciò che avviene nelle altre specie, la metà superiore delle galle non presenta tracce di scavo (Fig 6.8 B).

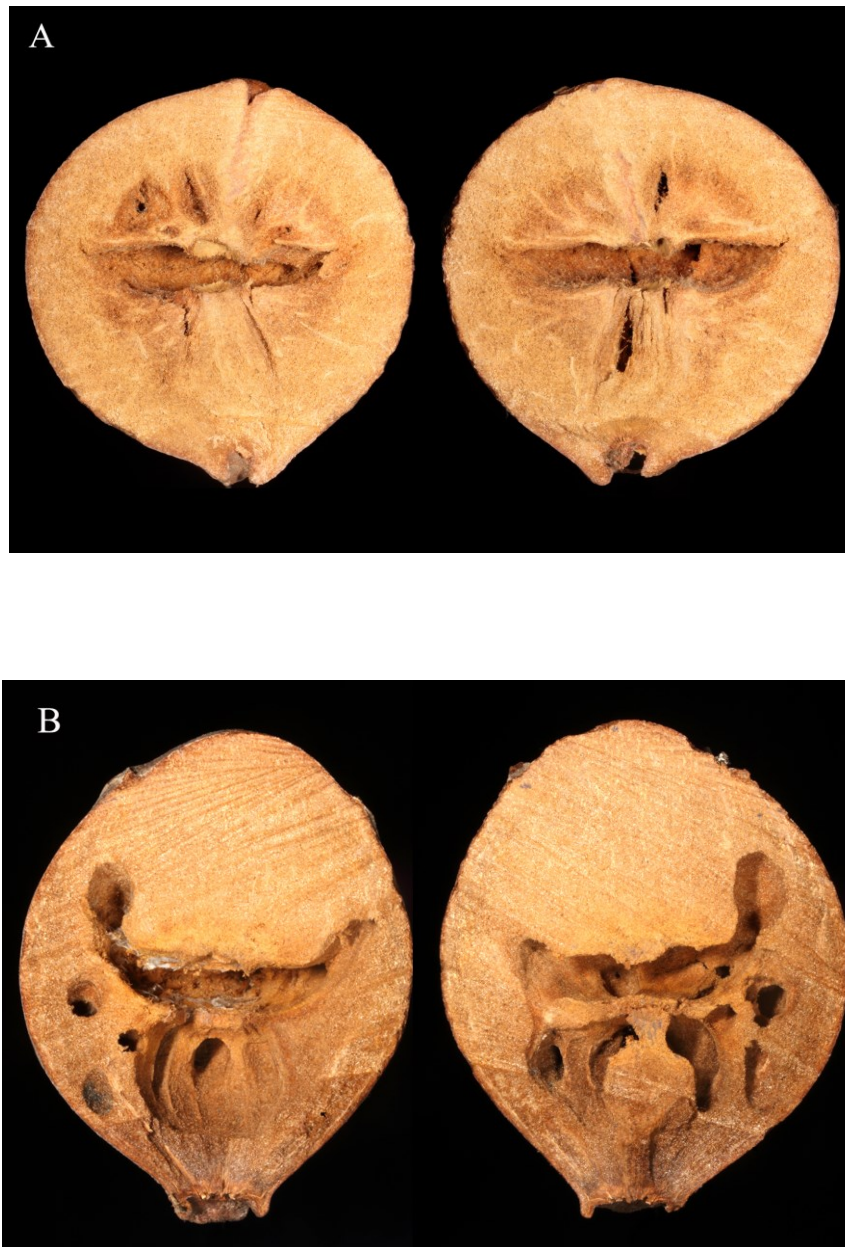


Fig 6.8 A) Esempio area cava normalmete presente all'interno di galle vuote; B) Esempio di architettura interna in una galla colonizzata da *C. truncata*.

In galle occupate da *Temnothorax spp* lo spazio centrale normalmete presente all'interno delle galle non è più visibile, dato che è attraversato da tunnel e gallerie ben evidenti e presenti in ogni parte della galla (Fig 6.9 C). Una sezione perpendicolare della galla evidenzia differenti sezioni radiali che convergono verso il centro (Fig 6.9 D). Queste sezioni sono caratterizzate da forme e dimensioni differenti, influenzate probabilmente dalla composizione e compattezza del materiale vegetale. L'80% delle galle colonizzate (n=10) presenta una riduzione del foro di ingresso ottenuto dalle formiche mediante la aggiunta di material prelevato dalle galle. In media il foro risulta ridotto del 55% rispetto al foro iniziale creato dal cinipide (Fig 6.9 E).

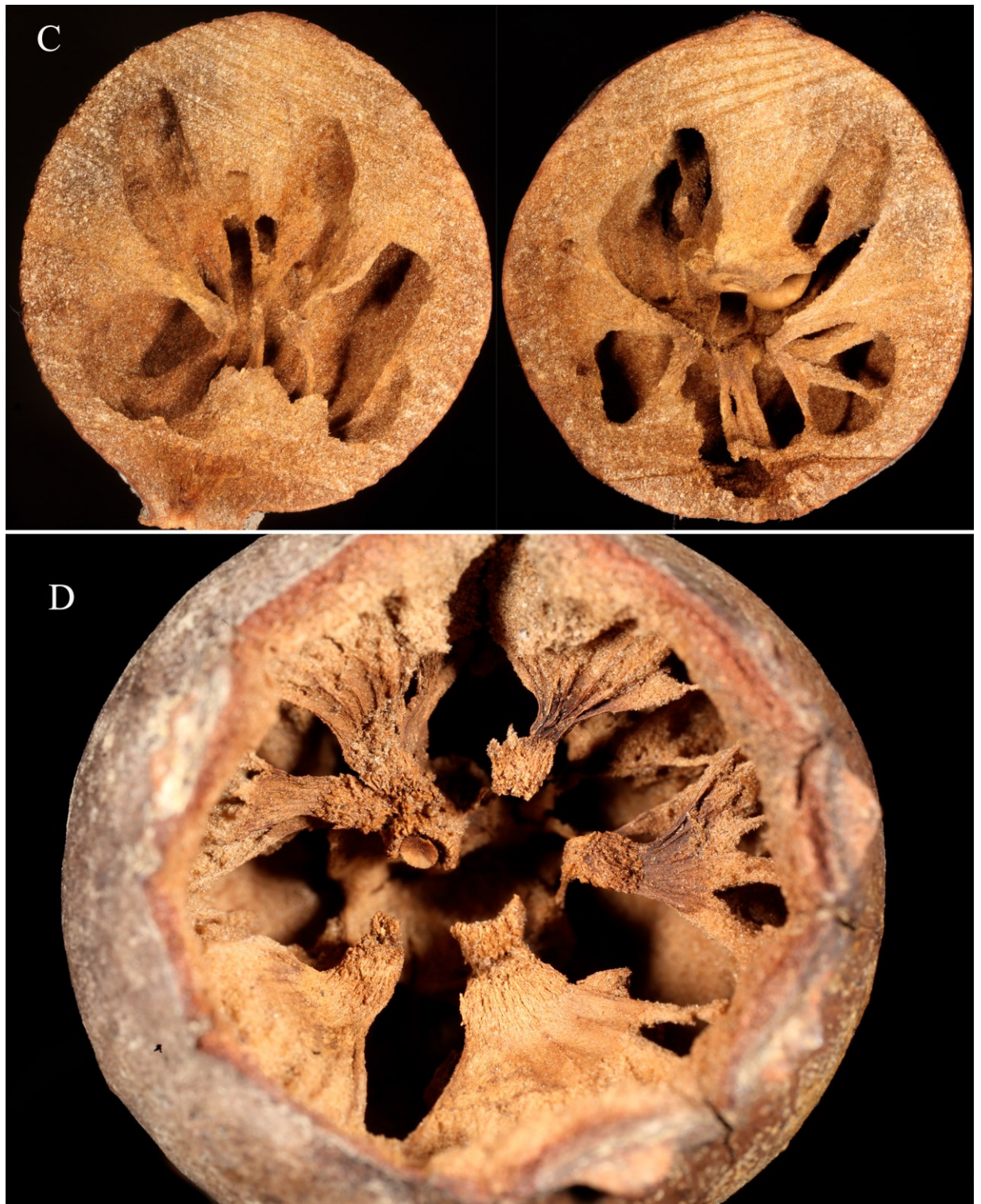


Fig 6.9 C) Esempio di architettura interna di una galla colonizzata da *Temnothorax spp*; D) Esempio di sezione trasversale di una galla colonizzata da *Temnothorax spp* che mostra sezioni radiali convergenti verso il centro delle galla.



Fig 6.9 E) esempi di riduzione del foro di ingresso in galle di *Temnothorax spp.*

Galle occupate da *C. scutellaris* presentano architetture differenti in relazione alla composizione della colonia. In presenza della sola regina lo spazio centrale normalmente presenta all'interno delle galle è ancora visibile con delle alterazioni e estensioni. In galle con la presenza di regine, operaie e prole è visibile una camera centrale e differenti sottocamere suddivise da sezioni perpendicolari. In questo caso lo spazio centrale non è più riconoscibile dato che lo scavo si estende in ogni parte della galla. In presenza di operaie e prole, la proporzione di materiale rimosso è molto consistente, sono presenti differenti camere di grandi dimensioni per una architettura molto complessa. Il livello massimo di scavo delle galle viene raggiunto in galle con la sola presenza di operaie. Le galle risultano totalmente scavate, prive di camere o tunnel e, la parete esterna risulta molto sottile, possono essere presenti strutture verticali e resti degli scavi (Fig 6.10- 6.11).

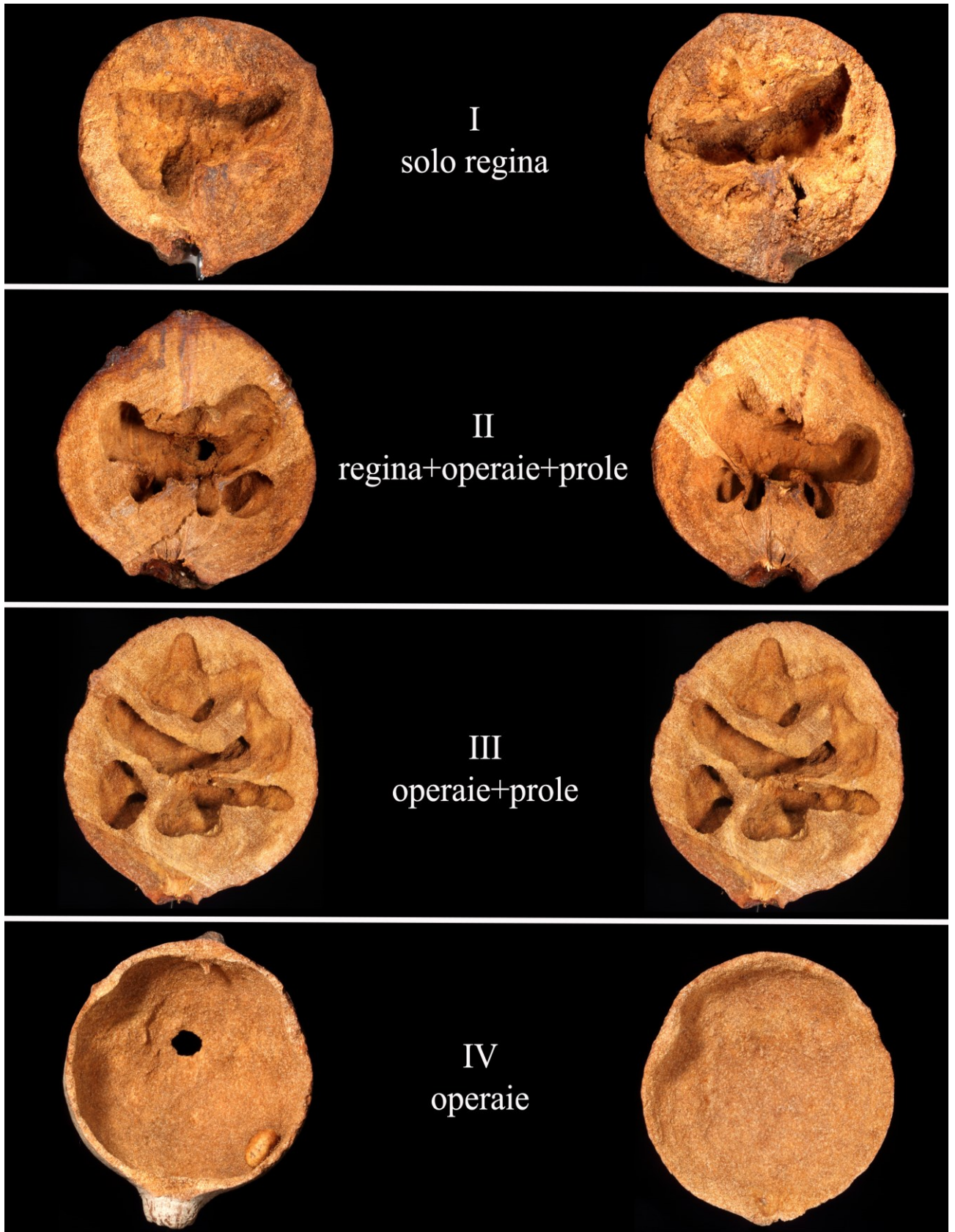


Fig 6.10 Esempio di architetture interne in galle colonizzate da *C. scutellaris*.



Fig 6.11 Strutture presenti in galle con solo operaie di *C. scutellaris*.

C) Per quanto riguarda l'analisi sull'area di scavo, l'analisi della Varianza (one-way Anova) ha evidenziato differenze statisticamente significative tra le 7 categorie confrontate ($F_{(6,49)} = 65,53$; $p < 0,001$). I test post hoc mostrano che ci sono 4 gruppi. L'area di dimensioni maggiori è in relazione alla presenza delle sole operaie di *C. scutellaris*, seguita dalle galle colonizzate da operaie e prole di *C. scutellaris*. Il terzo gruppo è costituito da un complesso di galle colonizzate da: *Temnothorax* spp, *C. scutellaris* (regina operaie e prole), *C. truncata* e *C. scutellaris* (solo regina). L'area di scavo più piccola è associata alle galle vuote (Fig 6.12).

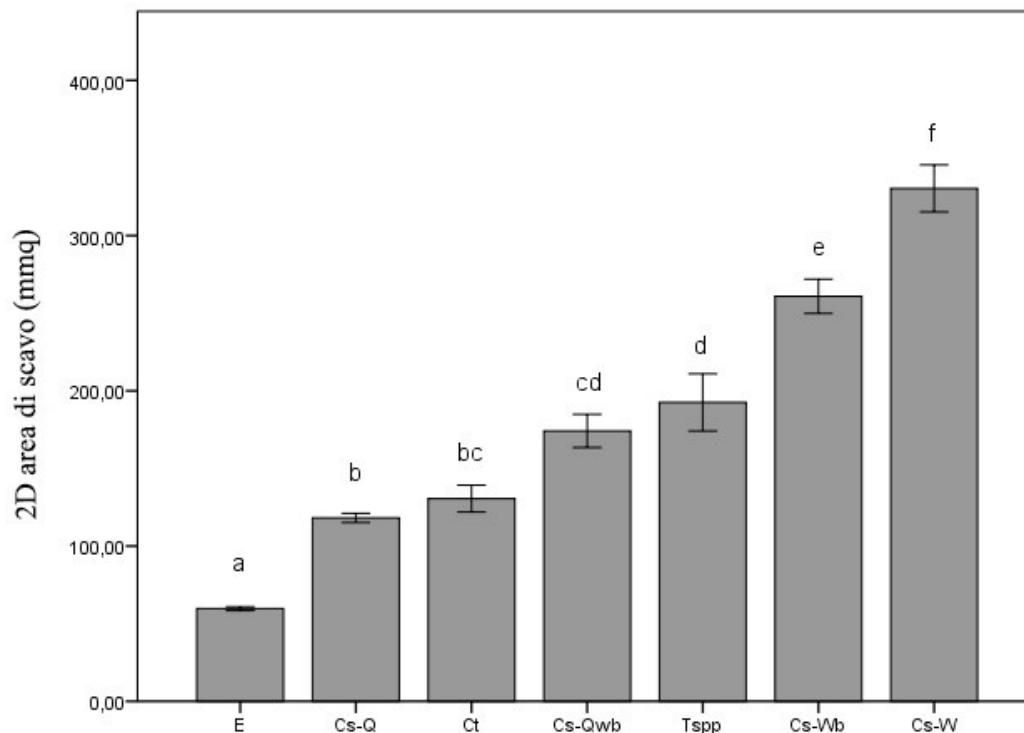


Fig 6.12 Le barre presenti nell'istogramma (\pm errore standard, one-way Anova) indicano l'area media di scavo in funzione del tipo di colonizzazione. In ascissa: E (vuote), Cs-Q (*C. scutellaris* solo regina), Ct (*C. truncata*), Cs-Qwb (*C. scutellaris* regina+operaie+prole), Tspp (*Temnothorax* spp), Cs-Wb (*C. scutellaris* operaie+prole), Cs-W (*C. scutellaris* solo operaie). Le lettere presenti sulle barre indicano i risultati dei test post hoc di Tukey. Barre con lettere uguali non presentano differenze statistiche.

E) L'analisi sul volume dello scavo di *C. scutellaris* e delle galle vuote (n=85) mostra differenza significative nella composizione della colonia ($F_{(4,80)}= 122,85$; $p < 0,001$). I test post hoc mostrano che ci sono 4 gruppi. Il volume di scavo maggiore si trova nelle galle con le sole operaie oppure nelle galle con operaie e prole. Le altre categorie sono ordinate secondo il seguente gradiente decrescente: regine operaie e prole; solo regina; galle vuote (Fig 6.13).

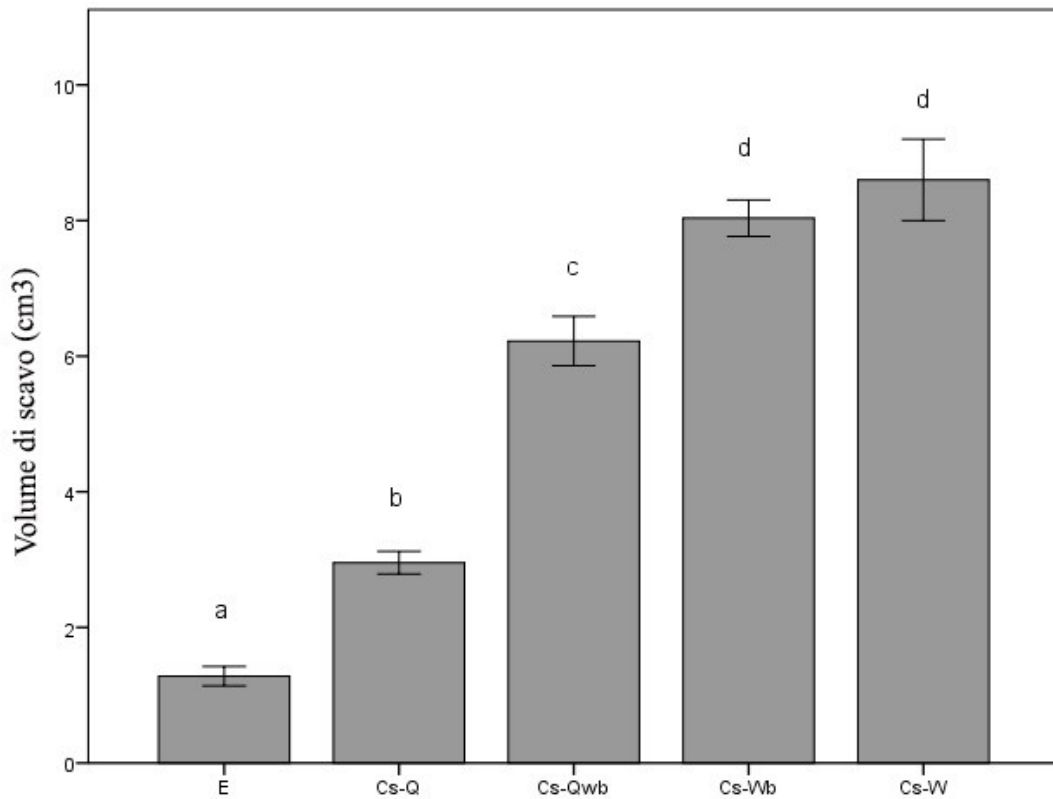


Fig 6.13 Le barre presenti nell' istogramma (\pm errore standard, one-way Anova) indicano il valore medio di scavo in funzione del tipo di colonizzazione di *C. scutellaris*. In ascissa: E (vuote), Cs-Q (*C. scutellaris* solo regina), Cs-Qwb (*C. scutellaris* regina+operaie+prole), Cs-Wb (*C. scutellaris* operaie+prole), Cs-W (*C. scutellaris* solo operaie). Le lettere presenti sulle barre indicano i risultati dei test post hoc di Tukey. Barre con lettere uguali non presentano differenze statistiche.

6.4 Analisi dei possibili effetti sulla presenza delle formiche

6.4.1 Materiali e metodi

Per valutare i possibili effetti sul benessere delle piante dovuti alla presenza delle formiche, durante il mese di maggio 2017 sono state selezionate 48 giovani piante di *Quercus spp* in un'area di 100 m² situata nei pressi dell'area in cui è stato svolto il field survey. Le piante sono state selezionate con un numero di foglie compreso da 4 a 7 e alla distanza di almeno 1m le une dalle altre. Su 24 piante sono state collocate artificialmente galle contenenti *C.scutellaris* (solo operaie o operaie e prole). Le restanti 24 piante sono state chiuse mediante manicotti di nastro adesivo per insetti sul tronco e, su ognuna è stata collocata una galla vuota. Da maggio ad agosto 2017 sono stati effettuati 24 scan sampling (2 volte a settimana, 3 minuti per pianta), per registrare dati sulla presenza e abbondanza di possibili insetti fitofagi:

- lepidotteri e coleotteri (larve o adulti);
- minatori fogliari (ditteri o lepidotteri) Nel caso dei minatori fogliari non è stato registrato il numero di insetti ma la loro presenza in funzione del danno fogliare caratteristico;

Al termine dell'esperimento (agosto 2017), è stato valutato:

- il numero di foglie danneggiate da insetti masticatori;
- il numero di foglie con presenza di attacchi fungini.

L'esperimento è stato ripetuto l'anno successivo nel periodo che va da maggio ad agosto 2018.

Dall'analisi statistica sono state escluse 9 piante nel 2017 e 11 piante nel 2018, a causa di danni e alterazioni. In totale sono state analizzate 76 piante. È stata utilizzata una analisi della Varianza a due vie (two-way ANOVA) per valutare l'effetto degli anni (2017 vs 2018) e della presenza delle formiche (con formiche vs senza formiche) sulle seguenti variabili:

1. n° di insetti fitofagi (n° totale di coleotteri e lepidotteri registrati durante i 24 scan-sampling. Non sono stati registrati adulti di lepidotteri);
2. indice di danno fogliare (n° di foglie attaccate da insetti masticatori/ numero totale di foglie per pianta);
3. minatori fogliari (n° di foglie con presenza di minatori fogliari/ numero di foglie totali per pianta);

4. indice di danno fungino (n° di foglie attaccate dai funghi /numero di foglie totali per pianta).

Per le variabili 2, 3, 4 i dati sono stati trasformati secondo la formula: $x = \arcsin(\sqrt{\text{rad}qx})$ dove x rappresenta la variabile da calcolare. Tutte le analisi sono state effettuate mediante il programma IBM SPSS 24.0 (pacchetto Windows).

6.4.2 Risultati

1. L'analisi sulla presenza di insetti fitofagi mostra che non è presente un effetto dell'anno ($F_{(1,72)} = 0,20$; $p = 0,655$), mentre è stato registrato un effetto della presenza delle formiche ($F_{(1,72)} = 9,67$; $p = 0,003$), ovvero il numero di insetti fitofagi decresce nel trattamento con le formiche. L'interazione tra i due fattori (anno * formiche) non è risultata significativa ($F_{(1,72)} = 0,05$; $p = 0,821$) (Fig 6.14-1).
2. Le analisi sulle foglie attaccate dagli insetti masticatori evidenziano che non risulta significativo l'effetto dell'anno ($F_{(1,72)} = 1,00$; $p = 0,322$), mentre è significativo l'effetto del trattamento con formiche ($F_{(1,72)} = 15,10$; $p < 0,001$). Il numero di foglie attaccate dai masticatori diminuisce significativamente in presenza delle formiche. L'interazione tra i due fattori (anno * formiche) non è risultata significativa ($F_{(1,72)} = 1,18$; $p = 0,281$) (Fig 6.14-2).
3. Per quanto riguarda l'analisi delle foglie attaccate da minatori fogliari non è presente un effetto dell'anno ($F_{(1,72)} = 1,32$; $p = 0,255$) né un effetto della presenza delle formiche sulle piante ($F_{(1,72)} = 0,96$; $p = 0,333$). L'interazione tra i due fattori (anno * formiche) non è risultata significativa ($F_{(1,72)} = 0,45$; $p = 0,503$) (Fig 6.14-3).
4. Infine anche l'analisi sulle foglie con presenza di attacchi funginei non ha evidenziato un effetto dell'anno ($F_{(1,72)} = 2,54$; $p = 0,115$), mentre risulta altamente significativo l'effetto del trattamento ($F_{(1,72)} = 31,04$; $p < 0,001$). Il numero di foglie attaccate dai funghi diminuisce quando sono presenti le formiche (Fig 6.14-4). Anche in questo caso l'interazione tra i due fattori (anno * formiche) non è risultata significativa ($F_{(1,72)} = 0,36$; $p = 0,551$) (Fig 6.15)

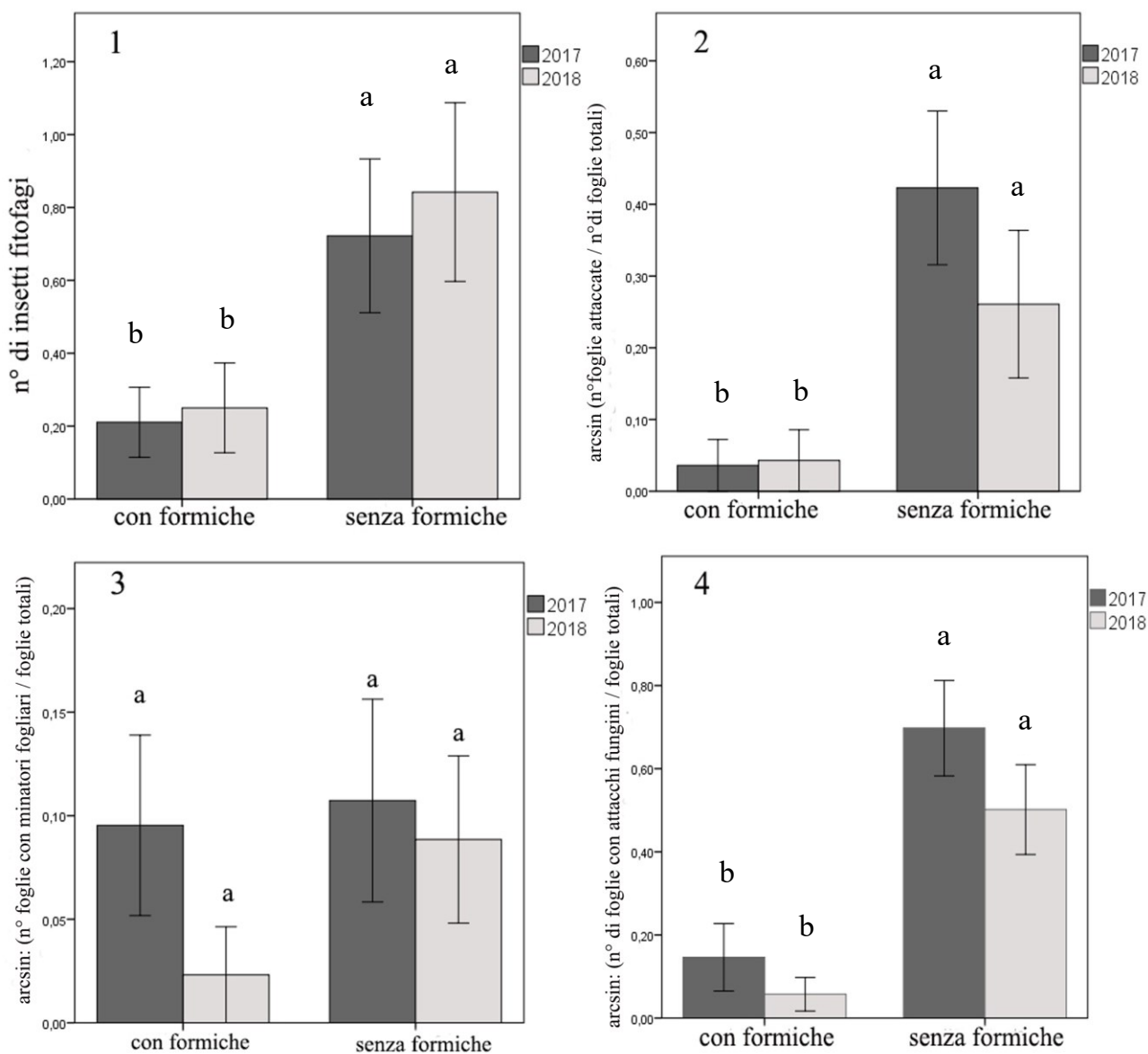


Fig 6.14. Risultati sui parametri relativi allo stato di salute della pianta. Le barre presenti negli istogrammi (\pm errore standard, two-way Anova) indicano i valori medi per i differenti parametri analizzati in relazione ai trattamenti (presenza/assenza formiche) e, all'anno (2017-2018). Le variabili analizzate sono: 1) Numero di insetti fitofagi, 2) Indice di danno fogliare, 3) Minatori fogliari, 4) Indice di danno fungino. Le differenze tra le variabili sono state valutate mediante two-way ANOVA. Le lettere presenti sulle barre indicano i risultati dei test post hoc di Tukey. Barre con lettere uguali non presentano differenze statistiche.

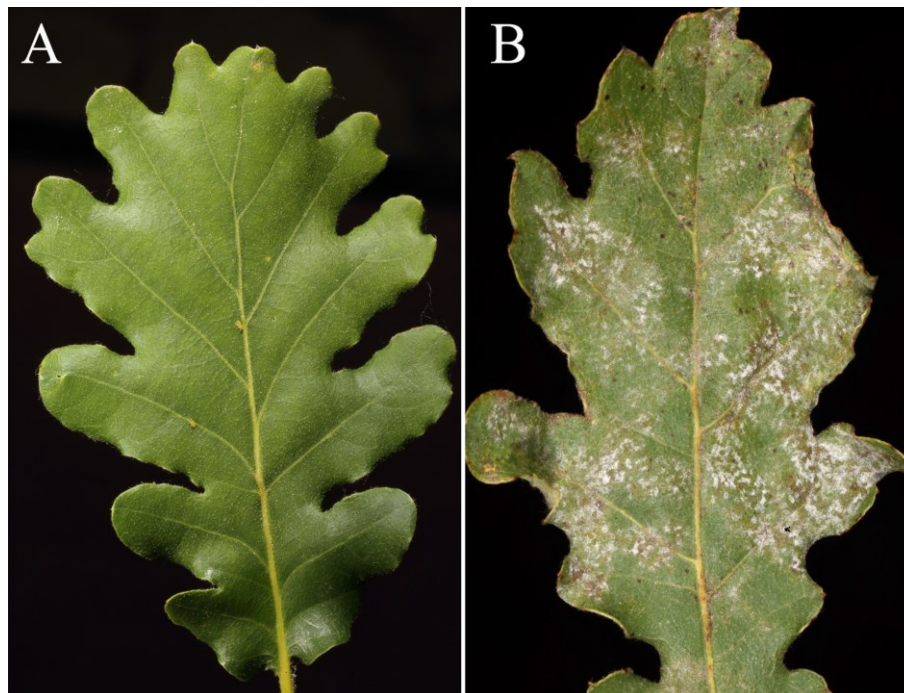


Fig 6.15 Esempio di foglie di *Quercus spp* nell' anno 2017: A) in piante con formiche; B) in piante senza formiche con segni di attacchi fungini.

6.5 Discussione e conclusioni

Il presente studio è un primo esempio di documentazione inerente la colonizzazione di galle indotte da *Andricus quercustozae* da parte di diverse specie di formiche in Italia. Sia la raccolta effettuata per il field survey sia l'analisi del tasso di colonizzazione, hanno permesso di descrivere la presenza di 12 specie appartenenti a 5 generi che colonizzano le galle. La specie più frequente e più abbondante è *C. scutellaris* seguita da *C. truncata* e dal complesso di specie appartenenti al genere *Temnothorax spp*. Gli unici studi europei che trattano la colonizzazione di formicidi in galle, indotte da differenti insetti galligeni su piante del genere *Quercus spp*, sono stati condotti negli anni 70-80. Più nel dettaglio, Torossian (1972) ha condotto uno studio in foreste nei pressi della città di Tolosa, evidenziando la presenza di *Leptothorax*, *Dolichoderus* e *Colobopsis* come generi più abbondanti (91,5%), seguiti da un secondo gruppo composto dai generi *Crematogaster* e *Camponotus* (7,6%). Successivamente, Espadaler e Nieves (1983) hanno analizzato un gruppo di galle raccolte a terra e sulle piante in 24 siti della penisola Iberica (province Salamanca, Cordoba e Barcellona). Gli autori hanno descritto la colonizzazione da parte di *C. scutellaris* come specie più abbondante (2,7%), seguita da *C. truncata* (21,21%), *C. fallax*+*C. lateralis* (18%) e *D. quadripunctatus* (12%). Hanno registrato inoltre la presenza di un gruppo di minore abbondanza costituito da varie specie dei generi *Leptothorax* e *Temnothorax*. Di questi due casi di studio, la composizione e la frequenza di colonizzazione descritta nella penisola iberica risulta comparabile con i risultati ottenuti nel

presente studio. Come ipotizzato dagli autori spagnoli, condizioni biogeografiche e climatiche differenti influenzano la composizione in specie della colonizzazione di galle. Ciononostante, mentre lo studio condotto in Spagna analizza campioni provenienti da siti distribuiti eterogeneamente nella penisola iberica e, quindi, probabilmente caratterizzati da differenti condizioni ambientali, il presente studio si è focalizzato su una zona più circoscritta nell'intento di ridurre la variabilità ambientale. I risultati inerenti il field survey e l'esperimento 1, forniscono alcune indicazioni sulla preferenza del tipo di galla da colonizzare da parte delle diverse specie. Tutte le specie analizzate hanno escluso le galle di dimensioni minori e localizzate nelle porzioni inferiori della pianta ad una altezza compresa tra 1 e 2 m. Per quanto riguarda le altre tipologie di galle, risulta una tendenza più evidente da parte di *C. scutellaris* a preferire galle di maggiori dimensioni e situate in posizioni più elevate sulla pianta (4-5 m). Una possibile spiegazione della scelta di galle più grandi potrebbe essere legata alla dimensione delle operaie di *C. scutellaris* che è maggiore rispetto alle altre specie considerate. Infatti una operaia di *C. scutellaris* presenta una lunghezza di circa 8,8 mm, mentre *C. truncata* presenta operaie maggiori delle dimensioni comprese tra 5,2 e 6 mm e operaie minori di circa 3,5 mm (Bernard, 1968); per quanto riguarda le specie del genere *Temnothorax spp*, le operaie presentano dimensioni comprese tra 2 e 3 mm (Lebas, 2016). Anche per le dimensioni delle colonie si evidenziano differenze nel numero di individui ospitati: mentre per *C. scutellaris* sono indicate colonie anche di 5000 individui (Casevitz, 1970), *C. truncata* e le specie del genere *Temnothorax* sono caratterizzate da colonie che ospitano al massimo poche centinaia di individui (Lebas, 2016). Sebbene riferiti ad una pianta tropicale, alcuni studi condotti in natura sugli alberi di candeia (*Eremanthus erythropappus*) hanno evidenziato un pattern simile, nelle preferenze per le dimensioni delle galle; Infatti galle più grandi presentano tassi più alti di occupazione da parte delle formiche (Almeida et al, 2014; Santos et al, 2017). La distribuzione delle specie riscontrate nelle galle analizzate potrebbe essere il risultato di una esclusione delle altre specie da parte di *C. scutellaris*. Infatti questa specie è considerata tra le formiche mediterranee molto aggressive e la sua presenza può influenzare la nidificazione e l'attività delle altre formiche (Cammell et al, 1996; Way et al, 1997; Santini et al, 2007; Santini et al, 2011).

Considerando l'analisi del contenuto delle galle, è stata riscontrata una differente composizione delle colonie in *C. scutellaris* rispetto alle altre specie presenti. Infatti in questo caso sono state descritte 4 categorie, successivamente accorpate in due gruppi caratterizzati dalla presenza o dalla assenza della regina. In presenza della regina, le analisi hanno evidenziato una preferenza per galle con dimensioni minori. Questa scelta potrebbe essere in relazione all'evento di fondazione. Lo spazio interno infatti presenta già caratteristiche adatte nella forma e nella dimensione per accogliere la regina, consentendole di modificare questa struttura lo stretto necessario per permetterle di allevare la prima covata risparmiando risorse preziose. Un'altra ipotesi è che galle di minori dimensioni

garantiscono una maggiore protezione grazie alla minore superficie esposta a possibili danni meccanici e all'azione degli agenti atmosferici. In assenza della regina (operie+prole e solo operaie) è stata registrata una preferenza per galle con dimensioni maggiori. Questa condizione potrebbe essere espressione del fenomeno di polidomia che è stato descritto per la specie *C. scutellaris* (Casevitz, 1972; Frizzi et al, 2015) e che implica una dislocazione di porzioni della stessa colonia in più siti di nidificazione. La polidomia infatti è un comportamento molto diffuso nelle formiche (Debout et al, 2007); tuttavia, per spiegare un fenomeno di colonizzazione simile da parte di formiche su galle della pianta di *Eremanthus erythropappus*, Santos et al (2017) forniscono una spiegazione alternativa introducendo il concetto di "outstation". Si tratta della colonizzazione di strutture già presenti nell'ambiente che le formiche utilizzano come rifugi temporanei o luoghi di sosta durante le attività di pattugliamento. Questo potrebbe consentire loro di intervenire più rapidamente in caso di invasioni del territorio (Anderson & McShea, 2001; Lanan et al, 2011).

La presenza di galle senza regina con un numero di operaie talvolta elevato (anche 500 operaie), potrebbe essere indice di una fase di espansione per cui galle diverse possono essere utilizzate per ospitare porzioni diverse della stessa colonia.

Questo risultato è evidenziato da differenze significative nel grado e nella struttura di escavazione delle galle. Infatti galle in cui è presente solo la regina di *C. scutellaris* presentano volume minori di material rimosso, rispetto alle galle dove sono presenti solo le operaie. Come già discusso questo è probabilmente frutto di una ottimizzazione delle risorse da parte della regina che modifica poco l'ambiente che ha colonizzato, mentre le operaie effettuano una attività di scavo più intensa per rendere più adatta la struttura ad ospitare un numero crescente di individui. Al contrario la complessità della struttura interna (indice della tipologia di scavo) è maggiore in galle che ospitano porzioni di colonie più eterogenee (regina+operaie+prole o operaie+prole). Di conseguenza i dati raccolti danno indicazioni che galle differenti supportano fasi diverse del processo di crescita della colonia, dalla fondazione alla maturazione.

Per le altre specie che colonizzano le galle, non si evidenzia una strategia analoga a *C. scutellaris*, ovvero ogni specie presenta una sola architettura caratteristica. Il volume di scavo di *C. truncata* si differenzia dal volume di scavo del gruppo *Temnothorax* e da quello di *C. scutellaris* nelle galle in cui non è presente la regina. Inoltre, il volume di scavo delle specie del genere *Temnothorax* si differenzia anche da tutte le categorie di scavo di *C. scutellaris* tranne quelle con presenza di regina+operaie+prole. Per quanto riguarda la complessità della struttura interna ci sono differenze evidenti rispetto a *C. scutellaris* sia nella posizione dello scavo che nel numero di gallerie e spazi formati. Peculiarità solo di *Temnothorax spp* è la manipolazione non solo dell'architettura interna della galla ma anche del foro di ingresso ridotto del 55% (n=10): probabilmente le dimensioni dell'ingresso vengono ridotte per garantire una entrata selettiva alle operaie della colonia. Sono

necessari ulteriori studi per approfondire il ruolo delle diverse architetture. Tali modificazioni della struttura interna potrebbero essere dovute alla risposta a differenti variabili ambientali (come temperature e umidità) o, in risposta a contaminazioni batteriche come dimostrato nelle “acorn ants” *Temnothorax curvispinosus* (Karlik et al, 2016).

Nell’ottica di valutare i possibili danni alla pianta e le conseguenze sul suo benessere, sono stati misurati differenti parametri diretti e indiretti per verificare il possibile effetto della presenza delle formiche. I risultati evidenziano una protezione da parte delle formiche nei confronti delle piante, ovvero si è verificata una riduzione del numero di fitofagi e dei danni sulla pianta. In letteratura sono presenti numerosi casi che evidenziano un effetto protettivo da parte delle formiche verso differenti insetti che causano danni alle piante (Bronstein, 1998; Agrawal & Rutter, 1998; Heil & McKey, 2003; Heil, 2008; Castracani et al, 2017; Campolo et al, 2015). Inoltre il presente studio ha documentato un effetto protettivo delle formiche nei confronti di attacchi fungini alle piante. Caratteristica di molti insetti sociali è quella di riuscire a limitare la presenza di batteri e funghi patogeni all’interno del loro nido e nell’area di foraggiamento, chiave del loro successo ecologico. Grazie alle sostanze chimiche prodotte da numerose ghiandole e rilasciate durante l’attività di patrolling sulle piante le formiche possono garantire una efficace azione difensiva contro batteri e funghi (Hölldobler & Wilson, 1990; Rico-Gray & Oliveira, 2007). Come dimostrato in differenti studi su *Acacia hindsii* la riduzione e il controllo di infezioni possono essere dovute anche alla presenza di batteri simbiotici presenti sulle zape delle formiche (Gonzales & Teuber, 2014; Grasso et al, 2015). A seguito dei dati ottenuti possiamo affermare che lo svantaggio evolutivo dovuto alla perdita di gemme floreali causata dall’attacco del cinipede, è compensato dalla presenza delle formiche sulle piante. Ottimizzando la loro presenza e attività la pianta ottiene un grande vantaggio. Secondo questa ipotesi le galle potrebbero svolgere un ruolo analogo a quello delle domazie. Infatti molte piante mirmecofite hanno evoluto differenti strutture modificate con presenza di corridoi e camera, per facilitare la fondazione e lo sviluppo della colonia (Grasso et al, 2015). Come dimostrato in questo lavoro le galle come le domazie, favoriscono la fondazione di colonie da parte di specie differenti di formiche. La presenza di specie diverse con differenti caratteristiche etoecologiche consentirebbe alla pianta di ottenere benefici diretti e indiretti dalla loro presenza.

CAPITOLO 7

Conclusioni generali

Il presente lavoro ha permesso di valutare le interazioni tra specie di formiche e piante mirmecofile in ambiente mediterraneo chiarendo numerosi aspetti legati a queste relazioni mutualistiche e ponendo nuovi interrogativi per futuri sviluppi. Si tratta dei primi dati di tipo ecoetologico raccolti in modo sistematico su questo fenomeno in Italia e tra i pochi che riguardano specie che vivono a latitudini temperate. Infatti le relazioni tra formiche e piante, sono state principalmente studiate in aree tropicali dove si riscontrano fenomeni estremi di simbiosi (Rico-Grey & Oliveira, 2007). Tuttavia, i casi di mutualismo che coinvolgono piante e formiche a diversi livelli di complessità (relazioni occasionali, relazioni facoltative e altre più stabili) non sono rari (o potrebbero non esserlo) anche ad altre latitudini. La presenza di numerose specie vegetali che presentano nettari extraflorali anche in zone temperate e mediterranee potrebbe esserne lo specchio (Grasso et al, 2015). Con la presente ricerca, ho cercato di fornire dati utili a descrivere e interpretare tale fenomeno su specie comuni in Italia o specie qui presenti ma di interesse agronomico generale. Ciò con l'obiettivo non solo di colmare alcune lacune conoscitive di carattere ecologico ed etologico, ma anche di fornire spunti per possibili applicazioni pratiche in ambito agronomico che da questi studi potrebbero derivare.

I risultati ottenuti in campo hanno permesso di descrivere le specie della mirmecofauna coinvolte e gli effetti sulle piante a seguito della loro presenza. Per le 3 specie vegetali utilizzate come modello nella presente ricerca è stato riscontrato un numero piuttosto elevato di specie di formiche interagenti (n=15). E' stata registrata una differenza altamente significativa nel confronto tra piante con nettari liberamente accessibili e piante in cui venivano bloccati (rif cap 2) riscontrando un incremento del numero di formiche su piante con nettari liberi. Di particolare interesse è anche il maggior numero di formiche rilevato non solo nell'ambito dei transetti contenenti le piante con con nettari extraflorali liberi ma, anche, a distanza entro un raggio di 10 m, rispetto ai transetti con nettari non accessibili. Ciò mostra una elevata mirmecofilia delle piante studiate che implica, un incremento dell'attività di molte specie di formiche nei loro paraggi. Ciò potrebbe avere un impatto positivo indiretto anche sulla vegetazione circostante. Infatti grazie alle loro azione dissuasiva nei confronti di insetti fitofagi, dovuta alla loro intensa attività di pattugliamento, nonché alla tendenza di molte specie a comportarsi da predatori generalisti, le formiche potrebbero estendere i loro servizi alle piante limitrofe da quelle direttamente attrattive per loro. Gli esperimenti effettuati in campo hanno infatti consentito di chiarire il ruolo delle formiche nella protezione delle piante per tutte le specie modello (*Prunus avium*, *Vicia sativa*, *Vicia faba*). I risultati indicano un consistente

effetto difensivo operato dalle formiche, che si evidenzia con un abbattimento della presenza di insetti fitofagi e una riduzione dei danni inflitti alla pianta (rif cap 2; cap5). Tale effetto sulla fitness delle piante è particolarmente evidente in natura su *V. sativa* e *V. faba* con un incremento della qualità e quantità dei semi prodotti. La azione delle formiche ha consentito di ridurre la predazione dei semi garantendo la potenziale dispersione di un maggior numero di semi vitali. I risultati ottenuti evidenziano e sottolineano il potenziale ruolo delle formiche come agenti di controllo biologico in agricoltura, con particolare riguardo a sistemi di controllo conservativo (Campolo et al, 2015; Grasso et al, 2015, Castracani et al, 2017). Gli esperimenti sia in campo che in laboratorio su *P. avium* e *V. faba* hanno evidenziato per la prima volta una specifica risposta fisiologica delle piante alla presenza delle sole formiche: un aumento significativo della quantità di nettare secreto. Dati presenti in letteratura evidenziano casi di aumento nella produzione del nettare extrafiore da parte delle piante solo in seguito all'attacco di fitofagi o, al danneggiamento meccanico sperimentale di porzioni della pianta (Mondor et al, 2003). E' possibile che questo processo di secrezione indotta, osservato per la prima volta su piante mirmecofile, avvenga seguendo meccanismi e pattern fisiologici diversi a seconda che la pianta venga danneggiata da fitofagi (o eventualmente per azione meccanica non dovuta ad insetti) o entri in contatto con le formiche. Tuttavia, è anche possibile che i due processi abbiano elementi in comune nella regolazione e produzione del nettare extrafiore dal momento che, per l'estrazione del nettare le formiche interagiscono a volte anche in modo frenetico con il nettario esercitando un'azione meccanica con potenziale effetto stimolatorio. L'ipotesi si basa su alcune evidenze osservazionali e sperimentali del tutto preliminari (Grasso et al, 2017; Nepi et al, 2017) e richiede ulteriori studi e approfondimenti per essere verificata.

Gli effetti registrati a seguito dell'assunzione del nettare extrafiore da parte delle formiche, particolarmente marcati nel caso delle interazioni con *P. avium* supportano l'ipotesi di una possibile manipolazione comportamentale delle formiche da parte della pianta (Grasso et al, 2015). Gli esperimenti infatti evidenziano una maggiore permanenza delle formiche sulle piante, una variazione dei parametri locomotori e un'alterazione delle risposte al feromone di traccia. A ciò si aggiunge un aumento delle reazioni aggressive nei confronti di potenziali predatori della pianta. Tali alterazioni del comportamento garantirebbero alla pianta la presenza su di sé di formiche particolarmente attive ed aggressive dedite al pattugliamento per lunghi periodi di tempo, ottenendo un vantaggio grazie ad azioni di difesa diretta e indiretta (Offenberg, 2015). La difesa si potrebbe estendere anche al controllo di agenti patogeni potenzialmente nocivi per la pianta (ad es. funghi e batteri) grazie all'effetto diretto di pulizia e rimozione sulla superficie della pianta, alla produzione diretta di sostanze antibiotiche o prodotte da batteri simbiotici presenti sul loro corpo (González & Teuber, 2014).

Infine, di particolare interessante è il caso delle interazione tra formiche e piante del genere *Quercus spp* mediate da galle di *Andricus quercustozae* studiate in dettaglio qui per la prima volta. Anche in questo caso la presenza delle formiche su giovani piante si è tradotta in una significativa diminuzione di insetti fitofagi sulla piante e riduzione di infezioni funginee, fornendo ulteriori informazioni su possibili meccanismi di difesa indiretta su piante del genere *Quercus spp.* mediata dalle formiche ma non attivamente (almeno apparentemente) perseguita dalle piante. I dati dimostrano, infatti, che le galle favoriscono la presenza delle formiche sulle piante fornendo loro un ambiente ideale per la fondazione e sviluppo delle colonie. Sebbene l'attacco del cinipide galligeno possa comportare un danno alla fitness della pianta dovuto alla perdita di gemme fiorali, il costo potrebbe essere compensato dall'azione predatoria delle formiche nei confronti di insetti fitofagi. In questo modo, le galle assolverebbero a un ruolo analogo a quello delle domazie nelle piante mirmecofite, garantendo una presenza stabile delle formiche e, pertanto, un efficiente sistema di difesa. Per questo motivo, nel presente lavoro di tesi il caso che riguarda le relazioni tra formiche e piante di *Quercus spp* mediate da galle è stato definito *by-product mutualism*, ovvero un mutualismo indiretto (sotto prodotto) risultante da un precedente processo di parassitizzazione della pianta. Lo studio di queste interessanti interazioni merita ulteriori approfondimenti viste le notevoli implicazioni evolutive, ecologiche ed applicative che da questi possono scaturire.

CAPITOLO 8

Bibliografia

- Adler, L.S., Irwin, R.E. (2012). Nectar alkaloids decrease pollination and female reproduction in a native plant. *Oecologia* 168: 1033-1041.
- Agosti, D., Alonso, L. E. (2000). The ALL protocol. *Ants: standard methods for measuring and monitoring biodiversity*. Smithsonian Institution Press, Washington, DC, 280: 204-206.
- Agrawal, A.A., Rutter, M.T. (1998). Dynamic anti-herbivore defense in ant-plants: the role of induced responses. *Oikos* 83: 227-236.
- Almeida, M. F. B., Santos, L. R., Carneiro, M. A. A. (2014) Senescent stem-galls in trees of *Eremanthus erythropappus* as a resource for arboreal ants. *Revista Brasileira de Entomologia*, 58 (3): 265-272.
- Anderson, C., McShea, D. W. (2001). Intermediate-level parts in insect societies: adaptive structures that ants build away from the nest. *Insectes Sociaux*, 48: 291-301.
- Aranda-Rickert, A., Rothen, C., Diez, P., González, A. M., & Marazzi, B. (2017). Sugary secretions of wasp galls: a want-to-be extrafloral nectar?. *Annals of botany* 120 (5): 765-774.
- Axelrod, D. I. (1970). Mesozoic paleogeography and early angiosperm history. *The Botanical Review*, 36 (3): 277-319.
- Baracchi, D., Marples, A., Jenkins, A. J., Leitch, A. R., & Chittka, L. (2017). Nicotine in floral nectar pharmacologically influences bumblebee learning of floral features. *Scientific Reports*, 7 (1): 1951.
- Bentley, BL. (1977). Extrafloral nectaries and protection by pugnacious bodyguards. *Annual Review of Ecology and Systematics* 8: 407-427.
- Bestelmeyer, B. T., Agosti, D., Alonso, L. E., Brandão, C. R. F., Brown, W. L., Delabie, J. H., Silvestre, R. (2000). Field techniques for the study of ground-dwelling ant: an overview, description, and evaluation.- In Agosti, D., Majer, J.D., Alonso, L.E., Shultz, T.R. (eds.), *Ants: Standard Methods for Measuring and Monitoring Biodiversity*. Smithsonian Institution Press, Washington, DC 122-144.
- Beattie, A. J., Turnbull, C. L., Hough, T., & Knox, R. B. (1986). Antibiotic production: a possible function for the metapleural glands of ants (Hymenoptera: Formicidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 79 (3): 448-450.
- Bernard, F. (1968). *Les Fourmis (Hymenoptera, Formicidae) d'Europe occidentale et septentrionale*. Ed Masson et Cie. Paris: 414.

- Bixenmann, R.J., Coley, P.D. & Kursar, T.A. (2011). Is extrafloral nectar production induced by herbivores or ants in a tropical facultative ant-plant mutualism?. *Oecologia*, 165: 417-425.
- Blüthgen, N., Gebauer, G., Fiedler, K. (2003). Disentangling a rainforest food web using stable isotopes: dietary diversity in a species-rich ant community. *Oecologia* 137: 426–435.
- Bolton, B. (1994). Identification guide to the ant genera of the world. Harvard University Press, Cambridge, MA p 222.
- Bronstein, J.L. (1998). The contribution of ant–plant protection studies to our understanding of mutualism. *Biotropica*, 30: 150-161.
- Bruneau de Miré, P. (1969). Une fourmi utilisée au Cameroun dans la lutte contre les mirides du cacaoyer *Wasmannia auropunctata* Roger. *Café, Cacao, Thé* (France) 13 (3): 209-212.
- Cammaerts, M. C., Rachidi, Z., Gosset, G. (2014). Physiological and ethological effects of caffeine, theophylline, cocaine and atropine; study using the ant *Myrmica sabuleti* (Hymenoptera. Formicidae) as a biological model. *International Journal of Biology* 6: 64-84.
- Cammell, M.E., Way, M. J. & Paiva, M.R. (1996). Diversity and structure of ant communities associated with oak, pine, eucalyptus and arable habitats in Portugal. *Insectes Sociaux*, 43, 37-46.
- Campolo, O., Palmeri, V., Malacrinò, A., Laudani, F., Castracani, C., Mori, A., Grasso, D. A. (2015). Interaction between ants and the Mediterranean fruit fly: new insights for biological control. *Biological Control* 90: 120-127.
- Cardoso-Gustavson, P., Andrezza, N. L., Sawaya, A. C., de Moraes Castro, M. (2013). Only attract ants? The versatility of petiolar extrafloral nectaries in *Passiflora*. *American Journal of Plant Sciences*, 4 (02): 460.
- Casevitz, W.J. (1970). Sur la Biologie de *Crematogaster scutellaris* Olivier. *Laboratoire d'Entomologie generale et appliquée du Muséum National d'Histoire naturelle de Paris* XXXVI, 3.
- Casevitz Weulersse, J. (1972) Habitats et comportement nidificateur de *Crematogaster scutellaris* Olivier. *Bulletin de la Société Entomologique de France*, 77: 12-19.
- Castracani, C., Bulgarini, G., Giannetti, D., Fiorenza A. S., Maistrello L., Mori A., Grasso, D.A. (2017). Predatory ability of the ant *Crematogaster scutellaris* on the brown marmorated stink bug *Halyomorpha halys*. *Journal of Pest Science*, 90: 1181-1190.
- Chin, S., Lutz, S., Wen, J., Potter, D.(2013).The bitter and sweet:Inference of homology and evolution of leaf glands in *Prunus* (Rosaceae) through anatomy, micromorphology and ancestral-character state reconstruction. *Journal of Plant Science*, 174 (1): 27-46.

- Cook, D., Manson, J.S., Gardner, D.R., Welch, K.D., Irwin, R.E. (2013). Norditerpene alkaloid concentrations in tissues and floral rewards of larkspurs and impacts on pollinators. *Biochemical Systematics and Ecology*, 48: 123-131.
- Crepet, W.L.(1979). Insect Pollination: A Paleontological Perspective. *BioScience*, Volume 29, Issue 2 : 102-108
- Darwin, C. R. (1859). *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*. London: John Murray.
- Davidson, D.W., McKey, D. (1993). The evolutionary ecology of symbiotic ant-plant relationships. *Journal of Hymenopteran Research*, 2: 13-83.
- Debout, G., Schatz, B., Elias, M. & McKey, D. (2007). Polydomy in ants: what we know, what we think we know, and what remains to be done. *Biological Journal of the Linnean Society*, 9: 319-348.
- Del-Claro, K., Alves-Silva, E., Lange, D., Vilela, A. A. (2016). Loss and gains in ant–plant interactions mediated by extrafloral nectar: fidelity, cheats, and lies. *Insectes Sociaux* 63: 207-221.
- Delpino F. (1886). Funzione mirmecofila nel regno vege-tale. *Memorie della Reale Accademia delle Scienza di Bologna* 7: 215-323.
- Delpino, F. (1874). Rapporti tra insetti e nettari extranuziali nelle piante. *Bollettino della Societa` Entomologica Italiana* 6: 234-239.
- Detrain, C., Prieur, J. (2014). Sensitivity and feeding efficiency of the black garden ant *Lasius niger* to sugar resources. *Journal of Insect Physiology*, 64: 74-80.
- Ducci, F., De Cuyper, B., De Rogatis, A., Dufour, J., Santi, F. (2013). Wild cherry breeding (*Prunus avium* L.). In *Forest Tree Breeding in Europe* (pp. 463-511). Springer, Dordrecht.
- Ehrlich, P. R. & Raven, P.H. (1965). Butterflies and plants: A study in coevolution. *Evolution*, 18: 586-608.
- Elias, T.S. (1983). Extrafloral nectaries and distribution. *The Biology of nectaries*. Columbia Univ Press : 259
- Engel, V., Fischer M. I., Wäckers F. L & Voelkl, W. (2001). Interactions between extrafloral nectaries, aphids and ants: are there competition effects between plant and homopteran sugar sources?. *Oecologia*, 129: 577–584.
- Escalante-Pérez, M., Heil, M. (2012). Nectar secretion: its ecological context and physiological regulation. In *Secretions and exudates in biological systems* (pp. 187-219). Springer, Berlin, Heidelberg.

- Espadaler, X., Nieves, J. L. (1983). Hormigas (Hymenoptera; Formicidae) pobladoras de gallas abandonadas de Cinípedos (Hymenoptera; Cynipidae) sobre "Quercus" sp en la península Ibérica. Publicado en el Boletín de la Estación Central de Ecología, 12: 23.
- Espírito-Santo, M.M., Fernandes, G.W. (2007) How many species of gall-inducing insects are there on Earth, and where are they?. Entomological Society of America, 100 (2): 95 - 99.
- Fernandes, G. W., Fagundes, M., Woodman, R. L., & Price, P. W. (1999). Ant effects on three-trophic level interactions: plant, galls, and parasitoids. Ecological Entomology, 24(4): 411-415.
- Fiala, B., Maschwitz, U., Tho, Y.P. & Helbig A.J. (1989). Studies of a South East Asian ant-plant association: protection of *Macaranga* trees by *Crematogaster borneensis*. Oecologia, 79: 463-470
- Floren, A., Biun, A., Linsenmair, K.E. (2002). Arboreal ants as key predators in tropical lowland rainforest trees. Oecologia, 131: 137-44.
- Forel, A. (1879). Études myrmécologiques en 1879. – Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles, 16: 53-128
- Frizzi, F., Ciofi, C., Dapporto, L., Natali, C., Chelazzi, G., Turillazzi, S., Santini, G. (2015). The Rules of Aggression: How Genetic, Chemical and Spatial Factors Affect Intercolony Fights in a Dominant Species, the Mediterranean Acrobat Ant *Crematogaster scutellaris*. PLoS ONE, 10: 1-15.
- Garcia, M.B., Antor, R.J., Espadaler, X. (1995) Ant pollination of the palaeoendemic dioecious *Borderea pyrenaica* (Dioscoriaceae). Plant Systematics and Evolution, 198:17-27.
- Gaume, L., Zacharias, M., Borges, M.R. (2005). Ant-plant conflicts and a novel case of castration parasitism in a myrmecophyte. Evolutionary Ecology Research, 7: 435-452.
- Ghazoul, J. (2001). Can floral repellents pre-empt potential ant-plant conflicts?. Ecology Letters, 4: 295-299.
- Gómez, J. M. (1999). Effectiveness of ants as pollinators of *Lobularia maritima*: effects on main sequential fitness components of the host plant. Oecologia (2000), 122: 90-97
- González-Teuber, M., Bueno, J. C. S., Heil, M., Boland, W. (2012). Increased host investment in extrafloral nectar (EFN) improves the efficiency of a mutualistic defensive service. PLoS One, 7(10) e46598 1-9.
- González-Teuber, M., Kaltenpoth, M., Boland, W. (2014). Mutualistic ants as an indirect defence against leaf pathogens. New Phytologist, 202: 640-650.
- Grasso, D. A., Pandolfi, C., Bazihizina, N., Nocentini, D., Nepi, M., and Mancuso, S. (2015). Extrafloral-nectar-based partner manipulation in plant-ant relationships. AoB Plants 7: 1-15.

- Grasso, D.A., Giannetti D, Castracani C, Mori A, Nepi M, Mancuso S. (2017). From mutualism to manipulation in ant-plant relationship mediated by extrafloral nectar. In: Abstract Book “XXVII Convegno Nazionale della società Italiana di Etologia” Pisa, 18-21 Giugno 2017 p.25.
- Grover, C. D., Kay, A. D., Monson, J. A., Marsh, T. C., Holway, D. A. (2007). Linking nutrition and behavioural dominance: carbohydrate scarcity limits aggression and activity in Argentine ants. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 274 (1628): 2951-2957.
- Hanelt, P., Mettin, D. (1989). Biosystematics of the genus *Vicia* L.(Leguminosae). *Annual review of ecology and systematics*, 20 (1): 199-223.
- Heil, M., Fiala, B., Baumann, B., Linsenmair, K.E. (2000). Temporal, spatial and biotic variations in extrafloral nectar secretion by *Macaranga tanarius*. *Functional Ecology*, 14: 749-757.
- Heil, M., Koch, T., Hilpert, A., Fiala, B., Boland, W., Linsenmair K.E. (2001). Extrafloral nectar production of the ant-associated plant, *Macaranga tanarius*, is an induced, indirect, defensive response elicited by jasmonic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 98: 1083-1088.
- Heil M., McKey, D. (2003). Protective ant-plant interactions as model systems in ecological and evolutionary research. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 34: 425-453.
- Heil, M., Rattke, J., Boland, W. (2005). Postsecretory hydrolysis of nectar sucrose and specialization in ant/plant mutualism. *Science*, 308: 560-563.
- Heil, M. (2008). Indirect defence via tritrophic interactions. *New Phytologist*, 178 (1): 41-61.
- Heil M. (2011). Nectar: generation, regulation, and ecological functions. *Trends in Plant Science*, 16: 191-200.
- Heil, M., Barajas-Barron, A., Orona-Tamayo, D., Wielsch, N., and Svatos, A. (2014). Partner manipulation stabilises a horizontally transmitted mutualism. *Ecology letters*, 17: 185–192.
- Heil, M. (2015). Extrafloral Nectar at the Plant-Insect Interface: A Spotlight on Chemical Ecology, Phenotypic Plasticity, and Food Webs. *Annual Review of Entomology*, 60: 213-232.
- Heneidak, S., Hassan, A.E. (2007). Morphological and anatomical studies of Floral and extrafloral nectaries in some *Vicia* taxa (Fabaceae). *International Journal of Botany*, 3: 329-341.
- Herrera, C. M., de Vega, C., Canto, A., and Pozo, M. I. (2009). Yeasts in floral nectar: a quantitative survey. *Annals of botany*, 103: 1415-1423.

- Hölldobler B, Wilson EO. (1990). The ants. Cambridge: Harvard University Press.
- Hölldobler B, Wilson EO. (2009). The superorganism: the beauty, elegance, and strangeness of insect societies. New York: Norton & Co. Incorporated.
- Huang, N., Enkegaard, A., Osborne, L. S., Ramakers, P. M., Messelink, G. J., Pijnakker, J., & Murphy, G. (2011). The banker plant method in biological control. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 30(3): 259-278.
- Janzen, D.H. (1966). Coevolution of mutualism between ants and acacias in Central America. *Evolution*, 20: 249-275.
- Jolivet, P. (1986). *Les Fourmis et les Plantes (Un exemple de Coévolution)*. Ed Boubée. Paris. p. 215
- Junker, R. R., Blüthgen, N,. (2008). Floral scents repel potentially nectar-thieving ants. *Evolutionary Ecology Research*, 10: 295-308.
- Karlik, J., Jane Epps, M., Dunn, R.R., Penic, C.A. (2016). Life Inside an Acorn: How Microclimate and Microbes Influence Nest Organization in *Temnothorax* Ants. *Ethology*, 122: 790-797.
- Kerner, A. (1878). *Flowers and their Unbidden Guests*. London: C. Kegan Paul & Co.
- Kessler, D., Bhattacharya, S., Diezel, C., Rothe, E., Gase, K., Schöttner, M., et al. (2012). Unpredictability of nectar nicotine promotes outcrossing by hummingbirds in *Nicotiana attenuata*. *The Plant Journal*, 71: 529–538.
- King, E.G., Caylor, K.K. (2010). Herbivores and mutualistic ants interact to modify tree photosynthesis. *New Phytologist*, 187: 17-21.
- Koptur, S. (2005). *Nectar as fuel for plant protectors. Plant-provided food for carnivorous insects: a protective mutualism and its applications*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 75-108.
- Koptur, S., Palacios-Rios, M., Díaz-Castelazo, C., Mackay, W.P., Rico-Gray, V. (2013). Nectar secretion on fern fronds associated with lower levels of herbivore damage: field experiments with a widespread epiphyte of Mexican cloud forest remnants. *Annals of Botany*, 111: 277-1283.
- Lanan, M. C., Dornhaus, A. & Bronstein, J. L. (2011). The function of polydomy: the ant *Crematogaster torosa* preferentially forms new nests near food sources and fortifies outstations. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 65: 959-968.
- Lange, D., Dáttilo, W., Del-Claro, K. (2013). Influence of extrafloral nectary phenology on ant-plant mutualistic networks in a neotropical savanna. *Ecological Entomology*, 38: 463-469.

- Lange, D., Calixto, E. S., Del-Claro, K. (2017). Variation in extrafloral nectary productivity influences the ant foraging. *PLoS One*, 12 (1) e0169492.
- Lebas, C., Galkowski C., Blatrix R., Wegnez P. (2016). Fourmis d'Europe occidentale. Ed Delachaux et Niestlè. Paris. p. 415
- Letourneau, D. K. (1998). Ants, stem-borers, and fungal pathogens: experimental tests of a fitness advantage in Piper ant-plants. *Ecology*, 79(2): 593-603.
- Maistrello, L., Dioli P., Vaccari G. (2014). First records in Italy of the Asian stinkbug *Halyomorpha halys*, a new threat to fruit crops. *ATTI Giornate Fitopatologiche*, 1: 283–288.
- Maistrello L, Costi E, Caruso S et al (2016a) *Halyomorpha halys* in Italy: first results of field monitoring in fruit orchards. *IOBCWPRS Bull*, 112: 1–5.
- Maistrello, L., Dioli, P., Bariselli, M., Mazzoli, G. L., Giacalone-Forini, I. (2016b). Citizen science and early detection of invasive species: phenology of first occurrences of *Halyomorpha halys* in Southern Europe. *Biological invasions*, 18 (11): 3109-3116.
- Mancuso S. (2010). Federico Delpino and the foundation of plant biology. *Plant Signaling and Behavior*, 5: 1067-1071.
- Manson, J. S., Cook, D., Gardner, D. R., & Irwin, R. E. (2013). Dose-dependent effects of nectar alkaloids in a montane plant–pollinator community. *Journal of Ecology*, 101 (6): 1604-1612.
- Mani, M. S. (1964). *The ecology of plant galls*. Junk, The Hague, The Netherlands.
- Marazzi, B., Conti, E., Sanderson, M.J., McMahon, M.M., Bronstein, J.L. (2013). Diversity and evolution of a trait mediating ant-plant interactions: Insights from extrafloral nectaries in *Senna* (Leguminosae). *Annals of botany*, 111(6): 1263-1275.
- Marrs, R. H., Watt, A. S. (2006). *Biological Flora of the British Isles: Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. *Journal of Ecology*, 94: 1272-1321
- Mayer VE, Frederickson ME, McKey D, Blatrix R. (2014). Current issues in the evolutionary ecology of ant-plant symbioses. *New Phytologist*, 202: 749-764.
- Mathews, C.R. (2005) Role of peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] extrafloral nectaries in mediating natural enemy herbivore interactions. PhD dissertation, University of Maryland, College Park, MD.
- Mendesil, E., Rämer,t B., Marttila, S., Hillbur, Y., Anderson, P. (2016). Oviposition Preference of PeaWeevil, *Bruchus pisorum* L. Among Host and Non host Plants and its Implication for Pest Management. *Frontiers in plant science*, 6: 1-9
- Mondor E.B., Addicott J.F. (2003). Conspicuous extra-floral nectaries are inducible in *Vicia faba*. *Ecology Letters*, 6: 495–497.

- Mwanamwenge, J., Loss, S.P., Siddique, K.H.M., Cocks, P.S. (1999). Effect of water stress during floral initiation, flowering and podding on the growth and yield of faba bean (*Vicia faba L.*). *European Journal of Agronomy*, 11 : 1–11
- Nepi, M., & Stpiczyńska, M. (2008). The complexity of nectar: secretion and resorption dynamically regulate nectar features. *Naturwissenschaften*, 95 (3): 177.
- Nepi, M., von Aderkas, P., Wagner, R., Mugnaini, S., Coulter, A., Pacini, E. (2009). Nectar and pollination drops: how different are they?. *Annals of Botany*, 104: 205–219.
- Nepi, M., von Aderkas, P., Pacini, E. (2012). Sugary exudates in plant pollination. *Signaling and Communication in Plants*, 12: 155–185.
- Nepi, M. (2014a). Nectar: plant interface for complex interactions with biotic environment. In: Ramawat KG, Me´rillon JM, Shivanna KR, eds. *Reproductive biology of plants*. Boca Raton: CRC Press: 268–283.
- Nepi, M. (2014b). Beyond nectar sweetness: the hidden ecological role of non-protein amino acids in nectar. *Journal of Ecology*, 102: 108-115.
- Nepi, M., Giannetti, D., Mori, A., Guarnieri, M., Grasso, D.A., Mancuso, S. (2017). Foraging ants affect the ctivity of extra-floral nectary and nectar composition of *Prunus avium L.* 112° Congresso della Società Botanica Italiana- VI International Plant Science Conference (IPSC), Parma 20-23 Settembre 2017.
- Nepi, M., Grasso D. A, Mancuso, S. (2018). Nectar in Plant–Insect Mutualistic Relationships: From Food Reward to Partner Manipulation. *Frontiers in Plant Science* 9:1063 1-14.
- Ness, J. (2003). *Catalpa bignonioides* alters extrafloral nectar production after herbivory and attracts ant bodyguards. *Oecologia*, 134: 210–218.
- Ness, J. H., Morris, W. F., and Bronstein, J. L. (2009). For ant-protected plants, the best defense is a hungry offense. *Ecology*, 90: 2823-2831.
- Ness, J., Mooney, K., Lach, L. (2010). Ants as mutualists. *Ant ecology*, 97-114.
- Nicolson, S. W., Thornburg, R. W. (2007). “Nectar chemistry,” in *Nectaries and Nectar*, eds S. W. Nicolson, M. Nepi, and E. Pacini (Dordrecht: Springer): 215–264.
- Novotny, V., Basset, Y., Auga, J., Boen, W., Dal, C. (1999). Predation risk for herbivorous insects on tropical vegetation: A search for enemy-free space and time. *Australian Journal of Ecology*, 24: 477–83.
- O'Dowd, D. J. (1982). Pearl bodies as ant food: an ecological role for some leaf emergences of tropical plants. *Biotropica*: 40-49.
- Offenberg, J. (2015). Ants as tools in sustainable agriculture. *Journal of Applied Ecology*, 52 (5): 1197-1205.

- Pacini, E., Nepi, M. (2007). Nectar production and presentation. In Nectaries and nectar (pp. 167-214). Springer, Dordrecht.
- Pavan, M. (1959). Attività italiana per la lotta biologica con formiche del gruppo *Formica rufa* contro gli insetti dannosi alle foreste. Ministero dell'Agricoltura e delle Foreste, Collana verde 4: 1-80.
- Peakall, R., Handel, S.N. and Beattie, A.J. (1991). The evidence for, and importance of, ant pollination. In Ant-Plant Interactions (C.R. Huxley and D.F. Cutler, eds), Oxford University Press: 421-428.
- Penzing O. (1892). Ueber die Perldrüsen des Weinstockes und anderer Pflanzen. Att del Congr. Bot. Intern. *Genoa*: 237-345.
- Escalante-Pérez, M., Heil, M. (2012). Nectar secretion: its ecological context and physiological regulation. In Secretions and exudates in biological systems (pp. 187-219). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Perfecto, I., Vandermeer, J.H. (1994). Understanding biodiversity loss in agroecosystems: Reduction of ant diversity resulting from transformation of the coffee ecosystem in Costa Rica. *Entomology Trends in Agricultural Sciences* 2: 7-13.
- Philpott, S.M., Foster, P.F. (2005). Nest-site limitation in coffee agroecosystems: artificial nests maintain diversity of arboreal ants. *Ecological Applications* 15: 1478-1485.
- Price, W.P. (2005) Adaptive radiation of gall-inducing insects. *Basic and Applied Ecology* 6: 413-421.
- Pulice, C. E., Packer, A. A. (2008). Simulated herbivory induces extrafloral nectary production in *Prunus avium*. *Functional Ecology* 22: 801-807.
- Putz F. E., Holbrook N. M. (1988). Further Observations on the Dissolution of Mutualism between *Cecropia* and Its Ants: The Malaysian Case *Oikos* Vol. 53, Fasc. 1: 121-125.
- Rathcke, B. J., Poole, R. W. (1975). Coevolutionary race continues: butterfly larval adaptation to plant trichomes. *Science* 187(4172): 175-176.
- Redfern, M., Shirley, P. (2002). British plant galls: identification of galls on plants and fungi. FSC publications.
- Regal, P.J. (1977). Ecology and Evolution of Flowering Plant Dominance. *Science* 061: 622-629.
- Rickson, F.R. (1971). Glycogen plastids in Mullerian body cell of *Cecropia Peltata*, a higher green plant. *Science* 173 : 344-347.
- Rickson, F.R. (1980). Developmental anatomy and ultrastructure of the Ant-food bodies (Beccarian bodies) of *Macaranga triloba* and *M. hypoleuca* (Euphorbiaceae). *American Journal of Botany* 67(3) : 285-292 .

- Rico-Gray, V. (1993). Use of plant-derived food resources by ants in the dry tropical lowlands of coastal Veracruz, Mexico. *Biotropica* 25, 301–315.
- Rico-Grey, V., Oliveira, P.S. (2007). *The ecology and evolution of ant-plant interactions*. Chicago: The University of Chicago Press.
- Rodriguez, E., Begoña, P., Gurrea, M. P. (2012). Effect of Scotch broom, *Cytisus scoparius*, pod size and patch density on *Exapion fuscirostre* (Coleoptera, Apionidae) seed weevil oviposition. *Australian Journal of Entomology*, 51: 127–132.
- Ronquist, F., Nieves-Aldrey, J.L., Buffington, M.L., Liu, Z., Liljeblad, J., Nylander, J.A.A. (2015). Phylogeny, evolution and classification of gall wasps: the plot thickens. *PLoS ONE*, 10(5): 1-40.
- Rosumek, F.B., Silveira, F.A.O., Neves, F.S., Barbosa, N.P., Diniz I., Oki Y., Pezzini F., Fernandes G.W., Cornelissen T. (2009). Ants on plants: a meta-analysis of the role of ants as plant biotic defenses. *Oecologia*, 160: 537–549.
- Rudgers, J.A., Hodgen, J.G., White, J.W. (2003). Behavioral mechanisms underlie an ant-plant mutualism. *Oecologia*, 135: 51–59.
- Santini, G., Tucci, L., Ottonetti, L. & Frizzi, F. (2007) Competition trade-offs in the organisation of a Mediterranean ant assemblage. *Ecological Entomology*, 32: 319-326.
- Santini, G., Ramsay, M.P., Tucci, L., Ottonetti, L. & Frizzi, F. (2011) Spatial patterns of the ant *Crematogaster scutellaris* in a model ecosystem. *Ecological Entomology*, 36: 625-634.
- Santos, L.R., Feitosa, R.M. & Carneiro, M.A.A. (2017). The role of senescent stem-galls over arboreal ant communities structure in *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish (Asteraceae) Trees. *Sociobiology*, 64(1): 7-13.
- Sarkar, S., Wang, E., Wu, S., & Lei, Z. (2018). Application of Trap Cropping as Companion Plants for the Management of Agricultural Pests: A Review. *Insects*, 9 (4): 128.
- Schmitz, O. J., Hambäck, P. A., & Beckerman, A. P. (2000). Trophic cascades in terrestrial systems: a review of the effects of carnivore removals on plants. *The American Naturalist*, 155 (2): 141-153.
- Soulié, J. (1961). Les nids et le comportement nidificateur des Fourmis du genre *Crematogaster* d'Europe, d'Afrique du Nord et d'Asie du Sud-Est. *Insectes sociaux* 8(3): 213-297.
- Soulie, J. (1956). La nidification chez les espèces françaises du genre *Crematogaster* lund (Hymenoptera-Formicoidea). *Insectes Sociaux*, 3 (1): 93-105.
- Schmitz, O. J., Hambäck, P. A., & Beckerman, A. P. (2000). Trophic cascades in terrestrial systems: a review of the effects of carnivore removals on plants. *The American Naturalist*, 155 (2): 141-153.

- Schönrogge, K., Harper L. J., Lichtenstein C. P. (2000). The protein content of tissues in cynipid galls (Hymenoptera: Cynipidae): Similarities between cynipid galls and seeds. *Plant, Cell and Environment*, 23: 215-222.
- Shorthouse, J. D., Woolb D, Ramanc A. (2005). Gall-inducing insects – Nature’s most sophisticated herbivores. *Basic and Applied Ecology*, 6: 407-411.
- Shovon, C. S, Endong, W., Shengyong, W., Zhongren, L. (2018). Application of Trap Cropping as Companion Plants for the Management of Agricultural Pests: A Review. *Insects*, 9: 128.
- Smith, L. L., Lanza, J., and Smith, G. C. (1990). Aminoacid concentrations in the extrafloral nectar of *Impatiens sultani* increase after simulated herbivory. *Ecology*, 71: 107–115.
- Soria, F.J., Villagrán, M., Ocete, M.E. (1994). Estudio del comportamiento alimentario de *Crematogaster scutellaris* Oliv. (Hym. Formicidae) en tres alcornoques del SW español. *Boletín de sanidad vegetal. Plagas*, 20 (4): 637-642.
- Styrsky, J.D., Eubanks, M.D. (2007). Ecological consequences of interactions between ants and honeydew producing insects. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 274: 151–164.
- Stone, G.N., Schönrogge, K., Atkinson, R., Bellido, D., Pujade-Villar, J. (2002). The population biology of oak gall wasps (Hymenoptera, Cynipidae). *Annual review of entomology*, 47 (1): 633–668.
- Stone, G. N., Schönrogge, K. (2003). The adaptive significance of insect gall morphology. *Trends in Ecology & Evolution*, 18 (10): 512-522.
- Takhtajan, A.(1969). *Flowering plants: Origin and dispersal*. Oliver and Boyd, Edinburgh.
- Tempel, A. S. (1983). Bracken fern (*Pteridium aquilinum*) and nectar-feeding ants: a nonmutualistic interaction. *Ecology*, 64: 1411-1422.
- Tilman, D. (1978). Cherries, ants and tent caterpillars: timing of nectar production in relation in relation to susceptibility of catepillars to ant predation. *Ecology*, 59 (4): 686-692.
- Tòrossian, P.C. (1972) Etude biologique des fourmis forestieres peuplant les galles de Cynipidae des chenes: III. Role et importance numerique des femelles fondatrices. *Insectes sociaux*, 19: 25-38.
- Trager, M. D., Bhotika, S., Hostetler, J. A., Andrade, G. V., Rodriguez-Cabal, M. A., McKeon, C. S., & Bolker, B. M. (2010). Benefits for plants in ant-plant protective mutualisms: a meta-analysis. *PLoS One*, 5(12): 1-9.
- Truong, D. H., Nguyen, H. C., Bauwens, J., Mazzucchelli, G., Lognay, G., Francis, F. (2018). Plant defense in response to chewing insects: proteome analysis of *Arabidopsis thaliana* damaged by *Plutella xylostella*. *Journal of Plant Interactions*, 13 (1): 30-36.

- Vandermeer, J., Perfecto, I., Guillermo, I. N., Phillpot, S., Ballinas, A. G. (2002). Ants (*Azteca* sp.) as potential biological control agents in shade coffee production in Chiapas, Mexico. *Agroforestry Systems*, 56: 271-276.
- Van Mele, P., Cuc, N. T. (2001). Farmers' perceptions and practices in use of *Dolichoderus thoracicus* (Smith) (Hymenoptera: Formicidae) for biological control of pests of sapodilla. *Biological Control*, 20 (1): 23-29.
- Van Mele, P. (2008). A historical review of research on the weaver ant *Oecophylla* in biological control. *Agricultural and Forest Entomology*, 10: 13-22.
- Villagran, M., Soria, F.J., Ocete, M.E. (1992). Estudio del comportamiento alimentario de *Crematogaster scutellaris* Oliv. (Hym. Formicidae) en tres alcornoques del SW español. *Bol San Veg Plagas* 20: 637-642.
- Way, M. J., Khoo K. C. (1992). Role of ants in pest management. *Annual review of entomology*, 37: 479-503.
- Way, M.J., Cammell, M.E., Paiva, M.R., Collingwood, C.A. (1997) Distribution and dynamic of the Argentine ant *Linepithema (Iridomyrmex) humile* (Mayr) in relation to vegetation, soil conditions, topography and native competitor ants in Portugal. *Insectes Sociaux* 44, 415-433.
- Weber, M.G, Agrawal, A. A. (2014). Defense mutualisms enhance plant diversification. *PNAS*, 111: 16442-16447.
- Weber, M.G., Porturas, L.D., Keeler, K.H., (2015). World list of plants with extrafloral nectaries. www.extrafloralnectaries.org. (12/10/2018).
- Whittaker, R. H., Feeny, P. P. (1971). Allelochemicals: chemical interactions between species. *Science*, 171 (3973): 757-770.
- Wilder, S. M., Eubanks, M. D. (2010). Extrafloral nectar content alters foraging preferences of a predatory ant. *Biology letters*, 6: 177-179.
- Wünsch, A., Hormaza, J. I. (2004). Molecular evaluation of genetic diversity and S-allele composition of local Spanish sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 51 (6): 635-641.
- Zimmermann, J. (1932). Über die extrafloralen nektarien der angiosperm. *Beihefte Zur Botanische Zentralblatt*, 49: 99-196.



Università
degli Studi
di Ferrara

Sezioni

Dottorati di ricerca

Il tuo indirizzo e-mail
gnndnl@unife.it

Oggetto:
Dichiarazione di conformità della tesi di Dottorato

Io sottoscritto Dott. (Cognome e Nome)
Giannetti Daniele

Nato a:
Sarzana

Provincia:
La Spezia

Il giorno:
17/08/1984

Avendo frequentato il Dottorato di Ricerca in:
Biologia Evoluzionistica ed Ecologia

Ciclo di Dottorato
31

Titolo della tesi:
Mutualismo e manipolazione nelle relazioni tra formiche e piante: aspetti ecoetologici e applicativi.

Titolo della tesi (traduzione):
Mutualism and manipulation in ant-plant relationships: eco-ethological and applicative aspects.

Tutore: Prof. (Cognome e Nome)
Grasso Donato A.

Settore Scientifico Disciplinare (S.S.D.)
BIO/05

Parole chiave della tesi (max 10):
ant-plant interactions, mutualism, indirect defence, extrafloral nectar, behavioural manipulation, myrmecophilous plants, social insects, gall colonization, nest architecture

Consapevole, dichiara

CONSAPEVOLE: (1) del fatto che in caso di dichiarazioni mendaci, oltre alle sanzioni previste dal codice penale e dalle Leggi speciali per l'ipotesi di falsità in atti ed uso di atti falsi, decade fin dall'inizio e senza necessità di alcuna formalità dai benefici conseguenti al provvedimento emanato sulla base di tali dichiarazioni; (2) dell'obbligo per l'Università di provvedere al deposito di legge delle tesi di dottorato al fine di assicurarne la conservazione e la consultabilità da parte di terzi; (3) della procedura adottata dall'Università di Ferrara ove si richiede che la tesi sia consegnata dal dottorando in 2 copie, di cui una in formato cartaceo e una in formato pdf non modificabile su idonei supporti (CD-ROM, DVD) secondo le istruzioni pubblicate sul sito: <http://www.unife.it/studenti/dottorato> alla voce ESAME FINALE – disposizioni e modulistica; (4) del fatto che l'Università, sulla base dei dati forniti, archiverà e renderà consultabile in rete il testo completo della tesi di dottorato di cui alla presente dichiarazione attraverso l'Archivio istituzionale ad accesso aperto "EPRINTS.unife.it" oltre che attraverso i Cataloghi delle Biblioteche Nazionali Centrali di Roma e Firenze. DICHIARO SOTTO LA MIA RESPONSABILITÀ: (1) che la copia della tesi depositata presso l'Università di Ferrara in formato cartaceo è del tutto identica a quella presentata in formato elettronico (CD-ROM, DVD), a quelle da inviare ai Commissari di esame finale e alla copia che produrrà in seduta d'esame finale. Di conseguenza va esclusa qualsiasi responsabilità dell'Ateneo stesso per quanto riguarda eventuali errori, imprecisioni o omissioni nei contenuti della tesi; (2) di prendere atto che la tesi in formato cartaceo è l'unica alla quale farà riferimento l'Università per rilasciare, a mia richiesta, la dichiarazione di conformità di eventuali copie. PER ACCETTAZIONE DI QUANTO SOPRA RIPORTATO

Dichiarazione per embargo
6 mesi

Richiesta motivata embargo
1. Tesi in corso di pubblicazione

Liberatoria consultazione dati Eprints

Consapevole del fatto che attraverso l'Archivio istituzionale ad accesso aperto "EPRINTS.unife.it" saranno comunque accessibili i metadati relativi alla tesi (titolo, autore, abstract, ecc.)

Firma del dottorando

Ferrara, li 22/02/2019 (data) Firma del Dottorando

Firma del Tutore

Visto: Il Tutore Si approva Firma del Tutore