

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA DEL COMPORTAMENTO

Dipartimento di Biologia Evolutiva e Funzionale
Università degli Studi di Parma

COMUNICAZIONE DI ALLARME E DIFESA COOPERATIVA IN SPECIE SIMPATRICHE DEL GENERE *FORMICA* (HYMENOPTERA, FORMICIDAE): SEGNALI CHIMICI, ASPETTI COMPORTAMENTALI E COEVOLUZIONE

TUTORI:

Chiar.ma Prof.ssa ALESSANDRA MORI

Chiar.mo Prof. DONATO A. GRASSO

Chiar.mo Prof. FRANCESCO LE MOLI

**DOTTORANDO
VITTORIO TAMARRI**

INDICE

CAPITOLO 1	3
La comunicazione nelle società delle formiche	4
1.1 La comunicazione acustica	4
1.2 La comunicazione tattile	4
1.3 La comunicazione chimica	5
1.3.1 Le sorgenti ghiandolari nella comunicazione chimica delle formiche	6
1.3.2 Aspetti etologici della comunicazione chimica delle formiche	11
CAPITOLO 2	16
Difesa della colonia e comunicazione di allarme nelle formiche	17
2.1 La funzione difensiva delle mandibole	19
2.2 La comunicazione di allarme	20
2.3 Le sorgenti ghiandolari coinvolte nella comunicazione di allarme	21
2.4 I feromoni di allarme	24
CAPITOLO 3	29
Tecniche per lo studio della comunicazione chimica negli insetti	30
3.1 Bioassays: considerazioni generali	32
3.2 Bioassays: i composti volatili	34
3.3 Bioassays: l'elettroantennografia	37
3.4 Analisi chimica: la purificazione del feromone	39
3.5 Analisi chimica: la separazione dei composti	43
3.6 Analisi chimica: l'identificazione dei composti	45
3.7 Analisi chimica: la sintesi del feromone	46
CAPITOLO 4	47
Scopo	48
CAPITOLO 5	50
Specie studiate	51

CAPITOLO 6	54
Il comportamento difensivo e la reazione di allarme nelle due specie simpatriche <i>Formica cunicularia</i> e <i>Formica rufibarbis</i> (HYMENOPTERA, FORMICIDAE)	55
CAPITOLO 7	74
Individuazione delle sorgenti ghiandolari dei feromoni di allarme in <i>Formica</i> <i>cunicularia</i> (HYMENOPTERA, FORMICIDAE)	75
CAPITOLO 8	97
Individuazione delle sorgenti ghiandolari dei feromoni di allarme in <i>Formica</i> <i>cunicularia</i> (HYMENOPTERA, FORMICIDAE)	98
CAPITOLO 9	121
La comunicazione di allarme in <i>Formica cunicularia</i> : identificazione e ruolo del 3- etil-4-metilpentanolo quale componente del feromone di allarme	122
CAPITOLO 10	140
Conclusioni generali	141
CAPITOLO 11	145
Riassunto	146
Summary	148
CAPITOLO 12	150
Bibliografia	151

Capitolo 1

LA COMUNICAZIONE NELLE SOCIETÀ DELLE FORMICHE

Sono tre i principali tipi di comunicazione nelle formiche: chimica, tattile e acustica. Sono stati osservati e studiati anche alcuni casi di comunicazione di tipo visivo (le formiche possiedono grandi occhi composti in grado di percepire variazioni di luminosità e di movimento), ma non sembrano svolgere un ruolo fondamentale all'interno di queste società (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990).

Comportamento particolare che sembra aver avuto un ruolo cruciale nella comunicazione è il fenomeno della *trofallassi*, ossia lo scambio di cibo liquido tra due membri della stessa colonia. Con questo processo, oltre allo scambio di cibo, avviene anche il passaggio di informazioni tramite segnali chimici che contribuiscono a rinforzare i legami tra gli individui.

1.1 LA COMUNICAZIONE ACUSTICA

L'uso di segnali vibrazionali è abbastanza sviluppato all'interno di una colonia ed è spesso associata ad una segnalazione di tipo chimico. I comportamenti mediati da questo tipo di comunicazione sono principalmente l'allarme, il reclutamento e, in alcuni casi, la fine della disponibilità all'accoppiamento da parte delle femmine. Sono state identificate due sorgenti sonore principali: il tamburellamento di parti del corpo su un substrato e la stridulazione prodotta dallo sfregamento di parti del corpo specializzate (WILSON, 1971; HÖLLDOBLER e WILSON, 1990).

1.2 LA COMUNICAZIONE TATTILE

L'uso di segnali di tipo tattile può essere identificato quasi esclusivamente con il "linguaggio antennale", termine che indica l'insieme dei movimenti delle antenne di un

individuo sul corpo di un altro (WASMANN, 1899). Studi più recenti hanno dimostrato come le antenne siano la sede di numerosi recettori chimici e vengono quindi considerate come organi di ricezione piuttosto che di trasmissione (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990). Gli unici casi di “vera” comunicazione tattile sono stati dimostrati in comportamenti di reclutamento (HÖLLDOBLER, 1984b; HÖLLDOBLER *et al.*, 1974; MASCHWITZ *et al.*, 1974) e di trofallassi (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990).

1.3 LA COMUNICAZIONE CHIMICA

La comunicazione chimica è garantita dall’emissione di sostanze chimiche con funzione di segnali (*semiochemicals*). I *semiochemicals* si differenziano dagli ormoni in quanto i primi sono composti liberati dall’organismo nell’ambiente esterno a scopo comunicativo, mentre gli altri sono sostanze endogene che regolano la fisiologia dell’organismo stesso. Tuttavia, gli ormoni, i cataboliti e le sostanze liberate dalle ferite rappresentano una fonte di possibili precursori da cui si possono evolvere i segnali chimici: una anche accidentale emissione di queste sostanze nell’ambiente esterno può dare avvio ad un processo di ritualizzazione nel caso in cui rispondere a questi composti porti a dei vantaggi in termini di adattamento.

I segnali chimici sono composti in grado di trasmettere informazioni ad individui della stessa specie (si parlerà quindi di comunicazione chimica *intraspecifica*) o di specie diverse (comunicazione *interspecifica*) (LAW e REGNIER, 1971). Questo tipo di comunicazione è molto favorevole dal punto di vista energetico poiché anche solo piccole quantità di sostanza sono in grado di provocare una risposta comportamentale che può durare ore o addirittura giorni. La durata dipende dalla composizione molecolare della sostanza emessa, a sua volta strettamente legata al tipo di messaggio che deve essere trasmesso. Segnali di messaggi che devono raggiungere il massimo numero di individui e diffondersi rapidamente, come ad esempio i segnali di allarme, hanno peso molecolare molto basso e di conseguenza alta volatilità. Al contrario, segnali che devono persistere per un tempo maggiore nell’ambiente, come i segnali di traccia, hanno un maggior peso molecolare ed una minore volatilità.

In base al tipo di interazione che mediano, i segnali chimici vengono divisi in:

- **Feromoni:** utilizzati nella comunicazione intraspecifica, vengono secreti all'esterno suscitando una risposta comportamentale in individui della stessa specie. A seconda della modalità d'azione, si distinguono feromoni *scatenanti* e feromoni *innescanti*. I primi agiscono direttamente sul sistema nervoso centrale del ricevente e determinano una risposta comportamentale immediata e reversibile; mentre i secondi provocano delle modificazioni di tipo fisiologico nel ricevente, che solo in un secondo momento esprimerà una risposta comportamentale (WILSON e BOSSERT, 1963). I feromoni sono alla base della complessa struttura e funzione delle società degli insetti. Essi mediano il riconoscimento dei consanguinei e degli appartenenti alla propria colonia, la riproduzione, la determinazione della casta, il comportamento d'allarme ed il reclutamento (GRASSWITZ e JONES, 2003).
- **Allomoni:** generalmente mediano interazioni interspecifiche e portano vantaggio all'emittitore e non al ricevente. In questo caso la comunicazione assume i connotati di un processo di manipolazione del ricevente da parte dell'emittitore. Fanno parte di questo tipo di segnali tutte quelle sostanze secrete dai predatori (numerose specie di invertebrati ma anche vertebrati e piante) per attirare le prede (BROWN, 1968; GRASSWITZ e JONES, 2003).
- **Cairomoni:** al contrario degli allomoni, portano vantaggio al ricevente e non all'emittitore. Questi stimoli chimici hanno un ruolo importante nella ricerca del cibo e nel rapporto preda-predatore, stimolando ad esempio nella preda i comportamenti di fuga (GRASSWITZ e JONES, 2003).

1.3.1 LE SORGENTI GHIANDOLARI NELLA COMUNICAZIONE CHIMICA DELLE FORMICHE

In base al ruolo che devono svolgere e al contesto in cui sono utilizzate, le ghiandole esocrine, sede della produzione dei segnali chimici, variano sia nella forma che nella

distribuzione nell'ambito dei maggiori gruppi di formiche (BILLEN e MORGAN, 1998). Alcune ghiandole sono peculiari di alcuni generi e sembrano essersi evolute "ex novo" durante il corso dell'evoluzione sociale: questo è il caso delle ghiandole rettali e sternali di *Oecophylla*, della ghiandola cloacale di *Camponotus* e della ghiandola pigidiale di *Polyergus* (HÖLLDOBLER e WILSON, 1978; HÖLLDOBLER, 1982a, b; 1984). Altre, come la ghiandola del veleno delle Formicinae e la ghiandola sternale di Pavan delle Anauretinae e delle Dolichoderinae, rappresentano dei buoni caratteri sistematici in quanto sono peculiari di alcuni taxa e quindi utili per la ricostruzione filogenetica all'interno della famiglia Formicidae. Al contrario, le ghiandole metapleurali sono le uniche ad essere comuni a tutte le formiche (MASCHWITZ, 1974; HÖLLDOBLER e HENGEL-SIEGEL, 1984). In base alla cosiddetta "regola della parsimonia dell'evoluzione" (o Regola di Romer) l'evoluzione di nuovi organi con nuove funzioni sarebbe il risultato di modificazioni di organi già esistenti.

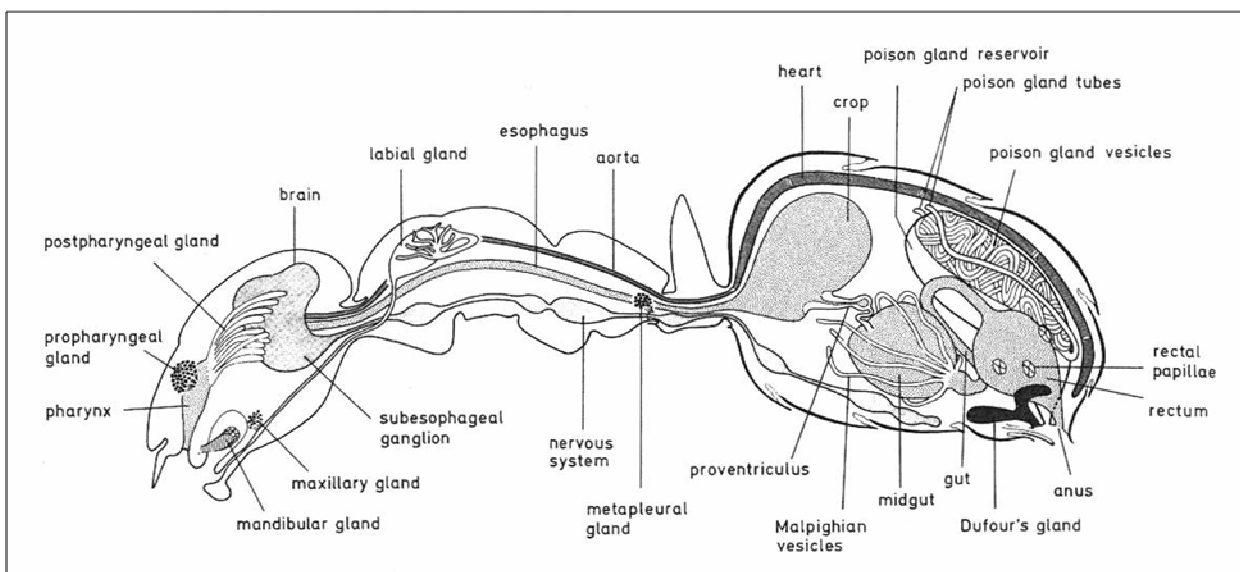


Fig. 1.1

Le principali ghiandole di una formica del genere *Formica* (da EMMERT, 1968).

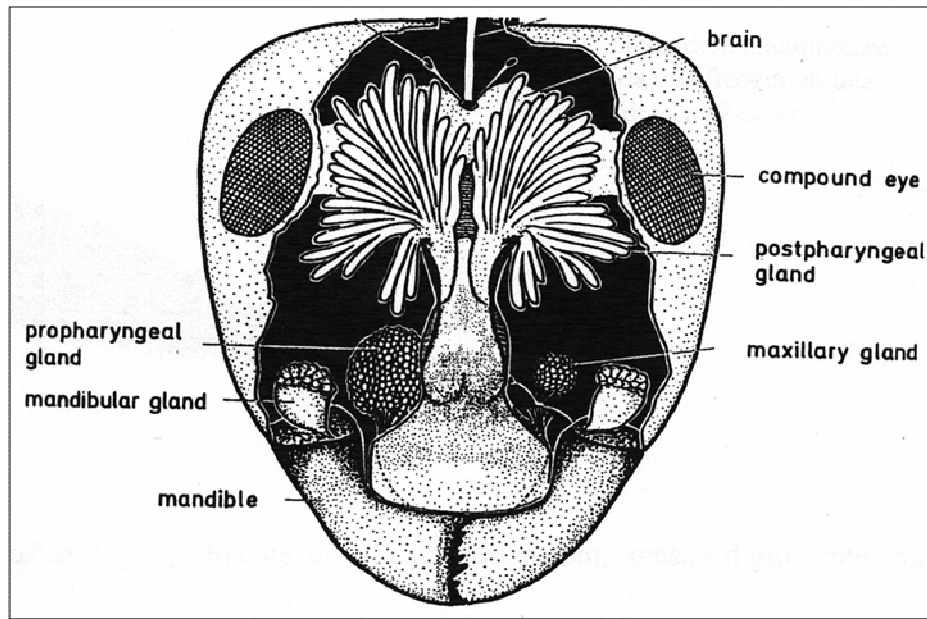


Fig. 1.2
Le principali ghiandole cefaliche delle formiche (da EMMERT, 1968)

Tra le ghiandole principali diffuse tra le formiche, meritano particolare attenzione la ghiandola mandibolare, la ghiandola di Dufour, le ghiandole associate al sacco rettale, la ghiandola del veleno e la ghiandola pigidiale. Tutte differiscono per forma e funzione nei diversi taxa.

- La *ghiandola mandibolare* è localizzata a livello di ciascuna mandibola ed è costituita da un ben determinato gruppo di cellule secretrici, i cui dotti si aprono all'interno di un serbatoio sacciforme (BILLEN, 1993). Il dotto principale sbocca sul bordo anteriore della mandibola e non è dotato di muscolatura che ne regola l'apertura (BLUM *et al.*, 1968). La presenza di un reticolo endoplasmatico liscio ben sviluppato a livello della sottile parete di tali ghiandole è indice di un'intensa attività secretoria costituita essenzialmente dalla produzione di alcoli, aldeidi e chetoni (BILLEN, 1993; HÖLLDOBLER e WILSON, 1990). Da un punto di vista funzionale, nella sottofamiglia delle Formicinae, i secreti di tali ghiandole vengono generalmente impiegati come feromoni di allarme e di difesa (MASCHWITZ, 1964; WILSON e REGNIER, 1971), mentre nei maschi di alcune specie fungono da feromoni sessuali (HÖLLDOBLER e MASCHWITZ, 1965; LAW *et al.*, 1965). Sempre in questa sottofamiglia sono stati evidenziati casi di ghiandole mandibolari ipertrofiche che si estendono anche fino

al torace e all'addome (come in *Camponotus saundersi*), il cui secreto irritante e appiccicoso espulso all'esterno da particolari punti di rottura della cuticola ha un'importante funzione difensiva (MASCHWITZ e MASCHWITZ, 1974). Infine, nel genere *Calomyrmex*, il secreto delle ghiandole mandibolari ha una funzione antimicrobica (BROUGH, 1983).

- La ghiandola di Dufour generalmente di piccole dimensioni e di forma allungata, ma spesso si presenta bulbosa o bilobata, si apre alla parte terminale dell'addome, vicino alla ghiandola del veleno. Nelle sottofamiglie Dorylinae, Ponerinae e Myrmicinae emette il suo contenuto indipendentemente dalla ghiandola del veleno (WHELDEN, 1960; HERMANN e BLUM, 1967a, b). Nelle formicinae i due secreti, in genere, vengono emessi contemporaneamente (PERCY e WEATHERSON, 1974). Tuttavia, studi condotti su *Formica sanguinea*, *Formica fusca* e *Lasius fuliginosus* hanno dimostrato la presenza di un apparato di chiusura strettamente connesso alla ghiandola: si tratta di quattro set di muscoli, due dei quali attaccati direttamente al dotto ghiandolare; l'apertura è regolata dall'attiva contrazione dei muscoli, mentre la chiusura dal loro rilassamento (BILLEN, 1982). Indagini ultrastrutturali dell'epitelio hanno dimostrato che questo varia in modo significativo tra le varie sottofamiglie di formiche.

Il secreto della ghiandola ha funzioni diverse in base alle specie: può essere coinvolto nei comportamenti d'allarme e difesa (WILSON e REGNIER, 1971), di trail-following (VANDER MEER *et al.*, 1981; GRASSO *et al.*, 1999), di reclutamento (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990; GRASSO *et al.*, 1999) e di attrazione sessuale (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990). Il secreto della ghiandola di Dufour è generalmente rappresentato da idrocarburi e suoi derivati, come chetoni o acetati a lunga catena (BLUM e HERMANN, 1978; ATTYGALE e MORGAN, 1984; MORGAN, 1984). Tuttavia, anche la composizione chimica non è uniforme tra le formiche: nel genere *Formica*, ad esempio, il contenuto della ghiandola è costituito da molecole che vanno dagli alcani agli acetati alifatici, passando per gli alcani metil-ramificati, gli alcheni, i chetoni, gli alcoli, le aldeidi, i farneseni e gli acetati. (ALI *et al.*, 1987).

- L'apparato ghiandolare del veleno consiste, generalmente, in un paio di ghiandole filamentose che, successivamente, confluiscono in un'unica ghiandola convoluta,

che sbocca in un sacco del veleno (detto anche reservoir) caratterizzato da pareti molto sottili. La ghiandola convoluta si trova in posizione dorsale rispetto al sacco del veleno, condizione tipica degli imenotteri (BLUM e HERMANN, 1978; BILLEN, 1993). La funzione principale di questa ghiandola è la produzione di acido formico (nelle Formicinae) o altri veleni usati a scopo difensivo o predatorio. Nelle sottofamiglie primitive delle Ponerinae, Myrmeciinae, Pseudomyrmecinae, Dorylinae e Ecitoninae il veleno prodotto da tale ghiandola è di natura proteica, come in altri imenotteri aculeati, ed ha azione neurotossica e/o istolitica provocando l'immobilizzazione dei nemici contro i quali è rilasciato. Esso è doloroso e tossico anche per l'uomo. In alcune specie di Myrmicinae e di Formicinae, una parte minore dei costituenti della ghiandola può essere impiegata durante l'allarme ed il reclutamento. La ghiandola del veleno più sviluppata è quella presente nelle Formicinae, in cui la ghiandola convoluta vera e propria è localizzata sul dorso del sacco del veleno. Il sacco è largo e contiene, in tale sottofamiglia, abbondanti quantità di "acido formico" (HEFETZ e BLUM, 1978): uno dei primi prodotti naturali isolati in forma pura dal distillato di operaie di Formica nel 1670 (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990).

- La *ghiandola rettale* non ha una struttura unica: in generale, in tutte le formiche, è possibile individuare un sacco rettale a forma di ampolla che sbocca direttamente nell'ano e sulle cui pareti si sviluppano una ghiandola dorsale ed un paio di ghiandole lentiformi laterali. Le feci e le secrezioni urinarie prodotte a livello dei tubuli del Malpighi si accumulano nella ampolla rettale e successivamente sono espulsi tramite la contrazione di fasci muscolari ad essa associati proprio a questo scopo (WHEELER, 1910). In specie della sottofamiglia delle Formicinae è stato appurato che il sacco rettale rilascia feromoni di traccia costituiti, in particolare, da acidi grassi a peso molecolare più o meno alto. Nella maggior parte dei casi, tali tracce hanno sia un effetto reclutante che orientante, mentre in altri casi queste sembrano avere un effetto esclusivamente orientante (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990).
- La *ghiandola pigidiale* è costituita da un gruppo di cellule che si trovano sotto il VI° tergite addominale ed i loro dotti si aprono a livello della membrana intersegmentale tra il VI° e il VII° tergite, il pigidio, da cui la ghiandola prende il

nome (JANET, 1898). Le sostanze prodotte da questa ghiandola hanno la funzione di feromoni d'allarme in tre generi di Myrmicinae; altre funzioni riconosciute sono quelle di feromoni di traccia e di reclutamento come in *Orectognathus versicolor* (HÖLLDOBLER, 1981) e di feromoni sessuali (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990). La ghiandola pigidiale è presente non solo nelle Myrmicine, ma anche in altre sottofamiglie quali le Ponerinae, le Myrmeciinae, le Dorylinae, le Pseudomyrmecinae e le Aneuretinae (HÖLLDOBLER e ENGEL, 1978). La sottofamiglia delle Formicinae manca di questo tipo di ghiandola; tranne che nel genere *Polyergus* nel quale esso sembra abbia avuto un'origine filogenetica non comparabile a quella delle altre formiche (HÖLLDOBLER, 1984).

1.3.2 ASPETTI ETOLOGICI DELLA COMUNICAZIONE CHIMICA DELLE FORMICHE

Nelle formiche, feromoni di tipo innescante vengono utilizzati dalla regina per inibire lo sviluppo ovario delle operaie e, più in generale, per la determinazione di casta attraverso scambi di tipo trofallattico. È importante sottolineare che questo tipo di feromoni in natura non viene utilizzato solo come sostanza inibente, ma può avere anche effetto di tipo contrario; è il caso di un feromone di superficie emesso dai maschi adulti della locusta migratrice (*Schistocera gregaria*), che accelera la crescita dei giovani di ambo i sessi per sincronizzare la maturazione all'interno del gruppo. Generalmente la sincronizzazione della maturità sessuale può essere attribuita nella maggioranza dei casi a feromoni di tipo innescante (AA. VV., 1992).

L'utilizzo di feromoni scatenanti è molto più ampio; questi controllano molti comportamenti all'interno di una società di formiche e, in base a questi comportamenti, vengono suddivisi in diverse categorie.

Di seguito sono trattati alcuni contesti comportamentali nei quali vengono utilizzati feromoni scatenanti.

RIPRODUZIONE

I feromoni coinvolti nel comportamento riproduttivo sono chiamati in modo generico *feromoni sessuali*, ma possono essere classificati in categorie differenti in base alla loro funzione nell'ambito della biologia riproduttiva. Gli attrattivi sessuali hanno un'azione generalmente a lungo raggio e sono utilizzati dall'emittitore per attirare verso di sé il ricevente, possono essere emessi da entrambi i sessi e agire in sinergia con gli altri attrattivi emessi da altri conspecifici. Un esempio è quello della formica *Doronomyrmex pacis* in cui sono le femmine a richiamare i maschi per l'accoppiamento. In questa specie la femmina assume una particolare posizione sollevando il gastro per facilitare l'emissione dei feromoni sessuali attrattivi (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990).

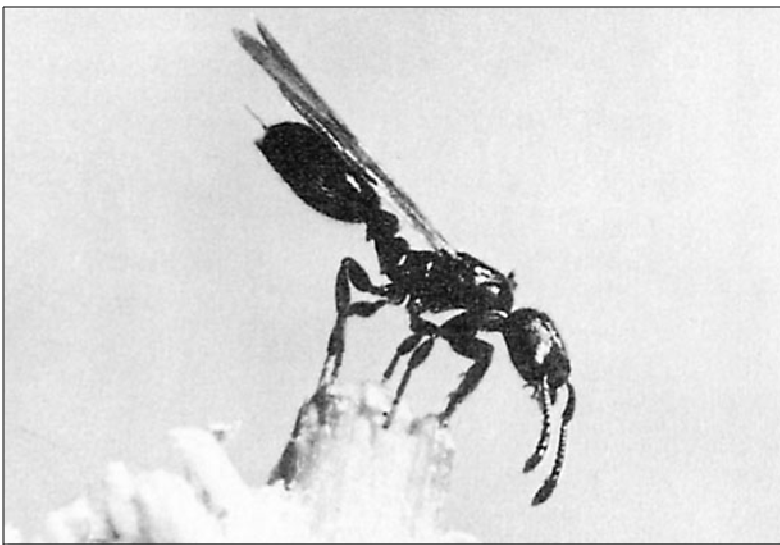


Figura 1.3
Comportamento riproduttivo della formica parassita *Doronomyrmex pacis*: fotografia di una femmina vergine in posizione di richiamo in cui estrude il pungiglione e emette degli attrattivi sessuali prodotti a livello della ghiandola del veleno (da HÖLLDOBLER e WILSON, 1990).

RECLUTAMENTO

Il reclutamento è il richiamo di una o più compagne verso una zona più o meno vicina dal nido in cui è richiesto lavoro (WILSON, 1971). Le forme di reclutamento possono essere classificate in quattro categorie fondamentali: *Tandem Running*, *Tandem Calling*, *Group Recruitment* e *Mass Recruitment*, differenti tra loro nel numero di formiche reclutate e

per il modo con cui è veicolata l'informazione. La forma più semplice è il *Tandem Running*, in cui una formica reclutante ne recluta un'altra tramite contatto antennale diretto. Nel *Tandem Calling* una formica ne recluta una seconda emettendo feromoni di richiamo, in aggiunta al contatto antennale diretto. Il *Group Recruitment* prevede che una formica recluti da 5 a 30 compagne attraverso la deposizione di feromoni di *traccia* nonché attuando *displays* motori di invito; la presenza di un leader è ancora necessaria in questa forma di reclutamento. La forma più complessa è il *Mass Recruitment* dove viene reclutato un numero molto elevato di compagne e la formica reclutante utilizza sia *feromoni di richiamo* per mobilitare le compagne che *feromoni di traccia*, depositati sul terreno, per guidare le compagne verso l'obiettivo (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990).

MARCATURA TERRITORIALE

Alcune specie di formiche utilizzano segnali chimici, colonia-specifici, che hanno il ruolo di marcare l'area difesa dalla colonia stessa e fungono quindi da *feromoni territoriali*. Similmente ai feromoni di traccia, sono particolarmente persistenti, presentando bassa volatilità e lenta diffusione. Questo garantisce una lunga persistenza e una sua validità anche in assenza dell'emettitore. Un esempio ben conosciuto dell'utilizzo di questi segnali chimici è quello della formica *Oecophylla longinoda* in cui studi approfonditi hanno messo in evidenza che le operaie hanno l'abitudine di rilasciare delle gocce di fluido dal sacco rettale distribuendole in tutto il loro territorio (HÖLLDOBLER e WILSON, 1978). Una situazione simile è stata recentemente scoperta nella formica mietitrice europea *Messor capitatus*, in cui spot rettali servono a marcare e riconoscere l'area limitrofa al nido (GRASSO *et al.*, 2005).

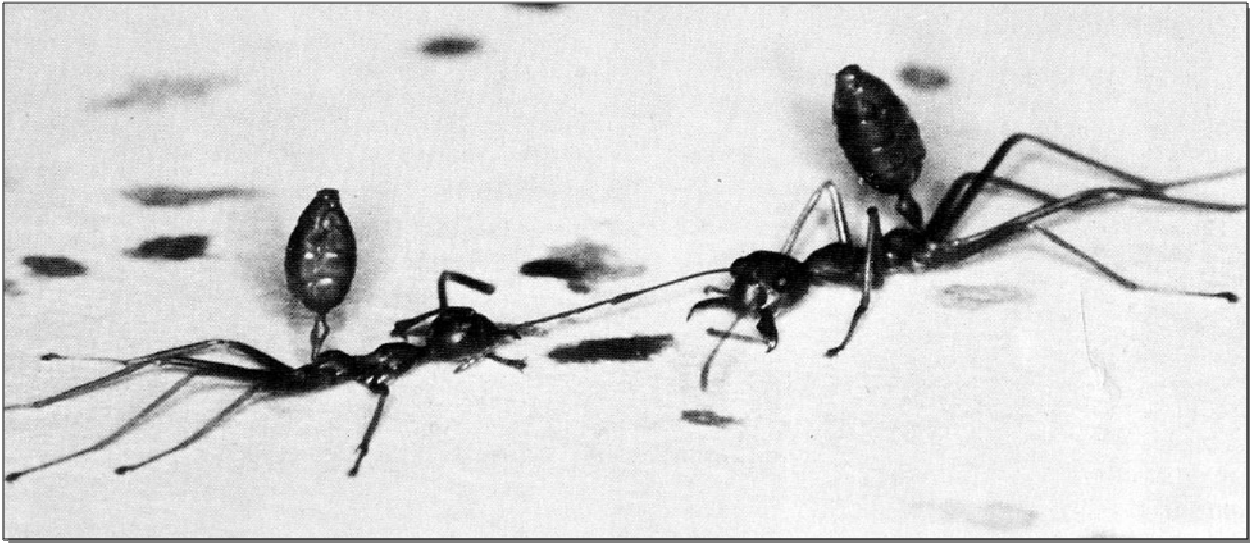


Figura 1.4

Marcatura chimica del territorio nella formica *Oecophylla longinoda*. Due formiche eterocoloniali stanno combattendo su un foglio di carta in cui sono visibili le marcature del territorio. La formica a sinistra appartiene alla colonia che ha marcato il territorio e sta prendendo il sopravvento sulla formica intrusa in quanto è riuscita ad afferrarle un'antenna (da HÖLLDOBLER e WILSON, 1990).

DIFESA

Le formiche fanno largo uso di *feromoni d'allarme* per avvisare i membri del gruppo di un pericolo reale o imminente. Tale aspetto verrà approfondito nel capitolo 2.

RICONOSCIMENTO INDIVIDUALE

Tramite una miscela di composti chimici, definiti *feromoni di riconoscimento*, possono essere veicolate una serie di informazioni sulla colonia, sul sesso e sulla casta di appartenenza, ma anche sull'età e sullo stato riproduttivo di sviluppo (WYATT, 2003). Nelle formiche, in particolare, la maggior parte dei segnali chimici di questo genere sono costituiti da idrocarburi epicuticolari (LENOIR *et al.*, 2001). Ogni individuo, durante lo sviluppo, acquisisce un modello dell'odore delle compagne, che poi può confrontare con gli odori degli altri individui con cui entrerà in contatto. Le somiglianze al modello acquisito permettono di discriminare i compagni di nido dagli estranei (LACEY e SHERMAN, 1983). Tipicamente, infatti, i membri di una colonia accettano i propri compagni di nido, ma rifiutano e spesso uccidono gli estranei con cui vengono a contatto (BREED, 1998).

Oltre a queste categorie più importanti, sono stati individuati anche *feromoni funerei*, particolari sostanze prodotte da formiche morte che stimolano le compagne a rimuovere i cadaveri all'interno del nido e a riunirle in pile all'esterno (AA. VV., 1992). Oltre ai feromoni più propriamente detti sono stati identificati anche allomoni, in particolare gli allomoni di *pacificazione* e di *propaganda*. I primi hanno lo scopo di ridurre sensibilmente l'aggressività del ricevente nei confronti dell'individuo o degli individui emittenti eterospecifici (HÖLLDOBLER, 1984; TOPOFF *et al.*, 1988; MORI *et al.*, 2000a,b); gli allomoni di propaganda sono tipici di specie parassite, come le formiche schiaviste, usati da operaie e regine per inattivare la difesa che le colonie ospiti oppongono al momento dell'invasione. Gli allomoni di propaganda agiscono provocando una grande confusione nella colonia ospite e le formiche, in preda al panico, fuggono o si attaccano a vicenda, rendendo la colonia più vulnerabile alla razzia e all'usurpazione (REGNIER e WILSON, 1971; ALLIES *et al.*, 1986; HÖLLDOBLER e WILSON, 1990).

Capitolo 2

DIFESA DELLA COLONIA E COMUNICAZIONE DI ALLARME NELLE FORMICHE

Negli insetti sociali, come le formiche, il comportamento di difesa può essere definito come qualsiasi modulo comportamentale che offre protezione o potenziale protezione all'individuo o alla colonia a cui appartiene (HERMANN e BLUM, 1981). In senso più generale, la difesa può coinvolgere vari meccanismi morfologici, chimici e comportamentali volti a mantenere l'omeostasi dell'individuo o della sua colonia (BUSCHINGER e MASCHWITZ, 1984). La necessità di difendersi da predatori e competitori, non solo dell'individuo (come negli insetti solitari) ma della colonia intera, con le sue vulnerabili regine e prole, può essere stata la causa dell'evoluzione di meccanismi di difesa altamente efficaci (BUSCHINGER e MASCHWITZ, 1984). La vita coloniale, a cui spesso sono associati fenomeni come il polietismo e il polimorfismo di casta, fornisce la possibilità di produrre, oltre alle normali operaie, anche soldati di vario genere. Questi possono essere specializzati per il combattimento e la difesa fino al punto di sacrificare la propria vita, come nella specie *Camponotus saundersi* (MASCHWITZ e MASCHWITZ, 1974). In generale, dove è presente un alto tasso di polimorfismo all'interno della casta operaia, si verifica che gli individui più grandi agiscono da soldati, come nelle formiche combattenti *Eciton* o *Dorylus*, le cui operaie maggiori hanno sviluppato teste molto grandi e mandibole falciformi (BUSCHINGER e MASCHWITZ, 1984). Nelle formiche, quindi, i meccanismi di difesa sono ristretti alle caste sterili, cioè alle operaie e, qualora presenti, ai soldati. I maschi non mostrano in apparenza nessun comportamento di difesa, a parte il nascondersi e il fuggire; allo stesso modo si comporta la regina che, in situazioni di pericolo, preferisce ritirarsi nel nido.

Un primo meccanismo di difesa, per così dire passivo, in quanto non presuppone nessuna azione attiva da parte delle formiche, è l'ispessimento della cuticola esterna (BUSCHINGER e MASCHWITZ, 1984). In base al contesto naturale (habitat) in cui vivono, esistono specie che hanno evoluto una "armatura" esterna dura e spessa e specie che hanno un tegumento esterno leggero e sottile. Specie a vita sotterranea in genere

presentano una cuticola sottile, come ad esempio *Chthonolasius* tra le Formicinae; specie con vita epigea o arborea, invece, possono avere una cuticola spessa come in *Cryptocerus*, *Atta*, *Cataulacus* e *Polyrhachis* tra le Ponerinae (BUSCHINGER e MASCHWITZ, 1984). Questa correlazione tra ambiente ed ispessimento della cuticola, tuttavia, non è sempre verificata; infatti, esistono specie come quelle appartenenti ai generi *Lasius* e *Formica*, che seppure epigee, non hanno una cuticola particolarmente spessa. Inoltre sembra chiaro che la necessità di movimenti rapidi e di una fuga veloce, come in alcune Formicinae, non possa coesistere con la presenza di una cuticola spessa, poiché di fatto appesantirebbe la formica rendendo impossibile questi comportamenti (BUSCHINGER e MASCHWITZ, 1984). Una correlazione ulteriore interessa la struttura della cuticola e il più importante strumento di difesa attiva: l'apparato del pungiglione. Formiche con pungiglione ben sviluppato, come ad esempio le Myrmeciinae, Ponerinae e molte altre Myrmicinae, sono dotate di una cuticola spessa, mentre formiche che si difendono spruzzando il nemico con acido formico o altre sostanze, spesso hanno cuticola sottile (BUSCHINGER e MASCHWITZ, 1984). Inoltre tra le formiche sopra citate provviste di un tegumento ispessito, sono molte quelle che presentano spine e protuberanze simili a uncini che potrebbero avere un significato protettivo, come tra le Myrmicinae del genere *Atta*.

Quando un nido viene disturbato o attaccato un comportamento di difesa attuato comunemente dalle formiche è la fuga. Generalmente, la regina e le operaie più giovani, con gli individui immaturi fra le mandibole, si ritirano nelle profondità del nido, mentre le operaie più vecchie ed eventualmente i soldati combattono all'esterno per la difesa del nido (BUSCHINGER e MASCHWITZ, 1984). Un peculiare comportamento di fuga si osserva nelle specie del genere *Formica* (*Serviformica*) durante l'attacco da parte delle formiche schiaviste del genere *Polyergus*. Al sopraggiungere delle schiaviste, la operaie del nido attaccato cercano di scappare portando con sé le larve e arrampicandosi sulla vegetazione circostante. Tuttavia in questo caso la reazione di fuga potrebbe essere causata dall'emissione di allomoni di propaganda da parte delle razziatrici (MORI *et al.*; 2001). In *Oecophylla smaragdina* a seguito degli attacchi, vengono, invece, formati grappoli di larve e operaie all'esterno del nido su foglie unite fra loro da filamenti di seta. I grappoli, formati anche da centinaia di individui, alla fine cadono sul terreno sottostante garantendo la fuga (BUSCHINGER e MASCHWITZ, 1984).

In alcuni casi è stato descritto anche un comportamento di tanatosi, ovvero di finzione della morte. In questo caso le formiche si capovolgono e rimangono immobili per

qualche tempo. Sebbene tale fenomeno sia stato osservato in alcuni generi, come *Myrmecina*, il suo valore protettivo non è ancora stato studiato approfonditamente (WHEELER, 1910; CREIGHTON, 1950; SCHUMACHER e WHITFORD, 1974).

2.1 LA FUNZIONE DIFENSIVA DELLE MANDIBOLE

Le mandibole delle formiche si possono assimilare a vere e proprie mani, poiché sono usate in svariate attività, come ad esempio scavare nel terreno, trasportare materiale per il nido e anche larve e compagne, ma soprattutto sono una delle più importanti armi di offesa e difesa in molte specie (BUSCHINGER e MASCHWITZ, 1984). Generalmente, anche se sono presenti altre armi come il pungiglione o potenti secrezioni velenose, le mandibole hanno comunque una funzione di supporto durante la difesa o il combattimento. Molte specie di formiche dotate di pungiglione di solito afferrano prima la vittima con le mandibole e in seguito curvano il gastro in avanti per inserire il pungiglione (FOREL, 1920; MAIDL, 1934). Anche altre formicine prive di pungiglione pur essendo in grado di spruzzare il veleno ad una certa distanza contro l'aggressore, spesso mordono ed emettono il veleno allo stesso momento. In questo modo la lacerazione meccanica prodotta dalle mandibole rende più efficace la penetrazione della secrezione velenifera. Durante combattimenti di formiche che usano principalmente mandibole come strumento offensivo-difensivo, questi organi vengono usati sia per tagliare le estremità dell'avversario che per tenerlo fermo. Quando un gruppo di formiche tira diverse appendici della vittima in direzione opposte, questa è immobilizzata e spesso le sue appendici si spezzano. Questo comportamento, definito "*gang pulling*", viene usato non solo dalle formiche per avere la meglio su grosse prede, ma spesso si riscontra nei combattimenti tra formiche (BUSCHINGER e MASCHWITZ, 1984). Mandibole specializzate per il combattimento si sono sviluppate principalmente nei soldati delle specie che sono dotate di questa particolare casta. In *Atta*, gli individui morfologicamente più grandi hanno mandibole a cesoia molto affilate che usano per tagliare le foglie che, una volta riportate al nido, formeranno il substrato organico per la crescita di filamenti fungini che utilizzano a scopo alimentare, l'utilità delle mandibole si manifesta però anche nei combattimenti (KUGLER, 1978).

2.2 LA COMUNICAZIONE DI ALLARME

La difesa di gruppo, caratterizzata da azioni difensive cooperative, è piuttosto comune negli animali sociali (EDMUND, 1974). Negli insetti sociali, la difesa di gruppo organizzata è uno dei comportamenti più evidenti e uno dei più importanti fattori che hanno determinato il loro successo ecologico (BUSCHINGER e MASCHWITZ, 1984). La comunicazione, in particolare quella di allarme, è un requisito di base della difesa di gruppo. Le operaie di una colonia di formiche, in generale, sono definite in uno “stato di allarme” quando si allontanano da uno stimolo potenzialmente pericoloso, sia in modo tranquillo che in uno stato di panico, o lo attaccano aggressivamente, o più semplicemente girano intorno disordinatamente in un elevato stato di allerta (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990). Si definisce comportamento di allarme una qualsiasi risposta ad un disturbo della colonia che comporti azioni difensive da parte dei membri della stessa. Il comportamento di allarme viene classificato in due grandi categorie: *aggressive alarm* e *panic alarm* (WILSON e REGNIER, 1971). Nel primo caso alcuni membri della colonia, spesso soldati, sono attirati verso la fonte del pericolo e cercano di attaccarla. Nel *panic alarm*, invece l'intera colonia fugge dallo stimolo o corre in modo frenetico. Se il disturbo è molto forte, gli individui possono anche abbandonare il nido. La comunicazione di allarme è evocata da una notevole quantità di stimoli tra cui anche le vibrazioni del substrato e le correnti d'aria che, se intense e prolungate, possono provocare l'evacuazione del nido. L'avvicinamento di un potenziale nemico nei pressi del nido può essere considerato l'inizio degli eventi che portano all'espressione della comunicazione d'allarme in una colonia di formiche. In tale comunicazione, non tutti gli stimoli hanno la stessa valenza e certi sono più efficaci di altri. Questo è quanto accade nelle specie che manifestano la cosiddetta “specificazione del nemico” in cui l'incontro con individui di specie pericolose è più efficace nell'evocare una risposta d'allarme rispetto ad altre meno minacciose.

La comunicazione di allarme è garantita principalmente dall'emissione di segnali chimici. Sono tuttavia dimostrati anche casi in cui l'allarme si trasmette tramite segnali di tipo tattile o da segnali vibrazionali. Ad esempio, stridulazioni vengono emesse dalle formiche tagliatrici di foglie (*Atta* e *Acromyrmex*) quando rimangono sepolte a causa di una frana nelle gallerie del nido, in modo tale da richiamare le compagne che si adopereranno per liberarle. Le formiche carpentiere *Camponotus* presentano un altro tipo di

comunicazione d'allarme di tipo vibrazionale quando sono disturbate. Esse colpiscono il substrato con l'aiuto delle mandibole o del gastro e le compagne che percepiscono il segnale possono reagire sia immobilizzandosi, sia aggredendo qualsiasi oggetto nelle vicinanze. Infine, le formiche della specie *Oecophylla longinoda* percuotono le pareti del nido col proprio corpo in caso di disturbo (BUSCHINGER e MASCHWITZ, 1984).

A parte questi sporadici esempi di comunicazione vibrazionale, i più importanti segnali di allarme, e di conseguenza di difesa, sono numerosi composti chimici secreti da varie ghiandole esocrine che fungono da *feromoni di allarme*.

2.3 LE SORGENTI GHIANDOLARI COINVOLTE NELLA COMUNICAZIONE DI ALLARME

Le sorgenti ghiandolari dei feromoni di allarme sono state individuate in sette delle undici sottofamiglie esistenti di formiche, con qualche somiglianza tra sottofamiglie, anche filogeneticamente distanti, sia nelle sorgenti che nella composizione chimica dei feromoni di allarme (VANDER MEER e ALONSO, 1998). In alcuni casi il comportamento di allarme è evocato dall'emissione di segnali prodotti da più ghiandole esocrine (BLUM, 1985). Le principali ghiandole coinvolte nella produzione e secrezione di segnali d'allarme sono: la ghiandola mandibolare, la ghiandola del veleno, la ghiandola di Dufour e, meno frequentemente, la ghiandola pigidiale e la ghiandola metapleurale.

La ghiandola mandibolare è coinvolta nella sintesi di composti d'allarme in diverse sottofamiglie di formiche, soprattutto Myrmicinae, Pseudomyrmecinae, Ecitoninae e Formicinae, mentre nelle Ponerinae è stata identificata solo nel genere *Odontomachus*. La ghiandola del veleno invece è utilizzata nel contesto d'allarme nelle Formicinae (generi *Camponotus*, *Formica* e *Oecophylla*) e nelle Myrmecinae (genere *Myrmecaria*) (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990). Per quanto riguarda la ghiandola di Dufour, questa ha un ruolo nella comunicazione d'allarme essenzialmente nelle Formicinae, in particolare nel genere *Formica* e *Acanthomyops*, in cui, oltre al ruolo di produzione di composti d'allarme, ha attività anche nel rilasciare feromoni di traccia che guidano le compagne verso la fonte di pericolo (BUSCHINGER e MASCHWITZ, 1984).

La ghiandola pigidiale è deputata alla produzione di sostanze d'allarme solo nei generi *Conomyrma* e *Tapinoma* (sottofamiglia Dolichoderinae) (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990). La ghiandola metapleurale è coinvolta nella comunicazione d'allarme nel genere *Crematogaster* (sottofamiglia Myrmicinae) (BUSCHINGER e MASCHWITZ, 1984). Come si può notare, quindi, le Myrmicinae e le Formicinae utilizzano contemporaneamente più di una ghiandola nella comunicazione d'allarme (*multisources alarm communication*). Nel genere *Formica*, ad esempio, la ghiandola mandibolare, la ghiandola del veleno e la ghiandola di Dufour partecipano insieme nel mediare comportamenti d'allarme. Uno dei più complessi sistemi di allarme finora studiati è quello di *Oecophylla longinoda* (Formicinae), che utilizza non meno di quattro ghiandole: la ghiandola sternale, quelle mandibolari e il complesso della ghiandola del veleno, che comprende anche la ghiandola di Dufour (BRADSHAW e HOWSE, 1984).

Possibile è anche che singole ghiandole producano più di una sostanza allarmante (*multicomponent alarm communication*). Questo è il caso, ad esempio, della ghiandola del veleno delle specie appartenenti al genere *Myrmecaria*, in cui non è presente il comune veleno proteinaceo tipico delle specie aculeate, ma una grande quantità di monoterpeni. Le reazioni provocate da queste numerose sostanze possono essere definite come la somma delle risposte provocate da ogni singola sostanza (BRADSHAW e HOWSE, 1984).

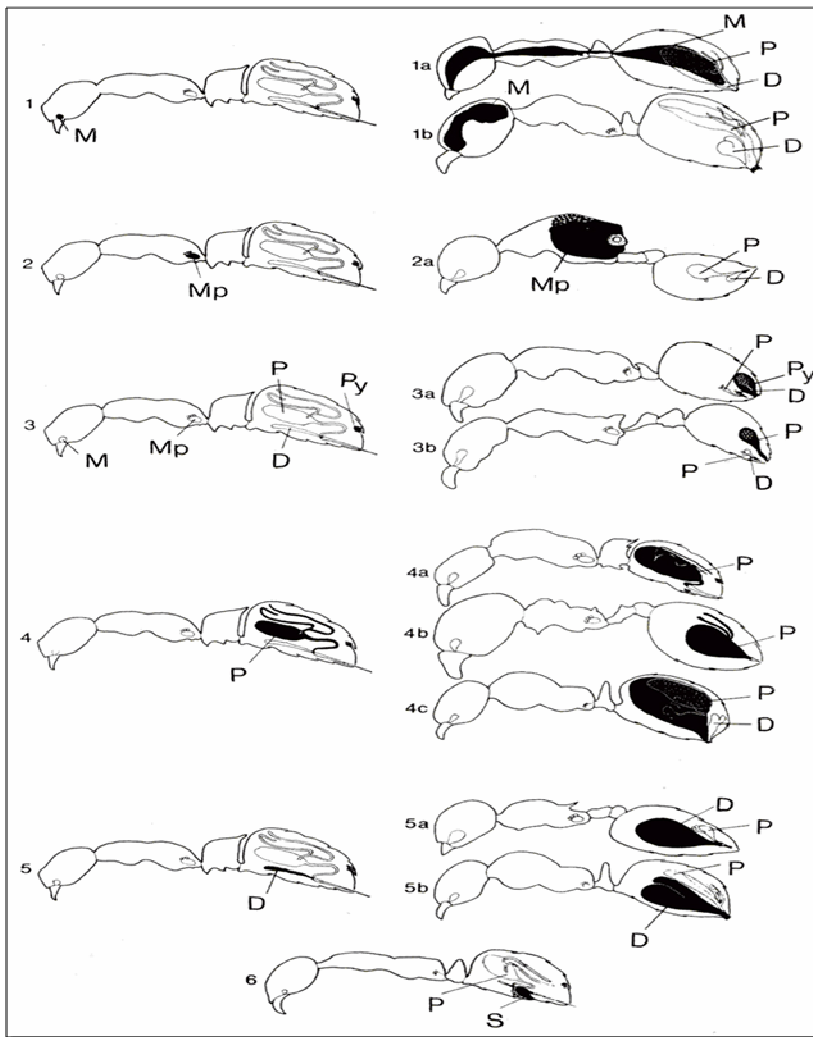


Figura 2.1

Ghiandole esocrine usate dalle formiche per la produzione di sostanze di allarme/difesa. Molte ghiandole che sono diventate sede di queste sostanze hanno subito un processo di ipertrofizzazione.

1 Ghiandola mandibolare (M):
1a, *Camponotus*; 1b, *Lasius fuliginosus*.

2 Ghiandola metapleurale (Mp):

2a, *Crematogaster inflata*.

3 Ghiandola pigmentale (Py):
3a, *Iridomyrmex humilis*; 3b *Pheidole biconstricta*.

4 Ghiandola del veleno (P):

4a, *Pachycondyla tridentata*; 4b *Pheidole fallax*; 4c, *Formica polyctena*.

5 Ghiandola di Dufour (D):

5a, *Crematogaster scutellaris*; 5b, *Formica subintegra*.

6 Ghiandola sternale (S):
Leptogenys ocellifera.

(da BUSCHINGER e MASCHWITZ 1984, modificato).

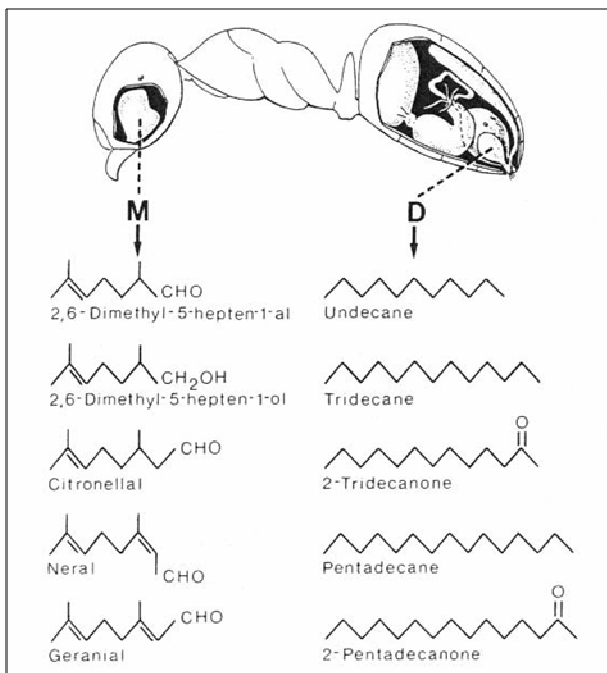


Figura 2.2

Nella formica *Acanthomyops claviger* le reazioni di allarme e difesa sono mediate da segnali chimici prodotti a livello della ghiandola mandibolare (M) e della ghiandola di Dufour (D) (da HÖLLDOBLER e WILSON, 1990).

2.4 I FEROMONI DI ALLARME

La produzione di feromoni d'allarme, nelle specie eusociali, costituisce uno dei principali passaggi evolutivi che hanno permesso alle colonie di utilizzare in modo efficace le risposte collettive in situazioni di pericolo. Infatti, specie con colonie grandi e popolose se disturbate non sono in grado di disperdersi rapidamente, per questo hanno sviluppato strategie che permettono di affrontare direttamente il pericolo. Tra tutte le classi di feromoni, quelli di allarme sono considerati i meno specie-specifici (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990). I medesimi composti di allarme sono stati trovati in molte specie di formiche, e una data sostanza chimica può causare una reazione di allarme anche in specie diverse da quelle in cui è stata trovata. Riconoscere i feromoni d'allarme di altre specie rappresenta un chiaro vantaggio difensivo, soprattutto tra specie simpatriche che coesistono nello stesso ambiente e sono sottoposte agli stessi pericoli (BLUM, 1969; WILSON, 1971; PARRY e MORGAN, 1979). Molti dei feromoni d'allarme identificati finora, da un punto di vista evolutivo, sono simili agli allomoni difensivi prodotti dagli insetti non sociali. Inoltre negli stessi insetti sociali spesso i feromoni di allarme fungono anche da sostanze difensive (WILSON e REGNIER, 1971; HÖLLDOBLER e WILSON, 1990). Questa congruenza strutturale si può ritenere sia la dimostrazione che questi composti chimici, capaci di determinare una risposta di allarme, si sono evoluti a partire da sostanza anti-predatorie, e attraverso vari passaggi di ritualizzazione in modo indipendente hanno acquistato la loro funzione comunicativa. Il successivo utilizzo di questi composti come feromoni d'allarme è in accordo comunque con la loro originaria funzione di impedire l'attacco da parte di numerosi organismi predatori. Inoltre, dato che composti difensivi come i feromoni d'allarme sono solitamente secreti anche in risposta a stimoli traumatici, non sono stati necessari cambiamenti comportamentali nell'emissione di segnali che stimolano un comportamento di allarme (BLUM, 1985).

I segnali di allarme sono spesso formati da più componenti, tipicamente da due o più feromoni, che stimolano simultaneamente allerta, aggressione e attacco. Per questa ragione si suole dividere i feromoni in due classi, a seconda della reazione che evocano (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990):

- *Allarme-difesa*: in questo caso gli stessi composti chimici sono usati sia per allontanare i nemici che per allertare le compagne. Alcune sostanze secrete sono probabilmente solo difensive, ad esempio l'acido formico impiegato da specie di formicinae. È anche probabile che alcuni composti abbiano puramente funzione comunicativa, soprattutto quelli prodotti in minime quantità.
- *Allarme-reclutamento*: in questo caso si ha allo stesso tempo sia allerta che attrazione. Lo stesso composto chimico in alcune specie può provocare contemporaneamente i due comportamenti, mentre in altre specie altri composti chimici (come i feromoni di traccia) possono essere emessi congiuntamente per guidare le compagne verso la sorgente dell'allarme.

Una caratteristica comune di qualsiasi tipo di feromone d'allarme è il peso molecolare, generalmente limitato all'intervallo tra C_6 - C_{10} atomi di carbonio. Ciò garantisce una rapida espansione e il massimo raggiungimento di individui e, allo stesso tempo, un veloce dissolvimento quando ormai non è più necessario (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990). I feromoni d'allarme, come tutti i segnali comunicativi, sono rilasciati da un emettitore (quale un'operaia che si imbatte in un eventuale predatore o in un individuo eterospecifico o eterocoloniale che non viene riconosciuto come appartenente alla propria colonia) e riconosciuti da un ricevente nel quale scatenano appunto una risposta comportamentale di allarme. A causa della natura volatile del segnale, questo si diffonde e crea un gradiente di concentrazione in base alla distanza della sorgente. Secondo il modello proposto da Wilson e Bossert (1963) per la diffusione dei feromoni di allarme, la formica ricevente per esibire una reazione completa deve raggiungere la parte più prossima al luogo dove l'emettitrice ha rilasciato il segnale. Se la formica entra in contatto coi feromoni alla periferia della sua area di azione essa può presentare una reazione minore. Se poi il segnale non viene rinforzato con altre emissioni da parte di altre formiche, questo avviene entro pochi minuti (VANDER MEER e ALONSO, 1998). Tale fenomeno è stato osservato in molte specie di formiche, in particolare in quelle specie in cui più sostanze chimiche, ognuna con una diversa volatilità, sono coinvolte nello scatenare la risposta comportamentale (REGNIER e WILSON, 1968; BRADSHAW *et al.*, 1979). Anche la concentrazione alla quale viene rilasciato il segnale può influire sulla risposta. Infatti, è stato osservato che nelle formiche *Atta texana*, ad una certa concentrazione, la risposta

consiste solo in una attrazione verso la sorgente, e solo ad una concentrazione dieci volte maggiore la risposta può essere classificata come d'allarme (Moser *et al.*, 1968). Tutto questo consente alle formiche una certa capacità di modulare la risposta. Spesso i feromoni d'allarme possono essere utilizzati anche per marcare un intruso, che diviene una sorta di zimbello chimico sul quale si concentra l'aggressione da parte delle altre operaie.

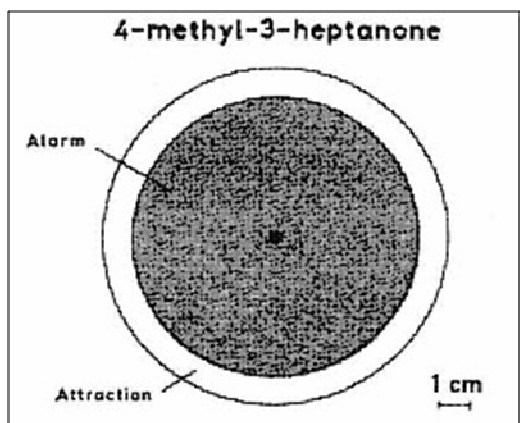


Figura 2.3

Rappresentazione schematica dell'azione del 4-methyl-3-heptanone nella reazione di allarme della formica tagliafoglie *Atta texana*. A basse concentrazioni le formiche sono attratte dal composto, mentre a concentrazioni elevate il composto induce una reazione di allarme aggressiva (da HÖLLDOBLER e WILSON, 1990).

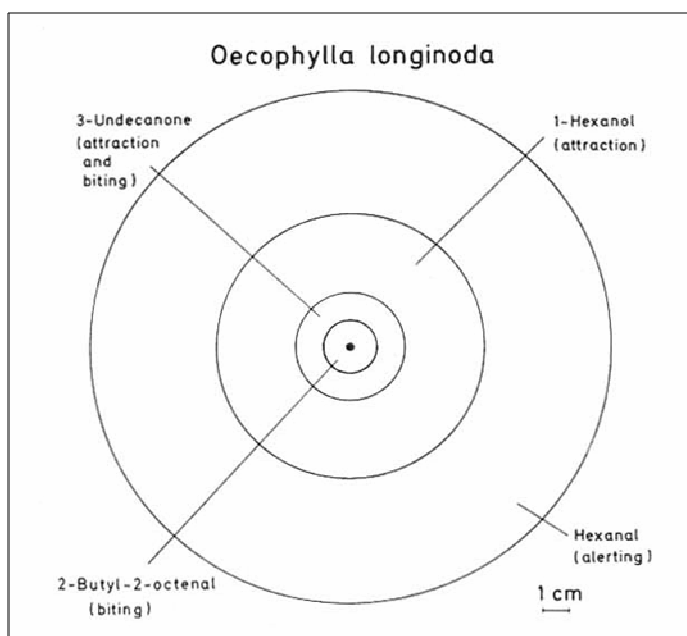


Figura 2.4

Rappresentazione schematica dell'azione del feromone di allarme multicomponente nella formica *Oecophylla longinoda* (da HÖLLDOBLER e WILSON, 1990).

I principali comportamenti evocati dai feromoni di allarme sono (BLUM, 1985):

- *Dispersione*: manifestato principalmente dagli insetti pre- o sub-sociali, che reagiscono a feromoni d'allarme di conspecifici disperdendosi lontano dallo stimolo. Qui i feromoni d'allarme possono essere considerati come repellenti per gli individui riceventi. L'emissione del feromone d'allarme, secondo questa visione, potrebbe essere ad un atto altruistico da parte di un individuo ferito, dato che il comportamento di fuga suscitato non porta alcun beneficio

all'emettitore. Tra le formiche e, in generale, tra gli insetti sociali, le specie non hanno reazioni particolarmente aggressive al feromone d'allarme percepito vicino al nido, possono però manifestare dispersione lontano da esso (MASCHWITZ, 1964). Questo è quanto accade quando le operaie si ritrovano fuori dal nido in fase di foraggiamento e, in risposta ad un feromone d'allarme, presentano rapidamente il comportamento di fuga. Tuttavia, in alcuni casi, come ad esempio in due specie di Ponerine (*Hypoponera opacior* e *Ponera pennsylvanica*), le operaie reagiscono al loro feromone di allarme, rilasciato dalle ghiandole mandibolari, disperdendosi e abbandonando il nido (DUFFIELD *et al.*, 1976). Anche molte specie di Myrmecine hanno un evidente comportamento di dispersione quando percepiscono il loro feromone d'allarme. Le operaie di *Zacryptocerus varians*, ad esempio, entrate in contatto col loro feromone d'allarme secreto dalle ghiandole mandibolari, cessano di muoversi e in seguito si allontanano dalla sorgente del feromone (OLUBAJO *et al.*, 1980).

- *Attrazione*: la risposta di attrazione ad un feromone di allarme pare essere esclusiva degli insetti sociali che attuano una difesa di gruppo. Il feromone di allarme ha quindi anche una funzione di reclutamento, attraendo molto rapidamente verso la sorgente di emissione un largo numero di individui aggressivi. Wilson (1958), osservando il comportamento delle operaie della specie *Pogonomyrmex badius* in risposta ad uno stimolo d'allarme, concluse che sono possibili risposte sia a bassa che ad alta intensità. Le risposte a bassa intensità comprendono un aumento del tasso di locomozione e una ridotta sinuosità nella direzione presa, con il capo e le antenne periodicamente alzate e il gastro abbassato. Quelli ad alta intensità includono un'esagerazione dei comportamenti sopra citati con le mandibole tenute parzialmente aperte. I due livelli di risposte comportamentali non si alternano tra loro in modo discontinuo, ma piuttosto presentano un continuum di attività. Le operaie allertate si muoveranno rapidamente, con movimenti circolari nell'orientarsi verso la sorgente di emissione del feromone di allarme (WILSON, 1958; MASCHWITZ, 1964; BLUM e WARTER, 1966). In alcuni casi le operaie possono presentare movimenti a scatti nell'avvicinarsi alla sorgente di emissione e

manifestare movimenti a zig-zag uscendo freneticamente dal nido (GHENT, 1961; BLUM e WARTER, 1966). Ad esempio, in *Pogonomyrmex badius* le operaie, se particolarmente eccitate dallo stimolo di allarme, possono addirittura manifestare comportamenti di minaccia nei confronti delle operaie sorelle attratte dal feromone (BLUM *et al.*, 1971).

- *Attacco*: la comparsa di comportamenti di attacco scatenati da feromoni di allarme, negli insetti presociali, è stata individuata solo in alcune specie nelle quali le femmine rimangono con la propria prole e la difendono attivamente. Negli imenotteri sociali, formiche comprese, molti sono gli stimoli che influenzano l'entità della risposta d'attacco. Alcuni fattori, come il colore, l'odore, la composizione del substrato, i movimenti e la temperatura sono importanti nel determinare il grado di aggressività di questi insetti. Operaie di alcune specie del genere *Odontomachus* reagiscono in modo particolarmente aggressivo nei confronti di oggetti marcati col loro feromone d'allarme, tenendo le proprie mandibole aperte con un angolo di 90° rispetto all'asse del proprio corpo. Risulta interessante notare che in bioassay, tecnica che consente il contatto tra le formiche e il proprio estratto ghiandolare, nei casi in cui non veniva consentito il contatto tra le formiche saggiate e un oggetto fisico, il loro comportamento consisteva in reazioni di allarme-panico o attrazione verso lo stimolo, ma non erano presenti posture difensive né di attacco (WILSON, 1958; DUFFIELD *et al.*, 1977; BLUM *et al.*, 1968). L'attacco mediato da feromoni di allarme, nelle formiche, coinvolge frequentemente l'uscita massiccia di operaie dal nido, seguita da comportamenti aggressivi caratterizzati da morsi e punture, e la secrezione di composti difensivi e/o feromoni di allarme (MASCHWITZ, 1964).

Capitolo 3

TECNICHE PER LO STUDIO DELLA COMUNICAZIONE CHIMICA NEGLI INSETTI

I segnali chimici utilizzati dagli insetti sono prodotti (e di conseguenza agiscono) a basse concentrazioni e ciò ha portato alla necessità di sviluppare tecniche specifiche per l'analisi e la sperimentazione di tali composti.

La prima sostanza ad essere stata identificata chimicamente fu un feromone sessuale prodotto dalle femmine dell'imenottero *Bombyx mori* nel 1959. Per determinarne la composizione chimica furono necessari 20 anni di ricerca oltre che l'utilizzo di mezzo milione di individui. Una volta completata questa fase, la sostanza fu sintetizzata in laboratorio e poi ne fu dimostrata l'attività biologica per confermarne l'identificazione iniziale (HECKER e BUTENANDT, 1984). Da allora, le tecniche utilizzate nello studio della comunicazione chimica hanno fatto molti progressi e oggi è possibile lavorare in maniera meno dispendiosa con concentrazioni simili a quelle utilizzate dagli insetti.

Lo studio della comunicazione chimica si basa principalmente su due tipi di analisi: *l'analisi chimica* che permette di identificare i composti coinvolti e *l'analisi comportamentale* che permette di associare ai composti identificati l'effettivo ruolo di segnale. Da un punto di vista chimico, l'analisi prevede quattro fasi principali: la *purificazione del feromone*, la *separazione dei composti*, la loro *identificazione* e la *sintesi del feromone artificiale*. La scelta dei metodi più adatti dipende dalle proprietà chimiche delle molecole coinvolte. Le molecole organiche, infatti, presentano una vasta gamma di strutture, differenziandosi:

- per numero e tipo di atomi che le compongono,
- per la tipologia (catene, strutture ad anello o entrambe),
- per i gruppi funzionali che contengono (alcheni, chetoni, esteri, etc.),
- per la geometria dei doppi legami (E o Z),
- per la stereochimica dei centri chirali.

I segnali chimici sono spesso così specifici che è possibile ottenere un composto di sintesi in grado di indurre la risposta comportamentale voluta, solo se tutte queste caratteristiche sono identificate correttamente (GRASSWITZ e JONES, 2003).

I composti più studiati sono senz'altro i feromoni degli insetti che sono di solito miscele composte da più componenti e presenti in quantità dell'ordine di nanogrammi o picogrammi. Oggi, comunque, molte delle tecniche sviluppate per gli insetti sono applicate per lo studio di feromoni prodotti da mammiferi ed organismi acquatici. Tuttavia, l'identificazione chimica dei feromoni non è sufficiente per chiarire l'effettivo ruolo che queste sostanze hanno in un contesto comunicativo e quindi, per ottenere un'analisi adeguata a questo scopo, è necessario abbinarle a dei *bioassay* (o saggi biologici) appropriati. Un *bioassay* può essere definito come un saggio in cui l'attività del composto chimico è registrata tramite risposte quantificabili di tipo comportamentale o fisiologico prodotte da un organismo. Quindi, ad ogni passaggio dell'analisi chimica, dall'estrazione alla sintesi, l'attività dei composti chimici esaminati deve essere sempre confermata tramite *bioassay* (GRASSWITZ e JONES, 2003).

Un'idea del disegno sperimentale più appropriato per il *bioassay* può essere ricavata da lavori simili pubblicati su specie affini e successivamente adattata in base alla biologia ed al comportamento della specie studiata ed anche in base agli obiettivi specifici della ricerca. I *bioassay*, perlomeno quelli iniziali, sono generalmente studiati per essere condotti completamente in laboratorio o al limite in condizioni seminaturali. Esperimenti svolti completamente in natura, invece, sono rari soprattutto perché costosi e spesso influenzati negativamente da fattori che non possono essere controllati dallo sperimentatore (GRASSWITZ e JONES, 2003).

3.1 BIOASSAY: CONSIDERAZIONI GENERALI

Un *bioassay* può essere definito come un esperimento ripetibile con il quale si misura la risposta di un organismo ad uno stimolo che in questo caso è rappresentato da un potenziale segnale chimico (WYATT, 2003). Il comportamento dell'animale rappresenta il mezzo con cui si può misurare la risposta allo stimolo e costituisce, perciò, la base su cui un *bioassay* è costruito. I comportamenti presi in esame possono essere molto semplici come ad esempio l'attrazione/evitamento della fonte di stimolo oppure coinvolgere

cambiamenti comportamentali o fisiologici a lungo termine come, ad esempio, la maturazione sessuale dell'individuo. Potenzialmente, quindi, esistono tanti bioassay quante sono le specie e i comportamenti presi in esame (WYATT, 2003).

Dopo aver definito chiaramente quali parametri di un determinato comportamento devono essere misurati, l'eliminazione della variabilità dovuta a fattori endogeni ed esogeni rappresenta una caratteristica chiave per la costruzione di un buon bioassay. Molti fattori endogeni, come l'età, lo stato fisiologico, lo stato di nutrizione o il sesso, possono influenzare la risposta comportamentale dell'individuo, mentre fattori esogeni che devono essere presi in considerazione sono la temperatura, l'illuminazione, l'umidità, l'ora del giorno o la pressione barometrica (HARDEE *et al.*, 1966; TRAYNIER, 1967; SPARKS e CHEATHAM, 1970; STEINBERG *et al.*, 1992). Da questo punto di vista, i bioassay di laboratorio offrono delle garanzie migliori in quanto molti di questi fattori possono essere controllati. Tuttavia, gli individui allevati e testati in laboratorio possono presentare risposte differenti rispetto a quelli selvatici, quindi i risultati di laboratorio devono essere supportati da osservazioni fatte in natura (HARE, 1998). Inoltre per ridurre l'influenza che fattori endogeni ed esogeni possono avere sulla variabilità interindividuale, è buona norma fare uso di opportuni controlli, sia positivi che negativi.

Un altro importante punto da tenere in considerazione quando si progetta un bioassay è rappresentato dal fatto che spesso il comportamento che si è deciso di osservare è il risultato dell'azione di più moduli comportamentali attivati dalla presenza di più stimoli, come, ad esempio, l'identificazione e l'adozione di un ospite per alimentarsi o deporre le uova. Stimoli visivi e chimici possono essere utilizzati per portare l'insetto a contatto con il potenziale ospite; successivamente, stimoli tattili o l'uso di sostanze chimiche non volatili potrebbero permettere l'identificazione e la valutazione dell'ospite da parte dell'insetto. In questi casi può essere più adeguato separare il comportamento intero nelle sue componenti sviluppando bioassay specifici per ogni stimolo coinvolto (HARE, 1998).

Infine, è necessario individuare i test più adatti all'analisi statistica dei dati prima di effettuare gli esperimenti, allo scopo di assicurarsi che i dati raccolti si adeguino alle assunzioni dei test statistici scelti.

3.2 BIOASSAY: I COMPOSTI VOLATILI

I bioassay che si utilizzano per studiare le sostanze volatili possono essere divisi in due classi principali: bioassay che prevedono una circolazione più o meno forzata dell'aria e quelli che non ne fanno uso (BAKER e CARDÉ, 1984).

Nei bioassay che non richiedono una corrente d'aria, i composti chimici evaporano direttamente da un dispensatore formando, per semplice diffusione, un gradiente di concentrazione che decresce all'aumentare della distanza dalla fonte di emissione dello stimolo. Successivamente gli individui che devono essere testati vengono introdotti nell'arena sperimentale dove è stato precedentemente creato il gradiente di concentrazione e si procede alla registrazione di semplici parametri comportamentali quali la tendenza all'avvicinamento o all'allontanamento dallo stimolo. Di solito, questo tipo di bioassay richiede apparecchiature relativamente semplici e spesso le arene sperimentali sono composte da capsule petri o piccole gabbie.

Bioassay che utilizzano invece una corrente forzata d'aria hanno bisogno di una strumentazione aggiuntiva che permetta di controllare il flusso d'aria in termini di potenza e direzione. Gli apparati che si usano per questo tipo di esperimenti sono essenzialmente due: l'*olfattometro* e il *tunnel del vento*:

- Gli *olfattometri* sono delle piccole gabbie costituite da due o più bracci, a ognuno dei quali è associata una sorgente di odori e una propria corrente d'aria (Fig.3.1, 3.2). I vari bracci confluiscono poi tutti in un'area centrale in cui è posizionato inizialmente l'animale da testare. Queste strutture, quindi, impongono all'animale una scelta che può essere di tipo binario o multiplo e si utilizzano per misurare parametri come il tasso di movimento e la scelta di direzione in individui che si spostano tramite un substrato solido su cui camminano.
- I *tunnel del vento* hanno delle dimensioni maggiori in quanto servono per testare animali in volo (Fig. 3.3, 3.4). Sono costituiti da un solo braccio e quindi da una sola corrente d'aria. Tuttavia, all'interno di questa corrente, possono essere presenti più emettitori di sostanze chimiche che possono essere caricati con differenti composti da testare (KNOLS *et al.*, 1994). I parametri che si misurano sono, ad esempio,

l'orientamento rispetto alla sorgente, la variazione della velocità di volo o la direzione di volo.

Olfattometri e tunnel del vento devono essere costruiti artigianalmente, perché non esistono in commercio apparati standardizzati. Ovviamente la costruzione di questi apparati ha un costo, ma il fatto di doverli costruire su misura permette di ottimizzare la forma e le dimensioni in base al tipo di organismo che deve essere testato. La scelta dei materiali per la costruzione dell'apparato deve tenere presente sia le caratteristiche dei composti chimici da testare sia le caratteristiche dell'animale oggetto dell'esperimento: il legno di solito non è utilizzato per le parti che entrano in contatto con il feromone in quanto tende ad assorbire i composti ed è impossibile eliminarli una volta che la prova è terminata. Quindi, di solito, si preferiscono materiali quali alluminio, vetro o Plexiglas™. Tuttavia, bisogna tenere presente che questi materiali sono spesso troppo scivolosi per gli insetti che vi devono camminare sopra e perciò la parte in cui l'animale può camminare viene di solito ricoperta con superfici più ruvide, ma comunque facilmente asportabili come, ad esempio, la carta da filtro (HARE, 1998).

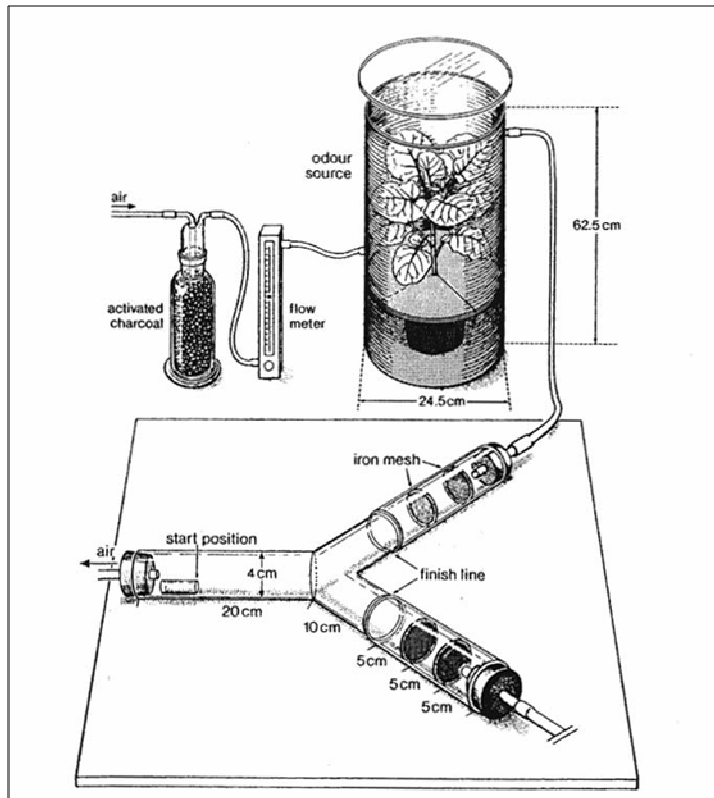


Figura 3.1

Rappresentazione schematica di un olfattometro a scelta binaria (da STEINBERG *et al.*, 1992).

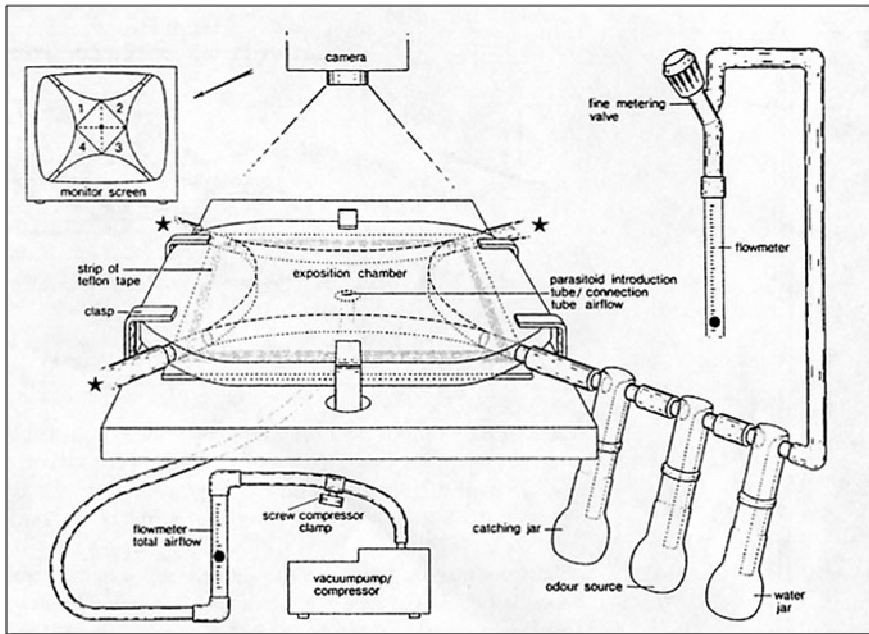


Figura 3.2
 Rappresentazione schematica di un olfattometro a quattro braccia (da VET *et al.*, 1983).

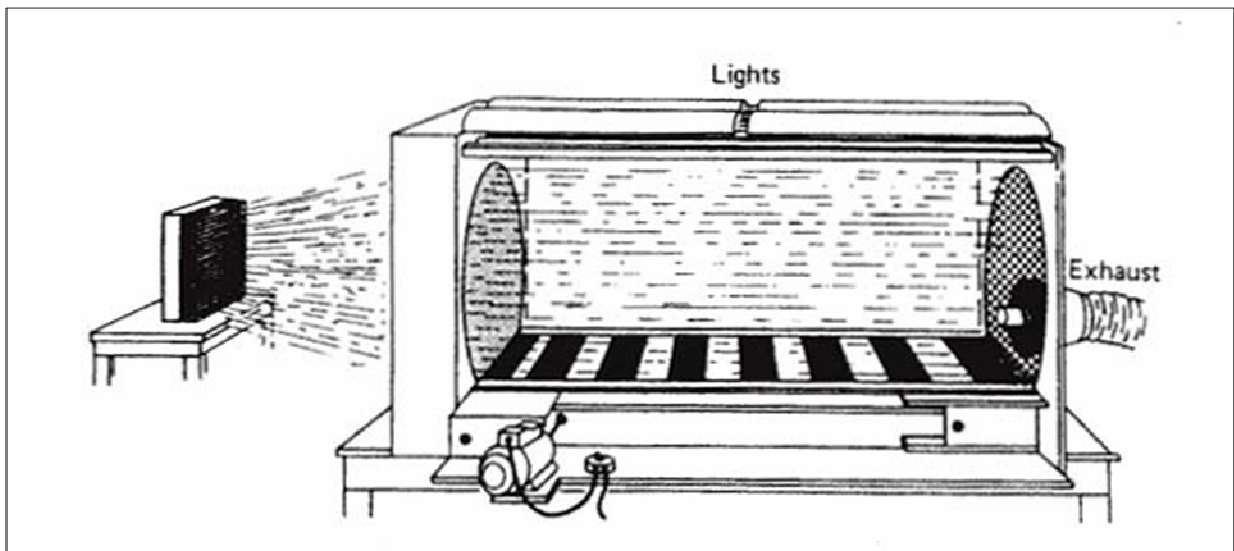


Figura 3.3
 Rappresentazione schematica di un tipico tunnel del vento (da BAKER e CARDÉ, 1984).

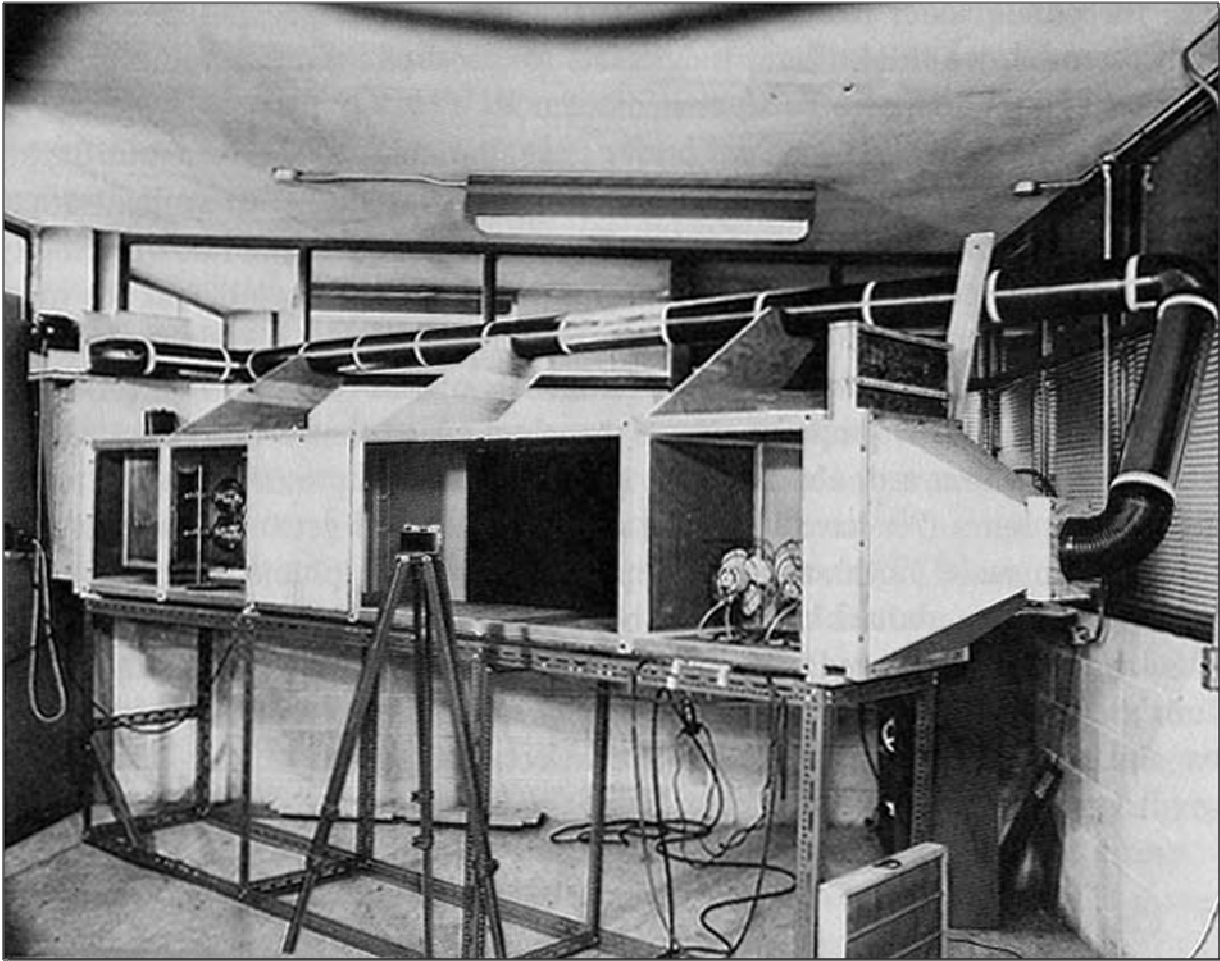


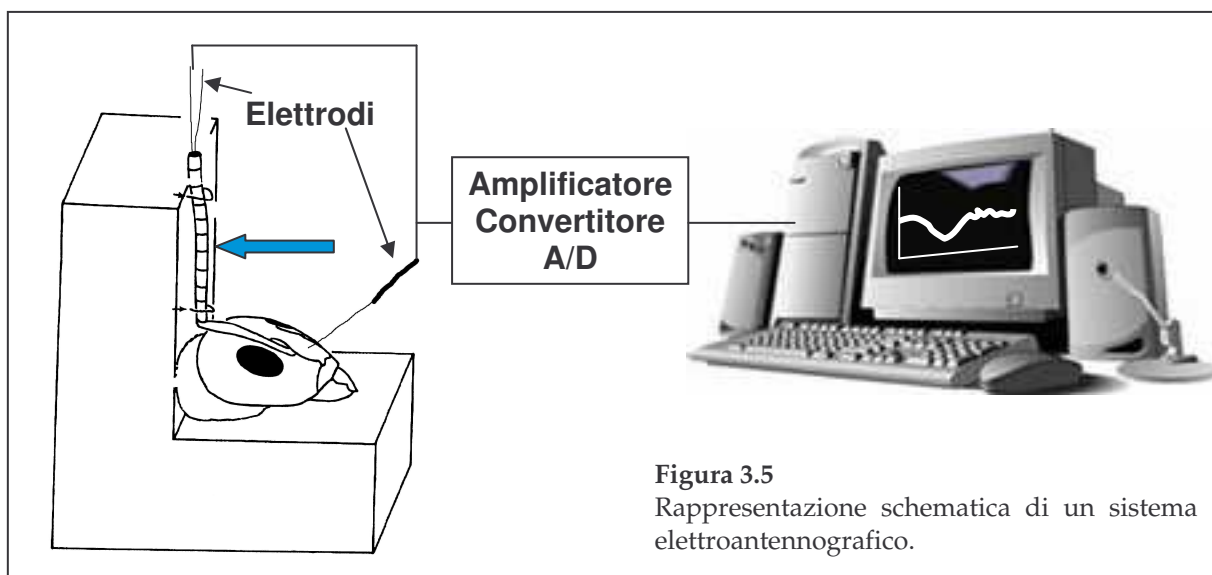
Figura 3.4
Esempio di tunnel del vento (da KELLOG e WRIGHT, 1962).

3.3 BIOASSAY: L'ELETTROANTENNOGRAFIA

Oltre agli esperimenti in cui si registra la reazione comportamentale o fisiologica ad uno stimolo riferita all'intero organismo, sono considerati bioassay anche i test in cui si analizza la risposta di strutture isolate dell'organismo stesso. Secondo FINCH (1986), infatti, "...è definito bioassay (o saggio biologico) qualunque saggio in cui il detector (o sensore) è un organismo vivente o parte del suo sistema sensoriale ...".

Una tecnica potente, sviluppata allo scopo di studiare la biologia sensoriale degli insetti, è l'*Elettroantennografia* che si basa sulla registrazione degli impulsi elettrici che vengono prodotti dalle cellule chemorecetriche quando vengono stimolate dai feromoni. Questa tecnica ha il vantaggio di utilizzare il sistema olfattorio proprio dell'animale, che ovviamente è stato selezionato per rispondere solo a certi composti (WYATT, 2003).

L'elettroantennografia (EAG) registra la risposta elettrica prodotta dalle cellule sensoriali presenti nelle antenne degli insetti (Fig. 3.5). Gli elettrodi sono posizionati alle due estremità di un'antenna e collegati ad un amplificatore che a sua volta è collegato ad un convertitore di segnale da analogico a digitale. In questo modo il segnale trasformato può essere trasmesso ad un computer che è in grado di rappresentare graficamente la variazione di potenziale elettrico delle cellule sensoriali dovuta alla stimolazione. Quando le cellule sensoriali delle antenne vengono stimolate dai feromoni, la rapida depolarizzazione a cui la membrana cellulare va incontro è dose dipendente: l'ampiezza del segnale che viene registrato è direttamente proporzionale all'intensità della variazione di potenziale elettrico che a sua volta è in relazione con la quantità di stimolo presente. Inoltre, la risposta varia anche in relazione al tipo di stimolo: le cellule sensoriali non sono tutte sensibili alla stessa maniera ma possono essere specializzate nel rispondere solo a certi composti chimici. Quindi, il numero ed il tipo di cellule sensoriali presenti è importante nel determinare la risposta.



Inoltre, nel caso in cui siano presenti poche cellule sensoriali preposte al riconoscimento di uno specifico feromone, l'EAG potrebbe non essere sufficiente e quindi si deve ricorrere a tecniche che prevedono lo studio della variazione di potenziale di cellule singole (Single Cell Recording, SCR) (WYATT, 2003). Tecniche simili all'EAG sono state sviluppate anche per i vertebrati, come, ad esempio, nei pesci, in cui si parla di elettroolfattografia (EOG) (HARA, 1994).

Le tecniche elettrofisiologiche, comunque, indicano una sensibilità dell'organismo verso un particolare composto, ma non danno indicazioni su quale comportamento l'animale esibirà in risposta. Quindi questa tecnica è un valido aiuto nello studio della comunicazione chimica, ma non può sostituire i classici bioassay che hanno la funzione di associare la percezione dello stimolo alla risposta comportamentale e/o fisiologica. In particolare, l'EAG risulta utile quando l'analisi chimica non è in grado di isolare adeguatamente i composti che compongono il feromone da altre sostanze chimiche presenti nel campione. In questo caso, l'EAG permette di separare i composti che inducono una risposta delle cellule recettoriali da quelli che non sono in grado di stimolarle, riducendo, quindi, il numero di sostanze da testare tramite bioassay comportamentali.

3.4 ANALISI CHIMICA: LA PURIFICAZIONE DEL FEROMONI

Il primo passo verso la purificazione o isolamento del feromone in esame prevede l'identificazione della sorgente ghiandolare. Negli insetti, la maggior parte dei feromoni conosciuti è prodotta, e spesso raccolta, a livello di singole strutture ghiandolari ad azione esogena come, ad esempio, la ghiandola del veleno o la ghiandola mandibolare. Una seconda categoria di feromoni è costituita dai cosiddetti "feromoni epicuticolari". In questo caso, i feromoni sono prodotti da ghiandole che possono essere distribuite in varie parti del corpo ma riversano sempre il loro contenuto a livello della cuticola esterna dell'animale. I feromoni epicuticolari giocano spesso un ruolo fondamentale nel riconoscimento individuale. I bioassay preliminari, quindi, prevedono spesso la dissezione dell'insetto e la presentazione delle varie parti come stimolo allo scopo di determinare se il feromone in esame è prodotto e/o conservato a livello di una ghiandola specializzata oppure se è un componente della cuticola.

Successivamente, si passa alla fase della purificazione del feromone che si può ottenere attraverso tecniche differenti. La scelta del metodo di purificazione più adeguato dipende da vari fattori quali la specie studiata, la quantità di individui a disposizione ed il contesto comportamentale in cui il feromone è utilizzato (ovvero, l'allarme, la traccia, il comportamento riproduttivo, etc.). Le difficoltà principali associate a tutti i tipi di tecniche sono:

- *l'ordine di grandezza*: le quantità di feromone prodotto da un insetto sono dell'ordine dei nanogrammi e quindi il rischio di perdere il materiale attivo è molto alto;
- *i cambiamenti chimici*: a contatto con l'aria o con altre sostanze che vengono usate per l'isolamento il feromone potrebbe andare incontro a reazioni che ne modificano la struttura;
- *la contaminazione*: il materiale attivo potrebbe miscelarsi con impurità minori derivanti dai solventi o dai contenitori usati; questi ultimi, infatti, soprattutto se costituiti da materie plastiche potrebbero liberare composti indesiderati (HOWSE *et al.*, 1998).

I metodi per la cattura e l'isolamento dei feromoni sono essenzialmente tre: *l'estrazione tramite solvente*, *la cattura di composti volatili tramite trappole* e *la microestrazione in fase solida* (o SPME) (JONES e OLDHAM, 1999):

- *L'estrazione tramite solvente* prevede la macerazione del campione in un solvente organico adatto, seguita dalla filtrazione e dalla concentrazione dell'estratto. In teoria, la scelta del solvente dipende dal tipo di composto che deve essere estratto ed in particolare, la polarità del solvente deve essere compatibile con quella del feromone. Ovviamente, nelle fasi iniziali dell'analisi questo non è possibile e quindi è utile fare una serie di estrazioni utilizzando dei solventi con un gradiente di polarità crescente. I solventi più adeguati hanno di solito un basso punto di ebollizione e devono contenere relativamente pochi contaminanti quando comprati dai rivenditori; tra le sostanze facilmente reperibili, il pentano, l'esano e il diclorometano sono probabilmente i solventi più adatti ed hanno una polarità tra

bassa e moderata. I vantaggi di questa tecnica sono legati al fatto che fornisce informazioni sulla quantità dei componenti feromonali presenti al momento dell'estrazione ed inoltre è una tecnica relativamente semplice da applicare. Inoltre, l'estrazione tramite solvente può essere fatta sull'intero corpo dell'animale oppure su specifiche ghiandole precedentemente dissezionate. Nel primo caso è sufficiente inserire l'animale intero nel solvente, ma ovviamente, oltre al feromone vengono estratti anche molti altri composti prevalentemente di origine cuticolare; nel secondo caso l'estrazione è molto più precisa, ma necessita di un lavoro di microdissezione preliminare che può essere fatto solo se l'insetto ha delle dimensioni adeguate. Infine, la soluzione così ottenuta deve subire un processo di distillazione allo scopo di eliminare il solvente in eccesso e preparare il campione per le analisi successive (HOWSE *et al.*, 1998).

- La *cattura di composti volatili* prevede l'utilizzo di trappole assorbenti o trappole a freddo che bloccano i feromoni rilasciati dall'insetto durante un determinato periodo di tempo (Fig. 3.6). Gli insetti sono mantenuti vivi in un contenitore chiuso in cui viene fatta circolare dell'aria che poi è inviata in una trappola a freddo oppure in un tubo dove è presente il materiale assorbente. Una condizione necessaria per questo tipo di purificazione è che nell'aria utilizzata per raccogliere i feromoni e portarli alle trappole non vi siano delle impurità. Per raggiungere questo scopo si utilizzano di solito filtri di carbone attivo che purificano l'aria prima che questa passi nella camera dove sono presenti gli insetti. I principali vantaggi di questa tecnica sono il fatto che fornisce un campione dei composti realmente emessi dall'animale e, dato che la tecnica non comporta l'uccisione degli insetti, il fatto che la raccolta dei composti può essere ripetuta nel tempo. Le trappole a freddo prevedono l'utilizzo di azoto liquido per portare la temperatura dell'aria in uscita dalla camera di raccolta fino a -195°C : in questo modo i composti volatili passano allo stato liquido o solido e possono essere facilmente raccolti. Le trappole assorbenti, invece, sono costituite da carbone attivo, vetro o polimeri porosi quali il Porapak-Q o il Tenax. Successivamente, i feromoni che si adsorbono a questi filtri vengono raccolti lavando il filtro stesso con opportuni solventi oppure facendo loro cambiare di fase variando la temperatura a cui i filtri sono mantenuti. Lo svantaggio di questa tecnica è legato al fatto che sia che si utilizzi il solvente o la

variazione di temperatura, i feromoni possono andare incontro a reazioni che ne modificano la struttura creando degli artefatti oppure possono essere introdotte delle impurità a causa della formazione di prodotti secondari (HOWSE *et al.*, 1998).

- La *microestrazione in fase solida* è una tecnica relativamente nuova e prevede l'utilizzo di una fibra assorbente in grado di estrarre composti organici dallo spazio sovrastante campioni liquidi o solidi, da soluzioni acquose e dalla superficie di materiale biologico (Fig. 3.7). La prima pubblicazione di un lavoro in cui si utilizza l'SPME per estrarre dei feromoni risale al 1995 (MALOSSE *et al.*, 1995). Uno degli utilizzi principali dell'SPME nello studio della comunicazione chimica degli insetti riguarda i feromoni epicuticolari. Con questa tecnica è sufficiente sfregare la fibra su parti del corpo dell'animale per prelevare i feromoni. In questo caso, la natura non distruttiva del processo permette anche il campionamento ripetuto dello stesso animale favorendo quindi studi tempo-dipendenti (JONES e OLDHAM, 1999). Negli ultimi dieci anni sono stati pubblicati nuovi lavori riguardanti l'utilizzo di questa tecnica per lo studio dei feromoni (cfr. JONES e OLDHAM, 1999 per una review) che hanno messo in evidenza le sue grosse potenzialità, ma anche la necessità di utilizzare fibre e protocolli di analisi adeguati: in base alla natura chimica della sostanza da estrarre, infatti, è necessario impiegare la fibra con le caratteristiche più compatibili tra quelle disponibili ed, inoltre, mettere a punto un protocollo sperimentale che preveda temperature e tempi di esposizione corretti.

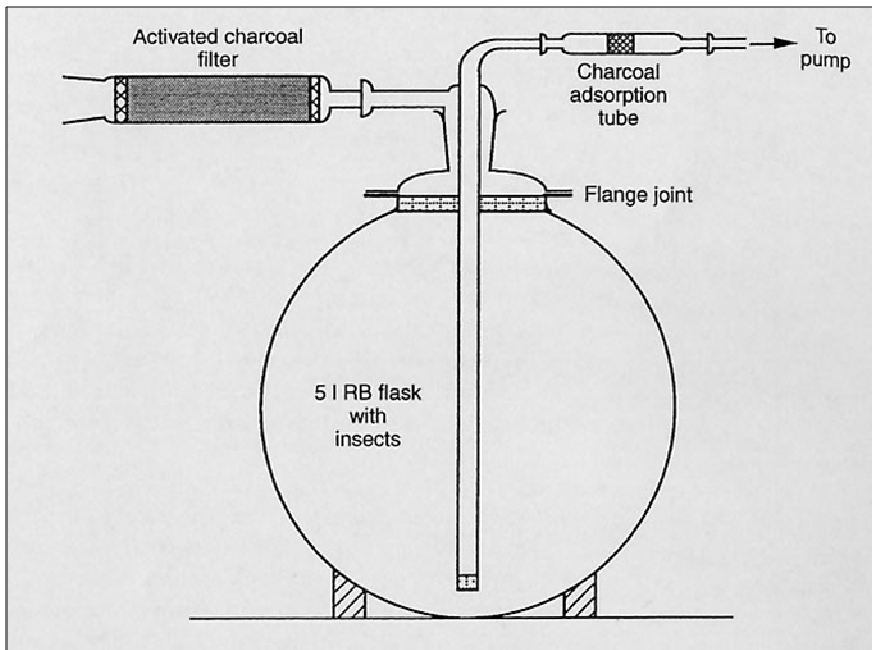


Figura 3.6
Rappresentazione schematica di un apparato per la cattura dei composti volatili (da HOWSE *et al.*, 1998)

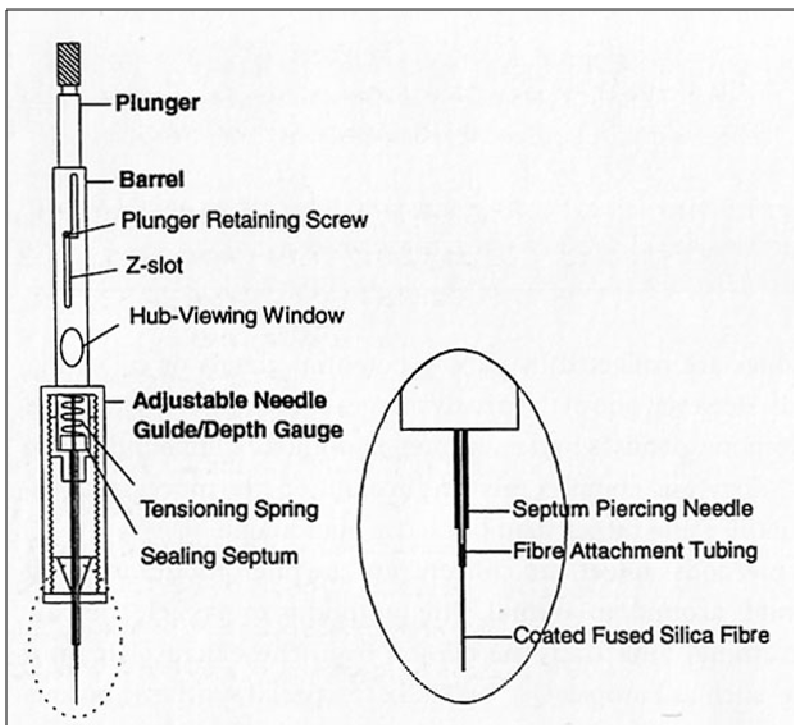


Figura 3.7
Rappresentazione schematica della prima fibra per SPME commercializzata dalla SUPELCO (da WYATT, 2003)

3.5 ANALISI CHIMICA: LA SEPARAZIONE DEI COMPOSTI

Ad eccezione della distillazione, tutti i metodi di separazione si basano su una forma di analisi cromatografica in cui i vari composti di una miscela sono separati perché si distribuiscono selettivamente tra una fase mobile ed una fase stazionaria. La natura

fisica (solido, liquido o gas) delle due fasi impiegate è utilizzata per definire le differenti tipologie della cromatografia (HOWSE *et al.*, 1998). In particolare, la *cromatografia gas-liquido* (GLC o GC) è molto utile per separare i composti che hanno la stessa natura chimica della maggior parte dei feromoni. La fase mobile è costituita da un gas inerte (azoto o elio) che è fatto passare all'interno di un tubo sottile (o colonna) lungo fino a 50 m. La fase stazionaria è un liquido non volatile trattenuto da un supporto inerte e poroso inserito all'interno del tubo. Il campione da analizzare viene fatto passare (o correre) all'interno del tubo trasportato dalla fase mobile. La colonna è inserita all'interno di un forno dove la temperatura aumenta in modo controllato durante la corsa allo scopo di velocizzare il passaggio dei composti meno volatili e quindi velocizzare i tempi dell'analisi. I composti della miscela vengono separati in funzione dei diversi punti di ebollizione e dalla diversa solubilità nella fase stazionaria. Il tempo impiegato dal singolo composto ad uscire dalla colonna è definito "tempo di ritenzione". Questo parametro è caratteristico per ogni composto ed è ripetibile se si mantengono costanti particolari condizioni quali la temperatura del forno, le caratteristiche fisico/chimiche della colonna e la velocità del flusso della fase mobile. Per ottenere separazioni più specifiche possono essere utilizzate fasi stazionarie differenti: colonne chirali, ad esempio, permettono la separazione degli enantiomeri (WYATT, 2003). Per ottenere un grado di risoluzione più alto si può utilizzare un capillare per costruire la colonna del gas-cromatografo. Ovviamente con questo accorgimento si riduce notevolmente il volume del sistema e quindi si può introdurre solo una quantità ridotta del campione. Questo svantaggio, però, è bilanciato da un notevole aumento della capacità di discriminazione dei vari composti e da una utile riduzione dei tempi di ritenzione e quindi dell'analisi (HOWSE *et al.*, 1998).

Il tipico output di questo tipo di analisi è il gas-cromatogramma in cui ogni picco corrisponde ad una sostanza: nelle ascisse è indicato il tempo di ritenzione, mentre nelle ordinate è espresso un indice della quantità di composto presente nel campione. Tuttavia, la gas-cromatografia permette solo la separazione chimica della miscela, ma non la determinazione della struttura chimica dei composti e quindi la loro identificazione.

3.6 ANALISI CHIMICA: L' IDENTIFICAZIONE DEI COMPOSTI

I composti che escono in sequenza dalla colonna gas-cromatografica devono passare attraverso un detector che ha lo scopo di identificarli. Tra i detector convenzionali, il più comune è il *flame ionisation detector* (FID) che è costituito da una fiamma di idrogeno puro ed aria. La sua alta sensibilità, la risposta lineare in una vasta gamma di concentrazioni del campione e la sua capacità di identificazione quasi universale, lo rendono uno strumento ideale per studiare la varietà di composti che si incontrano negli studi sui feromoni. Tuttavia, oggi la gas-cromatografia (GC) accoppiata alla spettrometria di massa (MS) ha rivoluzionato gli studi sui feromoni. Lo spettrometro di massa è un detector molto sensibile (può analizzare campioni dell'ordine di nanogrammi e picogrammi) ed inoltre, fornisce informazioni sulla struttura chimica dei composti. Il funzionamento di uno spettrometro di massa può essere sintetizzato come segue: i composti della miscela separati dal gas-cromatografo entrano uno alla volta nello spettrometro di massa; nella camera di ionizzazione, il composto è bombardato da elettroni (electron impact o EI) che portano alla sua frammentazione in ioni; successivamente, un analizzatore di massa separa gli ioni ottenuti in base alla loro massa; in fine, come output, si ottiene una lista di ioni ordinati in base alla loro massa e con le abbondanze relative. Questa lista è specifica per ogni composto e può essere utilizzata per identificare il composto stesso. Quindi, oltre a fornire uno spettro che può essere interpretato, la spettrometria di massa è in grado di ricavare una sorta di "impronta digitale" del composto che può essere confrontata, attraverso ricerche bibliografiche computerizzate, con quella appartenente a campioni standard (HOWSE *et al.*, 1998; JONES e OLDHAM, 1999). Perciò, l'elevato potere di separazione della gas-cromatografia capillare associato all'elevata capacità dello spettrometro di massa di identificare i composti rendono questa tecnica estremamente adatta per l'analisi di miscele e quindi per lo studio dei feromoni che sono spesso una mescolanza di più composti in matrici complesse quali i tessuti biologici.

3.7 ANALISI CHIMICA: LA SINTESI DEL FEROMONE

Il passo successivo all'identificazione dei composti è rappresentato dalla sintesi di una miscela feromonale artificiale che può essere testata sugli animali tramite bioassay in natura o in laboratorio. Senza questo passaggio, il feromone rimarrebbe solo una "curiosità chimica" di nessun valore applicativo per l'etologo o il chimico. Inoltre, la sintesi e i successivi bioassay sono un passo essenziale per confermare l'identificazione della composizione chimica del feromone. Teoricamente, esistono differenti vie per ottenere la sintesi di uno stesso composto, ma ci sono dei problemi che devono essere risolti quando si cerca di individuare la sintesi migliore di una nuova sostanza. In generale, i passi che bisogna seguire sono i seguenti:

1. costruire uno scheletro di carbonio corretto;
2. assicurarsi che i gruppi funzionali siano nella corretta posizione sullo scheletro;
3. assicurarsi che ogni doppio legame abbia la corretta geometria;
4. assicurarsi di ottenere l'isomero desiderato.

Infine, oltre a queste limitazioni, possono incidere sulla scelta della via sintetica più adeguata anche il numero totale di reazioni che devono essere eseguite, la disponibilità dei precursori ed i costi legati alla sintesi (HOWSE *et al.*, 1998).

Capitolo 4

SCOPO

Lo scopo di questa tesi è stato quello di studiare la reazione di allarme e la difesa cooperativa in due specie simpatriche del genere Formica: *Formica cunicularia* e *Formica rufibarbis*, prendendo in esame anche i rapporti coevolutivi con il parassita obbligato *Polyergus rufescens*. Queste due specie sono considerate entrambe potenziali ospiti del parassita (MORI *et al.*, 1994) ma diverse osservazioni in natura su popolazioni simpatriche di queste specie hanno messo in evidenza come il parassita parassitizzi solo nidi di *F. cunicularia* evitando quelli di *F. rufibarbis*. Lo studio dei meccanismi difensivi e della comunicazione di allarme di queste specie potrà permettere di chiarire ulteriormente questo fenomeno.

Il comportamento di allarme viene classificato in due grandi categorie: *aggressive alarm* e *panic alarm* (WILSON e REGNIER, 1971). Nel primo caso alcuni membri della colonia sono attirati verso la fonte del pericolo e cercano di attaccarla. Nel *panic alarm*, invece l'intera colonia fugge dallo stimolo o corre in modo frenetico. La comunicazione chimica rappresenta negli insetti eusociali, e quindi anche nelle formiche, la principale via comunicativa e permette di organizzare e coordinare tutte le attività della colonia. Tra queste una delle più importanti è sicuramente la reazione di allarme in quanto permette di mantenere inalterata l'integrità dell'intera colonia.

La prima parte di questa ricerca di dottorato ha avuto come obiettivo quello di caratterizzare il comportamento di allarme delle due specie e di confrontarli fra loro in modo da poter verificare la presenza di differenze in grado di spiegare le preferenze del parassita verso un ospite piuttosto che un altro. Per questo sono stati effettuati esperimenti su frammenti di colonia prelevati in natura, nei quali veniva presentata una potenziale fonte di pericolo. La comunicazione chimica rappresenta negli insetti eusociali, e quindi anche nelle formiche, la principale via comunicativa e permette di organizzare e coordinare tutte le attività della colonia. Tra queste una delle più importanti è sicuramente la reazione di allarme in quanto permette di mantenere inalterata l'integrità dell'intera colonia.

La seconda parte di questa ricerca ha avuto come obiettivo quello di individuare le sorgenti ghiandolari dei feromoni di allarme. A tale scopo sono stati saggiati estratti dei contenuti ghiandolari delle principali ghiandole esocrine delle operaie con esperimenti sia su frammenti di colonia, per verificare quale ghiandola riuscisse a evocare i comportamenti propri della reazione di allarme caratterizzata in precedenza, sia su singoli individui allo scopo di osservare questo comportamento non influenzato da eventuali emissioni di feromoni da parte delle compagne.

L'ultima parte di questa tesi si è concentrata sulla specie *F. cunicularia* e ha avuto come scopo quello di approfondire le conoscenze sul feromone di allarme di questa specie con un approccio di tipo multidisciplinare che ha previsto una analisi chimica effettuata con la tecnica classica di estrazione tramite solvente accoppiata ad una gas-cromatografia e spettrometria di massa. La successiva analisi comportamentale ha permesso di individuare la componente attiva del feromone.

Capitolo 5

SPECIE STUDIATE

a) *Formica cunicularia* (Latreille, 1798)

Formica cunicularia appartiene al gruppo *Formica fusca* (sottogenere *Serviformica*) e si pensa che la sua zona di origine sia l'Asia centrale, dove si ritrova anche una specie ad essa estremamente affine: *Formica subpilosa* (BERNARD, 1968). Questa specie è largamente diffusa sia in Europa Centrale che Meridionale, mentre è del tutto assente nel Nord America. La sua presenza è stata registrata in Corsica, in Sardegna, nelle Isole Baleari, in Argentina e in Marocco. Nella zona compresa tra il Caucaso e l'Himalaya sono state identificate le sottospecie *Formica fucoides* e *Formica glauca*. E' presente a varie altitudini: nelle regioni alpine non supera gli 800 m., mentre nei Pirenei la si può trovare fino ad una quota di 1300 m. I nidi, che non sono mai molto popolosi, sono scavati generalmente sotto sassi o pietre nei prati aperti, ma si trovano anche in giardini o lungo i litorali marini, mentre sono rari nelle foreste montane (BERNARD, 1968).

Operaie: lunghezza 4 - 6.5 mm. Il corpo è di colore nero, con riflessi rosso mattone lungo i lati del torace (Fig. 5.1). Non si conoscono casi di polimorfismo all'interno di questa casta. Da un punto di vista funzionale le operaie sono femmine sterili che si occupano della raccolta e della distribuzione del cibo, della costruzione del nido e della sua manutenzione e, infine, si prendono cura della prole e della regina.

Regina: lunghezza 7 - 9 mm. Il corpo è di colore nero, con riflessi rosso mattone. Come in tutte le specie del sottogenere *Serviformica*, la regina è in grado di fondare la nuova colonia e di allevare la prima generazione di operaie in modo

indipendente, ovvero senza l'aiuto di individui appartenenti alla propria o ad altre specie (BERNARD, 1968).

Maschi: lunghezza 8 - 9 mm. Hanno il corpo di colore nero e le antenne brune. Essi svolgono una funzione esclusivamente riproduttiva e non hanno altri ruoli nell'organizzazione della società.



Figura 5.1
Operaia di *Formica cunicularia*.

b) Formica rufibarbis (Fabricius, 1793)

F. rufibarbis appartiene al gruppo *Formica fusca* (sottogenere *Servoformica*) e si pensa che la sua zona di origine sia l'Asia centrale, dove si ritrova anche una specie ad essa estremamente affine: *Formica subpilosa* (BERNARD, 1968).

Non è una specie molto comune ed in genere la sua distribuzione non supera i 1000 metri di altitudine. Si trova in habitat temperati, soleggiati per permettere ai raggi solari di filtrare attraverso il terreno e riscaldare i nidi che si estendono solitamente fino ad una profondità di 30 cm sotto il terreno. Ogni colonia matura è composta da 2-3 regine e da più di 500 operaie, molto aggressive con tendenza ad attaccare altre specie di formiche o altri

insetti (FALK, 1991). Di norma nei nidi di *F. rufibarbis* non ci sono pupe nude, cosa che la differenzia dalle altre specie appartenenti al gruppo *F. fusca*.

Per quanto riguarda la morfologia, questa specie presenta una pelosità alquanto sviluppata, con peli giallastri sul corpo. L'esoscheletro e le mandibole sono molto robuste e circa i tre quarti del torace sono di colore rosso (BERNARD, 1968).

Regine: lunghezza 9-40 mm. Le regine hanno il corpo di colore rosso con peli giallastri. Le ali sono grigiastre e dopo l'accoppiamento vengono perse.

Maschi: lunghezza 8.5-11.8 mm. Il corpo è di colore nero con ali più scure delle regine.

Operaie: lunghezza 4.6-7.5 mm. Sono più piccole delle regine o dei maschi e il loro addome scuro è ricoperto da peli piumosi.



Figura 5.2
Operaie di *Formica rufibarbis*

Capitolo 6

**IL COMPORTAMENTO DIFENSIVO E LA
REAZIONE DI ALLARME NELLE DUE
SPECIE SIMPATRICHE *Formica*
cunicularia E *Formica rufibarbis*
(HYMENOPTERA, FORMICIDAE)**

Materiali e Metodi

a) Raccolta e mantenimento delle formiche

Durante il periodo estivo 2004 e 2005 sono state raccolte in natura frammenti di colonie diverse (operaie, bozzoli, larve e pupe) delle due specie *F. cunicularia* e *F. rufibarbis*. I frammenti sono stati successivamente alloggiati in contenitori di vetro con terra e materiale organico proveniente dal nido d'origine in modo da garantire condizioni di vita del tutto simili a quelle naturali. Le colonie così allestite sono state mantenute in laboratorio in condizioni controllate di temperatura (26-28 °C) e di umidità (50-60%). Il periodo di luce giornaliera era costante di 12 ore. Ogni frammento è stato alimentato con acqua, miele e frammenti di insetti.

Per ogni specie sono state allestite 10 arene sperimentali contenenti ciascuna 50 operaie e 10 bozzoli (per un totale di 20 arene e 1000 operaie). Le arene erano costituite da una base rigida in PVC di 37x25 cm, sopra la quale era stata fissata una struttura in gesso di forma ovale (34.5x24 cm) alta 2 cm. La nicchia di nidificazione (6x7 cm) è stata scavata nel gesso e chiusa da un coperchio in plastica trasparente e da un foglio lucido rosso delle stesse dimensioni in modo da permettere la visione dell'interno della nicchia e allo stesso tempo di mantenere gli individui in condizione di penombra. Ogni giorno le operaie morte erano sostituite in modo tale da mantenere costante il numero di individui per ogni arena.

b) Protocollo sperimentale

Allo scopo di caratterizzare la reazione di allarme delle due specie, in ogni arena veniva presentato vicino alla nicchia di nidificazione uno stimolo rappresentante un potenziale pericolo per la colonia. Questi stimoli consistevano in formiche operaie uccise per congelamento ed utilizzate come zimbelli. Gli stimoli presentati erano i seguenti:

- **Formica Omocoloniale** (operaia della stessa specie proveniente dalla stessa colonia);
- **Formica Eterocoloniale** (operaia della stessa specie proveniente da colonie diverse);
- **Formica Enslaved** (operaia della stessa specie proveniente da una colonia mista di *Polyergus rufescens* (Latr. 1798) che funge da schiava);
- **Formica Eterospecifica simpatica** (operaia della specie *Formica gagates* (Latr. 1798), altra specie del gruppo *Formica fusca*, o della specie *Polyergus rufescens*, che è un potenziale parassita di *F. cunicularia* e *F. rufibarbis*).

Lo zimbello era fissato su di un supporto in plastica (4 cm ca.) e posizionato con uno spillo metallico al centro di una zona circolare ($r = 3$ cm) nell'area di foraggiamento dell'arena e a circa 5 cm di distanza dall'ingresso della nicchia di nidificazione. Il solo supporto era utilizzato come trattamento di controllo. L'arena sperimentale era quindi suddivisa in 3 zone di interesse (Fig. 5.1):

- **Zona A:** nido o nicchia di nidificazione
- **Zona B:** area circolare dove era posizionato lo stimolo
- **Zona C:** resto dell'arena (area di foraggiamento)

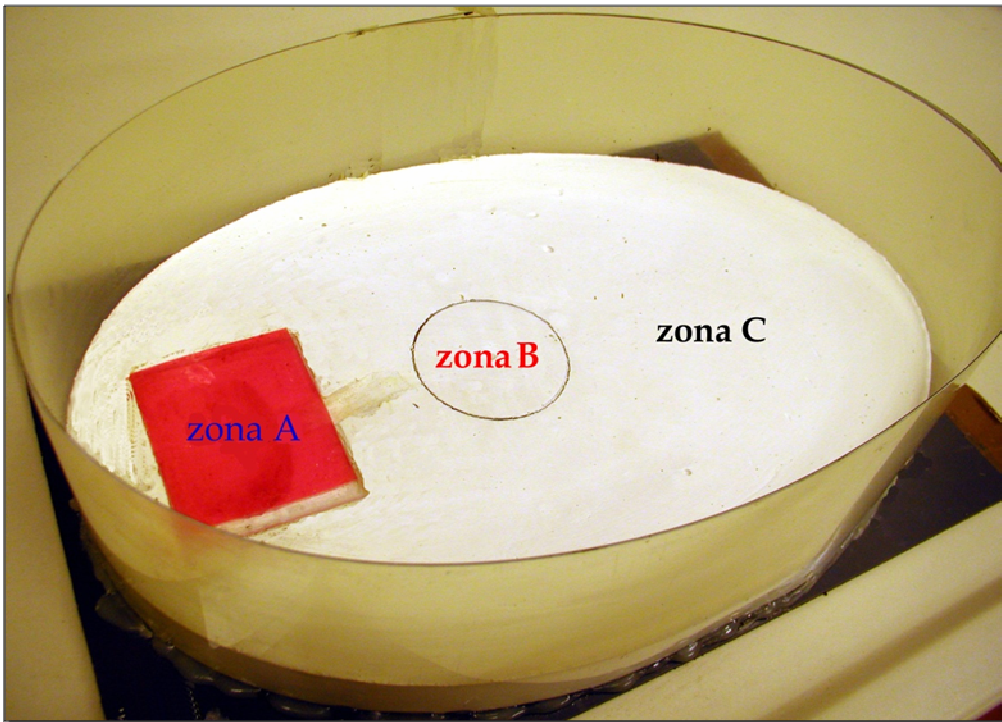


Figura 5.1
 Arena sperimentale in cui si distinguono le tre zone: la nicchia di nidificazione (Zona A), l'area dello stimolo (Zona B) e l'area di foraggiamento (Zona C).

Ogni stimolo era presentato solo una volta per ogni arena; lo zimbello "enslaved" è stato testato solo sulle arene di *F. cunicularia* mentre lo zimbello "eterospecifico simpatico" (*F. gagates*) è stato testato solo sulle arene di *F. rufibarbis*. In totale sono state effettuate 50 prove per ogni specie. Il tempo sperimentale di osservazione era di 10 minuti suddiviso in 20 intervalli da 30" ciascuno.

c) Parametri analizzati

In questi esperimenti sono stati registrati diversi parametri allo scopo di descrivere sia il movimento delle operaie nello spazio, sia il tipo di comportamenti effettuati in risposta allo stimolo presentato. Durante il tempo sperimentale per ogni intervallo sono stati registrati i seguenti parametri di "attività locomotoria":

1. Numero di formiche uscite dalla zona A;
2. Numero di formiche presenti nella zona B;
3. Numero totale di formiche all'esterno del nido (zona B + C);
4. Numero di formiche entrate nella zona B.

I dati ottenuti sono stati analizzati statisticamente utilizzando il software di analisi statistica SPSS® (ver. 13.0). I trattamenti sono stati confrontati fra di loro tramite MANOVA, Analisi Discriminante, ANOVA e test HSD di Tuckey e Games-Howell per i confronti post-hoc.

Parallelamente è stata effettuata anche una analisi di tipo comportamentale di tipo “focal sampling”: in ogni prova due formiche, marcate con colori diversi, erano osservate durante tutto il tempo sperimentale; alla fine di ogni intervallo era registrato il comportamento effettuato e la zona in cui era stato effettuato. Tutti i dati sono stati raccolti utilizzando il software NOLDUS “The Observer” ® ver. 5.0, specifico per analisi etologiche. Successivamente ad ogni comportamento è stato assegnato un livello di aggressività che andava da 0 a 3 (Tab. 5.1). L’aggressività totale espressa in ogni prova è stata calcolata utilizzando un “Indice di Aggressività” originariamente ideato da Herrard & Hefetz (1997) e qui modificato:

$$IA = \frac{\sum_{i=1}^7 LA_i \cdot t_i}{T}$$

dove:

- **IA:** Indice di Aggressività,
- **LA_i:** Livello di aggressività del comportamento *i*,
- **t_i:** Numero di intervalli in cui si è manifestato il comportamento *i*,
- **T:** Numero totale di intervalli.

I dati ottenuti sono stati confrontati fra di loro utilizzando il test non parametrico Kruskal-Wallis.

Comportamento	Descrizione	Livello di aggressività assegnato
Ferma	La formica non si muove	0
Cammina	La formica esplora o si muove regolarmente	0
Scatti	Movimenti brevi e rapidi (a scatto) generalmente effettuati in avanti o lateralmente con tutto il corpo	3
Minaccia	Apertura evidente delle mandibole	2
Morsi	Morsi che possono essere portati a termine o meno su un oggetto	3
Gaster flexing	Flessione in avanti del gaster tra le zampe posteriori come nell'atto di spruzzare (a volte è accompagnato dall'emissione del secreto di ghiandole addominali)	3
Allerta	Sollevamento della formica sulle zampe con innalzamento delle antenne come nell'atto di "sondare l'aria"	2
Grooming	Comportamento di pulizia, può essere fatto verso se stessi (allogrooming) o nei confronti delle compagne	0
Interazione bozzoli	La formica afferra i bozzoli tra le mandibole e li sposta	2
Antennamento	Movimento delle antenne	0
Trofallassi	Scambio di cibo liquido	0
Snapping	Schioccamento delle mandibole, chiusura repentina delle mandibole come nell'atto di mordere (morsi a vuoto)	3
Running	La formica si muove velocemente ed in modo erratico	1
Scouting	La formica si muove nella direzione di un oggetto o di una zona da esaminare	1
Reclutamento	La formica induce ad uscire dal nido le proprie compagne	1

Tabella 5.1

Comportamenti effettuati dalle formiche durante il tempo sperimentale. Ad ognuno di essi è stato associato un livello di aggressività crescente da 0 a 3.

Risultati

a) *Formica cunicularia*

I dati dell'attività locomotoria, analizzati con metodi statistici multivariati MANOVA ed Analisi Discriminante allo scopo di confrontare tra loro i diversi trattamenti, mostrano come le formiche reagiscano ad uno stimolo potenzialmente pericoloso per la colonia.

Il test MANOVA è risultato significativo ($F=6.611$; $p<0.001$); l'Analisi Discriminante sui parametri considerati individua 4 funzioni discriminanti di cui solo la prima, che spiega il 88.9% della varianza totale, discrimina significativamente tra i trattamenti (Wilks' $\lambda=0.414$, $\chi^2_{(16)}=118.410$, $p<0.001$) (Fig. 5.2). Sulla base della matrice di struttura (Tab. 5.2) il parametro che pesa di più nel discriminare tra i trattamenti risulta essere il Numero di formiche presenti nella zona B (zona dello stimolo). L'ANOVA ad un criterio di classificazione effettuata sui punteggi discriminati della funzione 1 è risultata essere significativa ($F_{(3,108)}=37.635$, $p<0.001$) e l'analisi post-hoc (Games-Howell) presenta tre cluster statisticamente separati; il primo è rappresentato dal controllo e dal trattamento "omocoloniale", il secondo dai trattamenti "eterocoloniale" e "enslaved" e il terzo dal trattamento "eterospecifico simpatico" (*P. rufescens*) (Fig. 5.3).

	Funzione 1
Numero di formiche presenti nella zona B	0.851*
Numero totale di formiche all'esterno del nido	0.532*
Numero di formiche entrate nella zona B	0.466
Numero di formiche uscite dalla zona A	0.551*

Tabella 5.2
Matrice di struttura dei parametri di "attività locomotoria" per la specie *F. cunicularia*. * è il parametro che meglio discrimina tra i trattamenti.

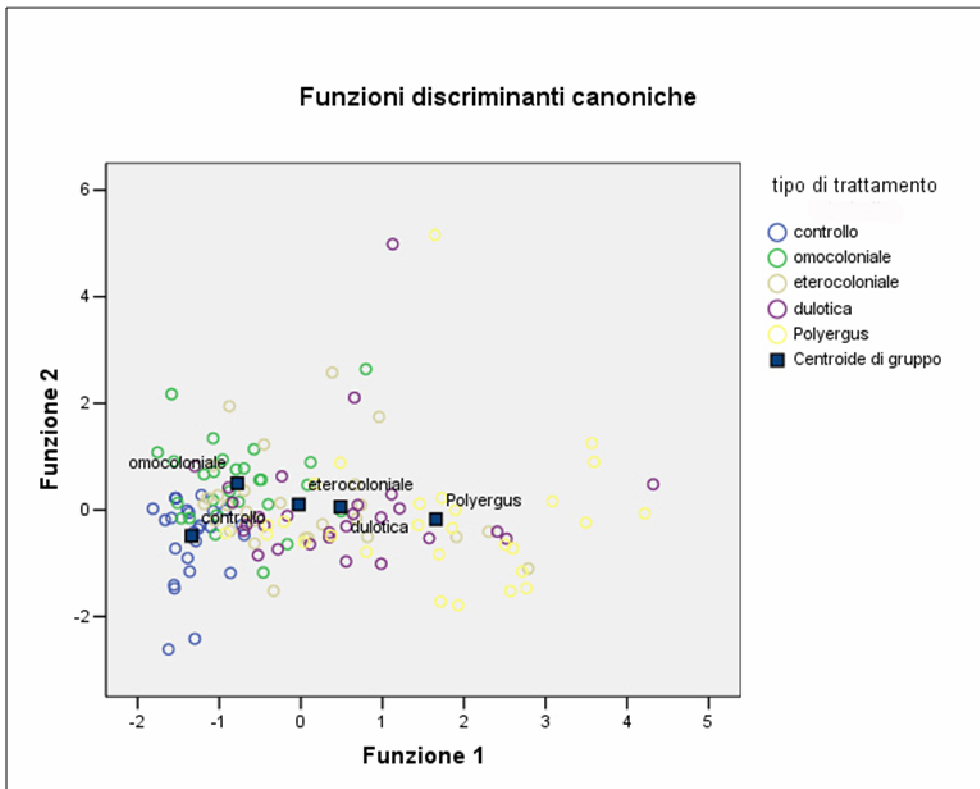


Figura 5.2
 Plot dei punteggi discriminanti dell'Analisi Discriminante effettuata sui parametri di "Attività locomotoria" della specie *F. cunicularia*.

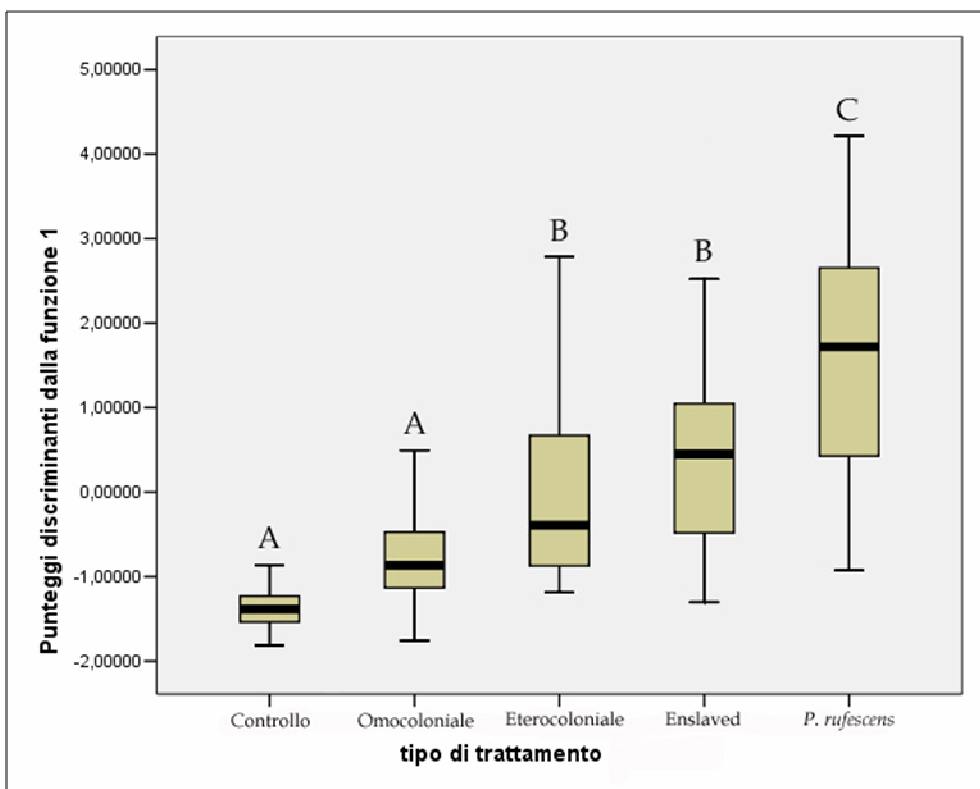


Figura 5.3
 Grafico Box-Plot dei punteggi discriminanti della funzione 1. Si evidenziano i 3 cluster separati: il primo (A) formato dal controllo e dal trattamento Omocoloniale, il secondo (B) dai trattamenti Eterocoloniale ed Enslaved, il terzo (C) dal solo trattamento *P. rufescens*.

I parametri che pesano di più nell'analisi discriminante precedente sono stati analizzati anche singolarmente con una statistica di tipo univariata; l'ANOVA ad un criterio di classificazione è risultata significativa per tutti i parametri:

- Numero di formiche presenti nella zona B ($F_{(4,135)}=27.737, p<0.001$)
- Numero di formiche uscite dalla zona A ($F_{(4,135)}=12.168, p<0.001$)
- Numero totale di formiche all'esterno del nido ($F_{(4,135)}=11.195, p<0.001$)

L'analisi post-hoc dimostra come il trattamento "eterospecifico simpatico" (*P. rufescens*) sia significativamente diverso da tutti gli altri trattamenti ed in particolare causa una maggiore presenza di formiche nella zona B (Media \pm E.S.: Controllo: 1.2 ± 0.2 ; Omocoloniale: 4.9 ± 0.6 ; Eterocoloniale: 6.8 ± 0.9 ; Enslaved: 8.5 ± 1.1 ; *P. rufescens*: 13.1 ± 1.2) (Fig. 5.4), una maggiore presenza fuori dal nido (Controllo: 7.1 ± 1.3 ; Omocoloniale: 10.9 ± 1.2 ; Eterocoloniale: 11.5 ± 1.4 ; Enslaved: 14.0 ± 1.6 ; *P. rufescens*: 21.0 ± 2.1) (Fig. 5.5), un numero maggiore di uscite dal nido (Controllo: 6.2 ± 0.9 ; Omocoloniale: 21.8 ± 3.0 ; Eterocoloniale: 25.6 ± 4.7 ; Enslaved: 28.7 ± 4.7 ; *P. rufescens*: 45.6 ± 5.3) (Fig. 5.6).

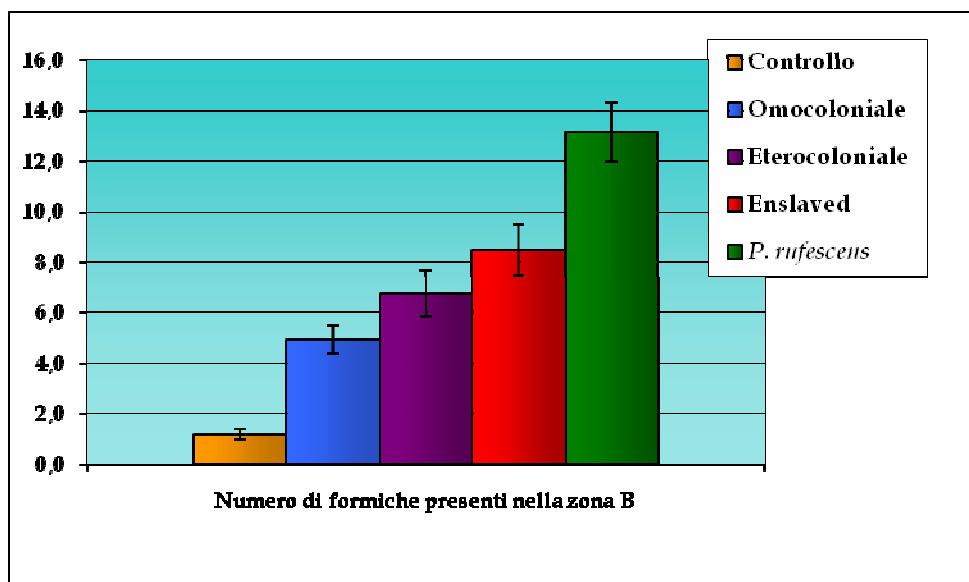


Figura 5.4
Numero di operaie di *F. cunicularia* presenti nella zona B: gli istogrammi rappresentano la media, le barre rappresentano l'Errore Standard.

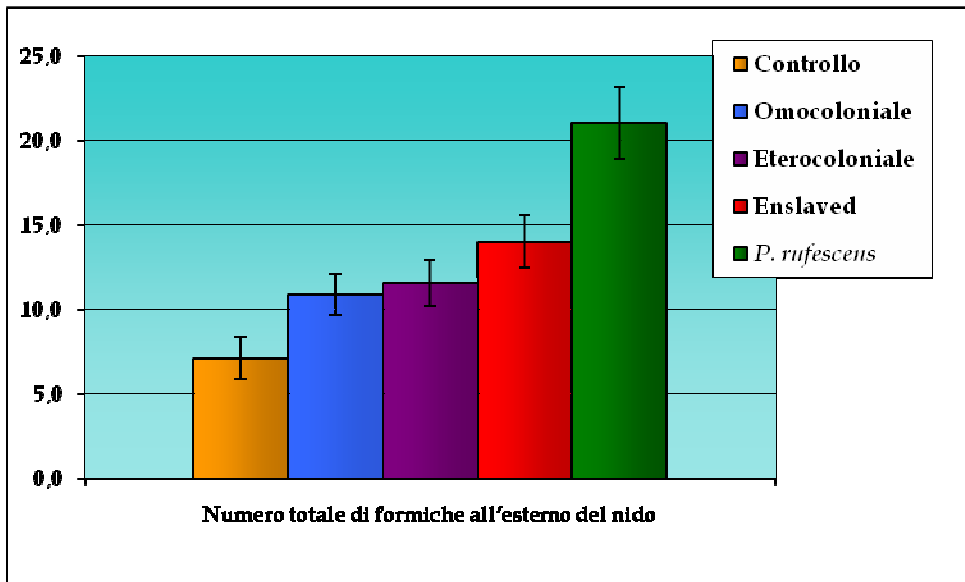


Figura 5.5
 Numero totale di operaie di *F. cunicularia* presenti all'esterno del nido: gli istogrammi rappresentano la media, le barre rappresentano l'Errore Standard.

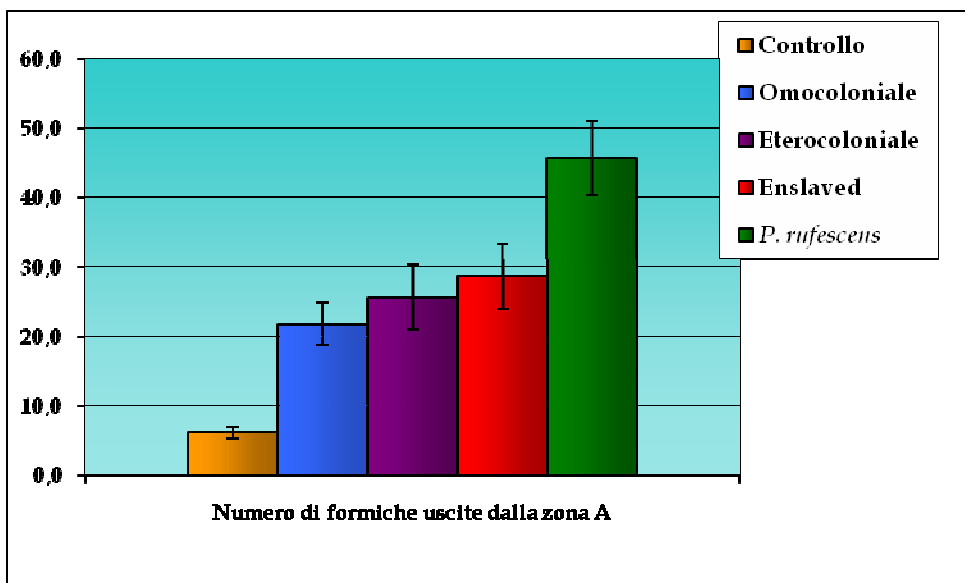


Figura 5.6
 Numero di operaie di *F. cunicularia* uscite dalla zona A: gli istogrammi rappresentano la media, le barre rappresentano l'Errore Standard.

Per quel che riguarda l'analisi dei moduli comportamentali, il test di Kruskal-Wallis è risultato significativo ($\chi^2_{(3)}=8.834, p=0.032$). L'analisi post-hoc mostra come gli Indici di Aggressività calcolati per i trattamenti "*P. rufescens*" ed "enslaved" (C, Fig. 5.7) siano significativamente maggiori di quelli calcolati per i trattamenti "omocoloniale" ed "eterocoloniale" (B, Fig. 5.7); I trattamenti "*P. rufescens*" ed "enslaved" non sono tra loro differenti così come i trattamenti "omocoloniale" ed "eterocoloniale". Tutti i trattamenti sono risultati essere significativamente maggiori del controllo (A, Fig. 5.7).

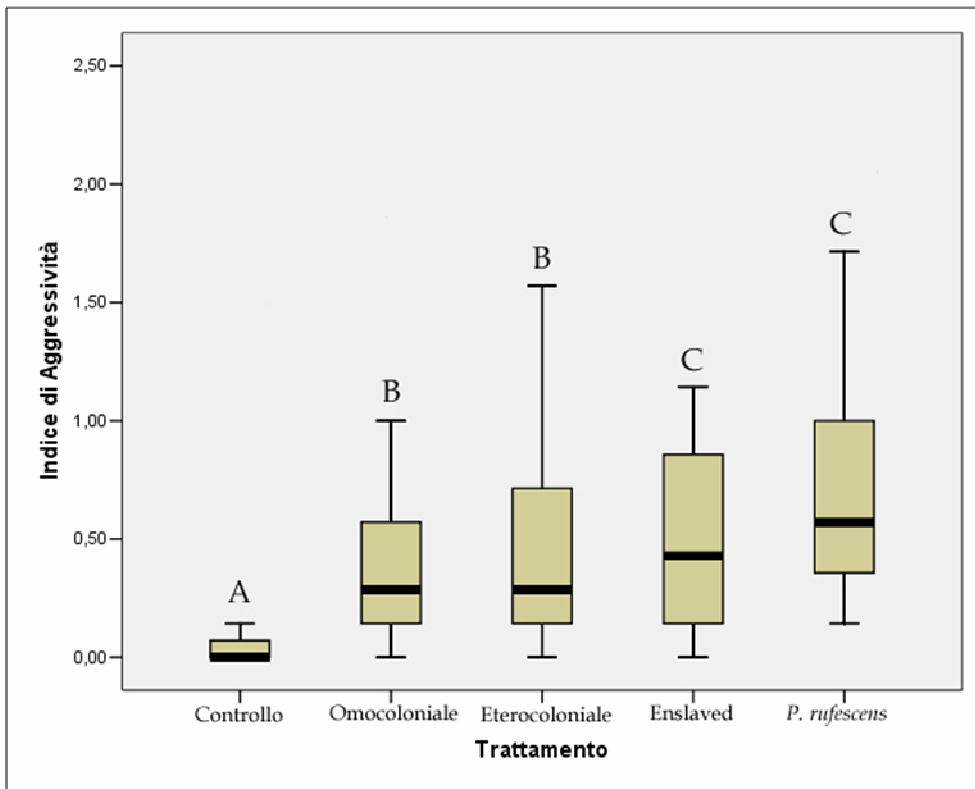


Figura 5.7
 Grafico Box-Plot dell'Indice di Aggressività in *F. cunicularia* calcolato per ogni trattamento. Le mediane con la stessa lettera non sono statisticamente differenti

b) Formica rufibarbis

I dati dell'attività locomotoria, analizzati con metodi statistici multivariati MANOVA ed Analisi Discriminante allo scopo di confrontare tra loro i diversi trattamenti, mostrano come le formiche reagiscano ad uno stimolo potenzialmente pericoloso per la colonia. Il test MANOVA è risultato significativo ($F=3.536$; $p<0.001$); l'Analisi Discriminante sui parametri considerati individua 4 funzioni discriminanti di cui solo la prima, che spiega il 70.4% della varianza totale, discrimina significativamente tra i trattamenti (Wilks' $\lambda=0.311$, $\chi^2_{(20)}=63.014$, $p<0.001$) (Fig. 5.8). L'ANOVA ad un criterio di classificazione effettuata sui punteggi discriminati della funzione 1 è risultata essere significativa ($F_{(4,55)}=15.373$, $p<0.001$) e l'analisi post-hoc (HSD di Tuckey) presenta 3 cluster statisticamente separati: il primo (A, Fig. 5.9) è rappresentato dal solo controllo, il secondo (B, Fig. 5.9) dai trattamenti "omocoloniale", "eterocoloniale" ed "eterospecifica simpatica", mentre il terzo (C, Fig. 5.9) è rappresentato dal solo trattamento "*P. rufescens*".

	Funzione 1
Numero di formiche presenti nella zona B	0.677*
Numero totale di formiche all'esterno del nido	0.407
Numero di formiche entrate nella zona B	0.537
Numero di formiche uscite dalla zona A	0.454

Tabella 5.3
Matrice di struttura dei parametri di "attività locomotoria" per la specie *F. rufibarbis*. * è il parametro che meglio discrimina tra i trattamenti.

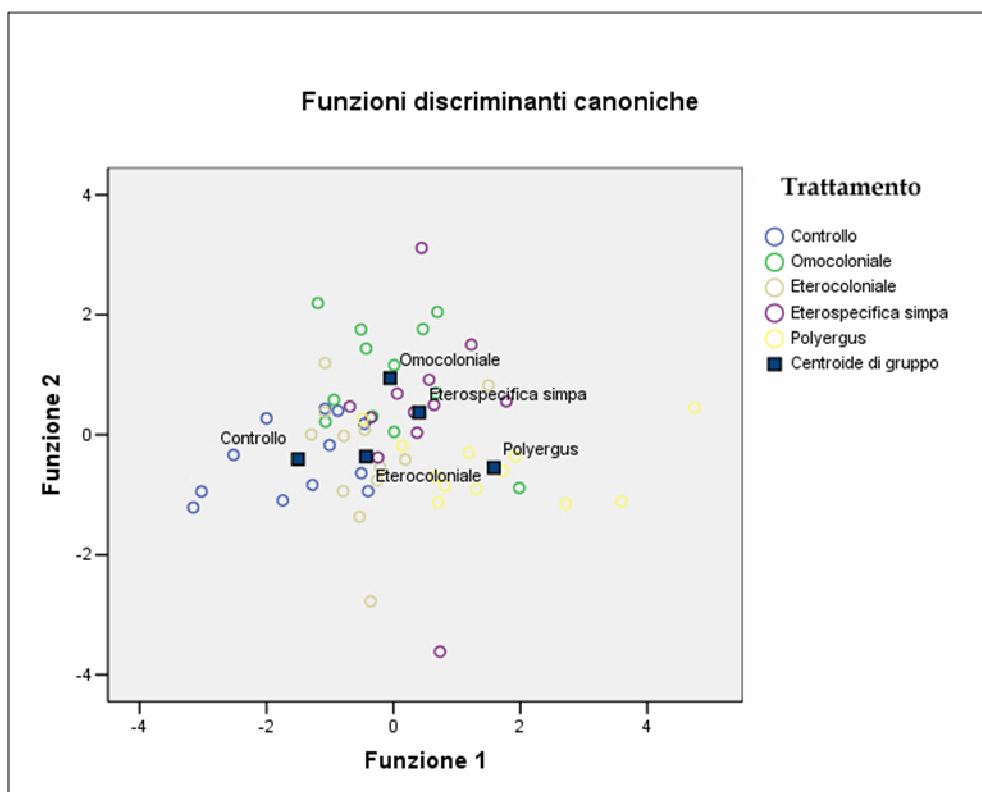


Figura 5.8
Plot dei punteggi discriminanti dell'Analisi Discriminante effettuata sui parametri di "Attività locomotoria" della specie *F. rufibarbis*.

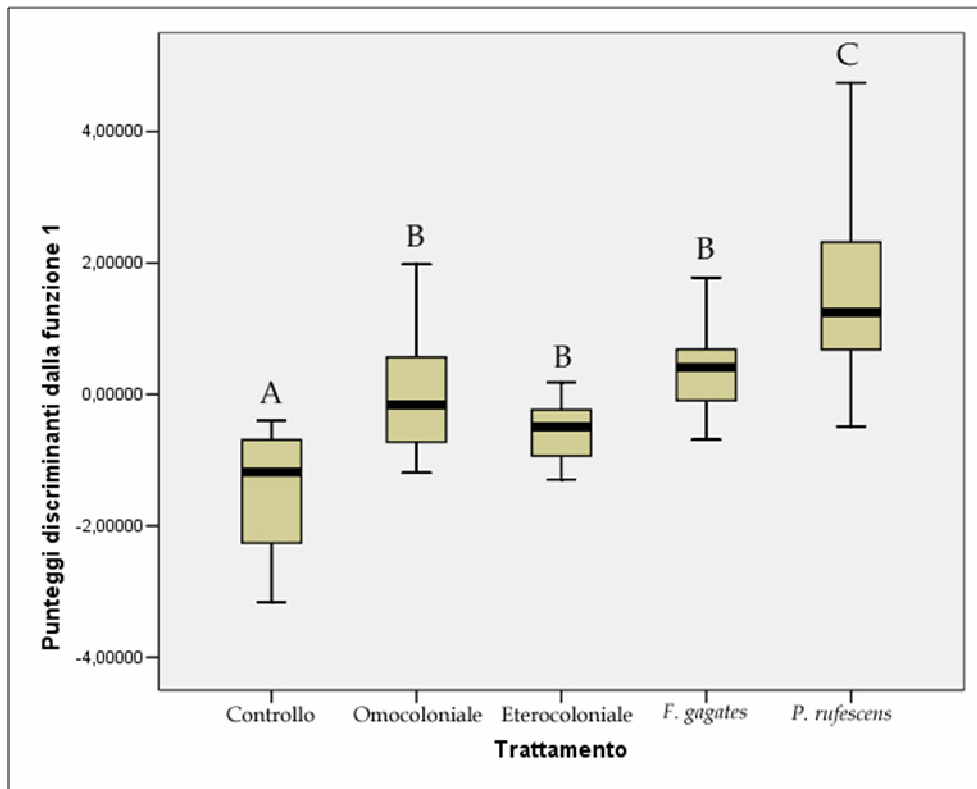


Figura 5.9
 Grafico Box-Plot dei punteggi discriminanti della funzione 1. Si evidenziano i 3 cluster separati: il primo (A) formato dal solo controllo, il secondo (B) dai trattamenti Omocoloniale, Eterocoloniale ed Eterospecifico simpatico (*F. gagate*), il terzo (C) dal solo trattamento *P. rufescens*.

Sulla base della matrice di struttura (Tab. 5.3) il parametro che pesa di più nel discriminare tra i trattamenti risulta essere il Numero di formiche presenti nella zona B (zona dello stimolo); tale parametro è stato analizzato con una statistica di tipo univariata. L'ANOVA ad un criterio di classificazione è risultata significativa ($F_{(4,55)}=7.607, p<0.001$) e l'analisi post-hoc (HSD di Tuckey) dimostra come il trattamento eterospecifico "*P. rufescens*" sia significativamente diverso da tutti gli altri trattamenti ed in particolare causa una maggiore presenza di formiche nella zona B (area dello stimolo) (Controllo: 3.3 ± 0.7 ; Omocoloniale: 8.3 ± 1.1 ; Eterocoloniale: 7.8 ± 1.6 ; *F. gagate*: 7.8 ± 1.2 ; *P. rufescens*: 14.1 ± 2.0) (Fig. 5.10).

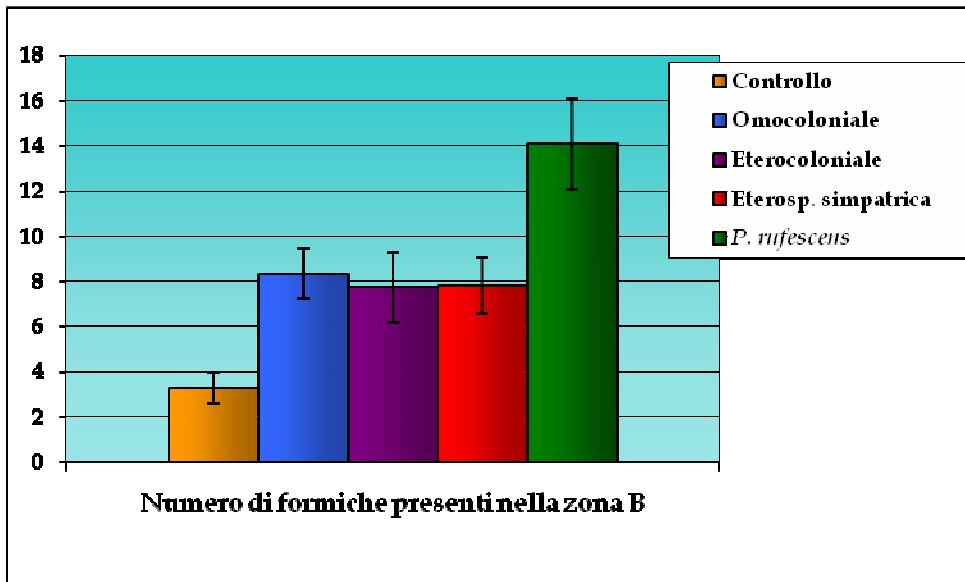


Figura 5.10
 Numero di operaie di *F. rufibarbis* presenti nella zona B: gli istogrammi rappresentano la media, le barre rappresentano l'Errore Standard.

Per quel che riguarda l'analisi dei moduli comportamentali, il test di Kruskal-Wallis è risultato significativo ($\chi^2_{(4)}=31.899, p<0.001$). L'analisi post-hoc mostra come l'Indice di Aggressività calcolato per il controllo non sia diverso dal trattamento "omocoloniale" (A, Fig. 5.11) e sono entrambi minori di tutti gli altri. Il trattamento "eterocoloniale" ed "eterospecifico" simpatico (*F. gagates*) (B, Fig. 5.11) non sono fra loro diversi ma sono diversi da tutti gli altri. Infine il trattamento "*P. rufescens*" (C, Fig. 5.11) risulta maggiore rispetto a quello di tutti gli altri trattamenti.

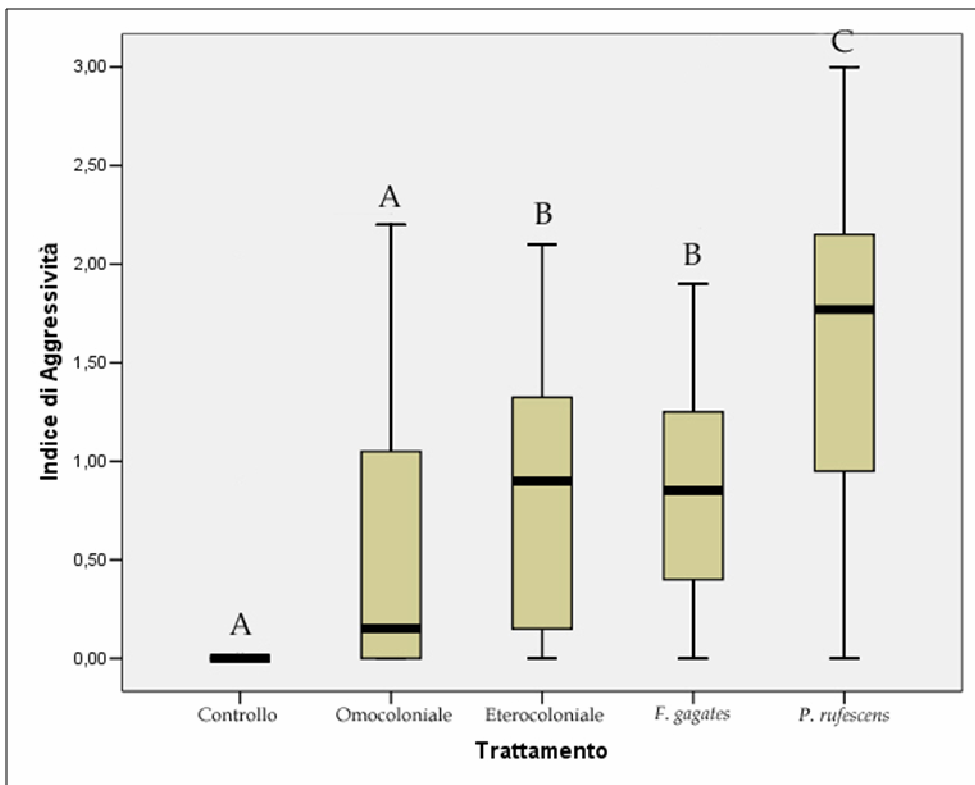


Figura 5.11
 Grafico Box-Plot dell'Indice di Aggressività in *F. rufibarbis* calcolato per ogni trattamento. Le mediane con la stessa lettera non sono statisticamente differenti

c) Confronto tra *Formica cunicularia* e *Formica rufibarbis*

L'Analisi Discriminante effettuata sui parametri di "attività locomotoria" considerati in precedenza, allo scopo di confrontare la reazione delle due specie, è risultata significativa (Wilks' $\lambda=0.805$, $\chi^2_{(12)}=33.802$, $P<0.001$). Le due specie rappresentano quindi due cluster separati (Fig. 5.12). L'analisi dei moduli comportamentali ha evidenziato una differenza significativa tra *F. cunicularia* e *F. rufibarbis* solo per il trattamento "*P. rufescens*": il test U di Mann-Whitney è risultato significativo e l'Indice di aggressività calcolato per la specie *F. rufibarbis* è maggiore di quello calcolato per la specie *F. cunicularia* (Fig. 5.13).

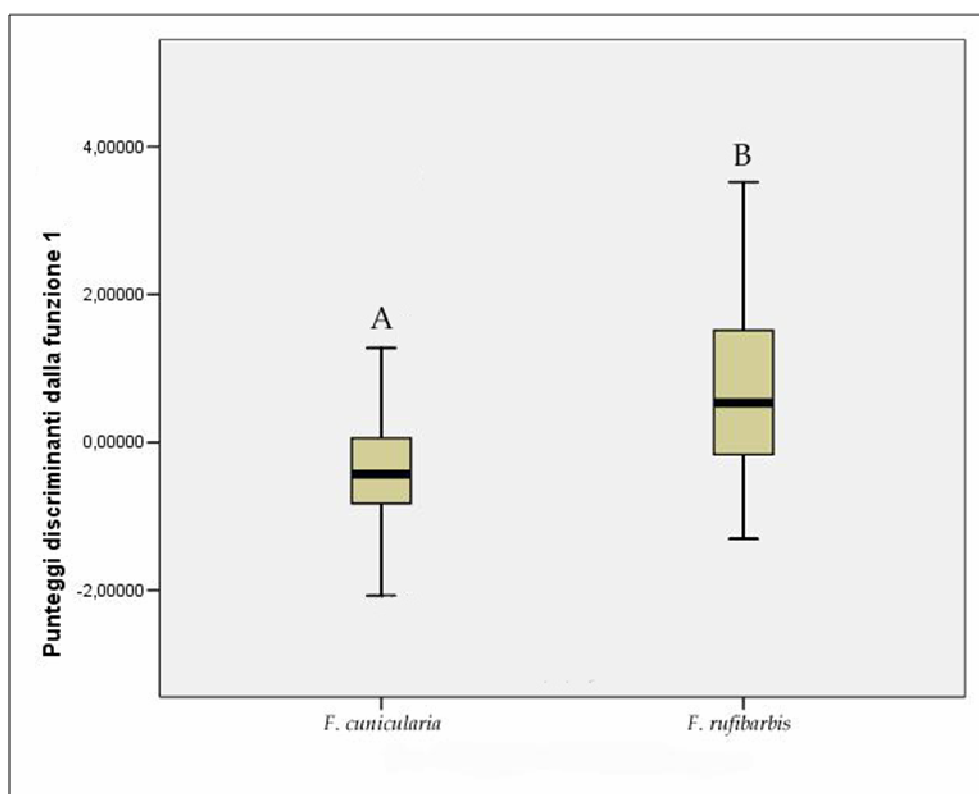


Figura 5.12
Grafico Box-Plot dei punteggi discriminanti della funzione 1 riferita all'Analisi Discriminante effettuata per due specie. Queste risultano essere due cluster significativamente separati (A - B).

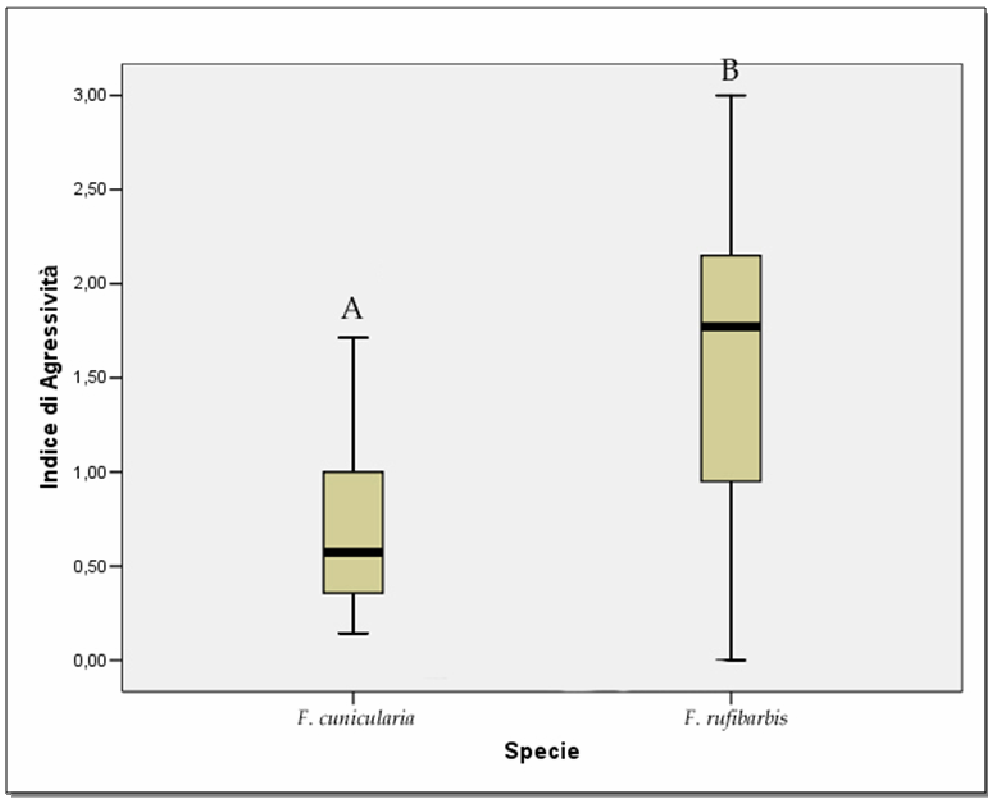


Figura 5.13
Grafico Box-Plot dell'Indice di Aggressività delle due specie calcolato per il solo trattamento *P. rufescens*. Le mediane con la stessa lettera non sono statisticamente differenti

Conclusioni

L'integrità di una colonia dipende in larga misura dall'abilità delle operaie che ne fanno parte di difenderla dalle numerose fonti di pericolo. La cooperazione tra i numerosi individui presenti rende estremamente efficaci i meccanismi difensivi di una colonia anche verso i nemici più pericolosi (BUSCHINGER e MASCHWITZ, 1984). Questa prima parte di lavoro rappresenta un'analisi comparata delle strategie di comportamento adottato da due specie simpatiche del genere *Formica* (*Formica cunicularia* e *Formica rufibarbis*) contro potenziali minacce per la colonia.

I risultati hanno dimostrato che le operaie di entrambe le specie reagiscono nello stesso modo ad una potenziale minaccia per la colonia percepita vicino all'ingresso del nido. Questa reazione è un esempio di Allarme Aggressivo (Aggressive Alarm) in base alla definizione di Hölldobler e Wilson (1990). Questo tipo di allarme è caratterizzato da una rapida uscita delle operaie dal nido, dall'attrazione verso lo stimolo e dalla manifestazione di comportamenti aggressivi aperti. Tuttavia, le operaie di entrambe le specie hanno risposto in modo diverso a seconda delle diverse fonti di pericolo presentate. Per entrambe le specie è stata osservata una crescente intensità della reazione direttamente proporzionale all'aumento della pericolosità della minaccia rappresentata dai diversi stimoli. Come previsto, all'estremo più basso della gamma di reazioni c'è lo stimolo Omocoloniale, che induce poche uscite, poche presenze di formiche nella zona stimolo e comportamenti non aggressivi. Per contro, le reazioni più intense sono state registrate nei confronti delle operaie di *P. rufescens* (il parassita), il quale ha causato più uscite, più presenze di formiche nella zona stimolo e un elevato Indice di Aggressività. Sulla base di questi risultati, il comportamento difensivo di *F. cunicularia* e *F. rufibarbis* sembra presentare il fenomeno dell'"Enemy Specification" in cui una specie ha evoluto la capacità di riconoscere nemici particolarmente pericolosi e di adottare contro di essi specifiche misure difensive (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990). Questo fenomeno è stato riscontrato anche in altre specie di formiche come il caso di *Pheidole dentata*, *P. militicida* e *P. morrissi* che mostrano una reazione maggiore nei confronti delle forti specie competitive più pericolose come *Solenopsis geminata* e *S. invicta* (WILSON, 1975; FEENER, 1986, 1987). Anche le formiche tessitrici del genere *Oecophylla* mostrano questo fenomeno nei confronti di alcune predatrici come *Pheidole megacephala*, *P. punctulata*, *Anoplolepis longinoda* ed alcune

specie di *Crematogaster* (HÖLLDOBLER, 1986, 1987). Infine, questo fenomeno è stato osservato anche in un caso simile a quello osservato in questi esperimenti: in *Temnothorax longispinosus* nei confronti del suo parassita obbligato *Harpagoxenus americanus* (ALLOWAY, 1990).

Il particolare comportamento dell'“Enemy Specification”, adottato sia da *F. cunicularia* sia da *F. rufibarbis*, può essere considerato come un efficace contro-adattamento sviluppato nella “corsa agli armamenti” tra ospite e parassita. Nel contesto dello schiavismo interspecifico, i reciproci adattamenti sia degli ospiti che dei parassiti possono comprendere numerosi aspetti della loro biologia, tra cui hanno una importanza cruciale la fondazione della colonia (effettuata dal parassita per usurpazione) e le razzie (razzia di prole a danno dei nidi dell'ospite) hanno una importanza cruciale (MORI *et al.*, 2001c; BRANDT *et al.*, 2005). In entrambi i casi, sono stati descritti numerosi contro-adattamenti sia per quanto riguarda l'ospite che il parassita (vedi ad esempio BILLEN *et al.*, 2001; LENOIR *et al.*, 2001; MORI *et al.*, 2001c; VISICCHIO *et al.*, 2001; FOITZIK *et al.*, 2003; D'ETTORRE *et al.*, 2004). Per quel che riguarda le razzie, questi attacchi possono essere effettuati più volte l'anno e hanno un effetto invasivo nei confronti della colonia bersaglio (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990; MORI *et al.*, 1991; LE MOLI *et al.*, 1994; FOITZIK e HERBERS, 2001). Questo comportamento del parassita rappresenta quindi una chiara e forte pressione selettiva sugli ospiti (FRANKS *et al.*, 1990; BLATRIX e HERBERS, 2003). Alcuni comportamenti come un più efficiente sistema di riconoscimento, una migliore capacità di combattimento, una più rapida evacuazione della prole e della regina, e di un più efficiente sistema di allarme rappresentano degli adattamenti evoluti dagli ospiti come risposta alle razzie del parassita (BRANDT *et al.*, 2005).

Nel caso qui presentato, il particolare comportamento aggressivo mostrato dalle specie ospiti verso il parassita risulta essere estremamente vantaggioso nella fase di localizzazione del nido bersaglio da parte del parassita. Questo utilizza alcuni individui detti “scout” che esplorano l'ambiente circostante allo scopo di localizzare un nido dell'ospite. Una volta individuato tornano al proprio nido e comunicano la presenza e la localizzazione del nido (vedi LE MOLI *et al.*, 1994). Quando una scout di *P. rufecens* è scoperta nei pressi del nido, la sua uccisione impedisce la trasmissione di queste informazioni alla colonia del parassita, salvando quindi l'ospite dalla attività di razzia e di conseguenza da una grande perdita di prole e risorse.

Il confronto tra la reazione di allarme delle due specie ha dimostrato che queste sono diverse, l'analisi discriminante infatti individua nelle due specie due cluster differenti. La differenza però non riguarda la modalità di attuazione del comportamento quanto piuttosto l'intensità di quest'ultimo. In particolare l'analisi dell'Indice di Aggressività associato alle due specie ha evidenziato come *F. rufibarbis* sia tendenzialmente più aggressiva di *F. cunicularia* verso tutti i pericoli, ed in particolare nei confronti del parassita *P. rufescens*. Questo potrebbe chiarire ulteriormente la preferenza del parassita verso uno solo dei suoi diversi potenziali ospiti quando questi sono entrambi presenti nella stessa area (MORI *et al.*, 1994). La presenza della sola *F. cunicularia* in colonie miste del parassita nella nostra zona di studio potrebbe in effetti riflettere la progressiva acquisizione di una preferenza locale da parte del parassita, dovuta ad una diversa efficacia dei meccanismi di allarme/difesa delle specie ospiti nei confronti delle scout di *P. rufescens*. I dati presentati, sostenuti anche da precedenti osservazioni in campo (cfr. MORI *et al.*, 1994), mostrano che le operaie di *F. rufibarbis* sono più efficaci di quelle di *F. cunicularia* nel contrastare le scout di *P. rufescens*. Ciò può contribuire a spiegare il motivo per cui nella nostra zona di studio, i raid effettuati con successo avvengono solo nei confronti di colonie di *F. cunicularia* e non di *F. rufibarbis* (cfr. MORI *et al.*, 1991; LE MOLI *et al.*, 1994).

Capitolo 7

**INDIVIDUAZIONE DELLE SORGENTI
GHANDOLARI DEI FEROMONI DI
ALLARME IN *Formica cunicularia*
(HYMENOPTERA, FORMICIDAE)**

(Set sperimentale 1)

Materiali e Metodi

a) Apparato sperimentale

Durante il periodo estivo 2004 e 2005 sono state raccolte in natura frammenti di colonie diverse (operaie, bozzoli, larve e pupe) della specie *F. cunicularia*. I frammenti sono stati successivamente alloggiati in contenitori di vetro con terra e materiale organico proveniente dal nido d'origine in modo da garantire condizioni di vita del tutto simili a quelle naturali. Le colonie così allestite sono state mantenute in laboratorio in condizioni controllate di temperatura (26-28 °C) e di umidità (50-60 %). Il periodo di luce giornaliera era costante di 12 ore. Ogni frammento è stato alimentato fornendo acqua, miele e frammenti di insetti.

Per questo esperimento sono state allestite 10 arene contenenti ciascuna 50 operaie e 10 bozzoli. Le arene erano costituite da una base rigida in PVC di 37x25 cm, sopra la quale era stata fissata una struttura in gesso di forma ovale (34.5x24 cm) alta 2 cm. La nicchia di nidificazione (6x7 cm) era ricavata nel gesso e chiusa da un coperchio in plastica trasparente e da un foglio lucido rosso delle stesse dimensioni in modo da permettere la visione dell'interno della nicchia e allo stesso tempo di mantenere gli individui in condizione di penombra. Il resto dell'arena costituiva l'area di foraggiamento a cui le operaie potevano accedere liberamente. Ogni giorno le operaie morte erano sostituite in modo tale da mantenere costante il numero di individui per ogni arena.

Allo scopo di individuare le sorgenti ghiandolari dei feromoni di allarme sono stati saggiati estratti delle più importanti strutture secernenti dell'intera formica:

- Ghiandola Mandibolare
- Ghiandola del Veleno
- Ghiandola di Dufour
- Sacco Rettale
- Capo in toto (privato delle ghiandole mandibolare)

L'estrazione del contenuto ghiandolare è stato effettuata tramite solvente (esano): ogni ghiandola estratta da un individuo era messa in un vial in modo tale da mantenere una concentrazione costante di una ghiandola per 10 μ l di solvente. In questo modo 10 μ l di estratto corrispondevano ad un individuo-equivalente (nel caso della ghiandola mandibolare, che è una struttura pari, la concentrazione era di 2 ghiandole ogni 10 μ l). Il procedimento di estrazione era lasciato avvenire per almeno 24 ore. Gli estratti così ottenuti sono stati saggiati nell'apparato descritto.

b) Protocollo sperimentale

10 μ l di soluzione ghiandolare erano iniettati su di un pezzo di carta filtro e lasciati adsorbire. Questo era poi posizionato con uno spillo metallico al centro di una zona circolare ($r = 3$ cm) nell'area di foraggiamento dell'arena a circa 5 cm di distanza dall'ingresso della nicchia di nidificazione. Il solo pezzo di carta da filtro è stato usato come controllo. L'arena sperimentale era poi suddivisa in 3 zone diverse (Fig. 6.1):

- **Zona A:** nido o nicchia di nidificazione
- **Zona B:** area circolare dove era posizionato lo stimolo
- **Zona C:** resto dell'arena (area di foraggiamento)

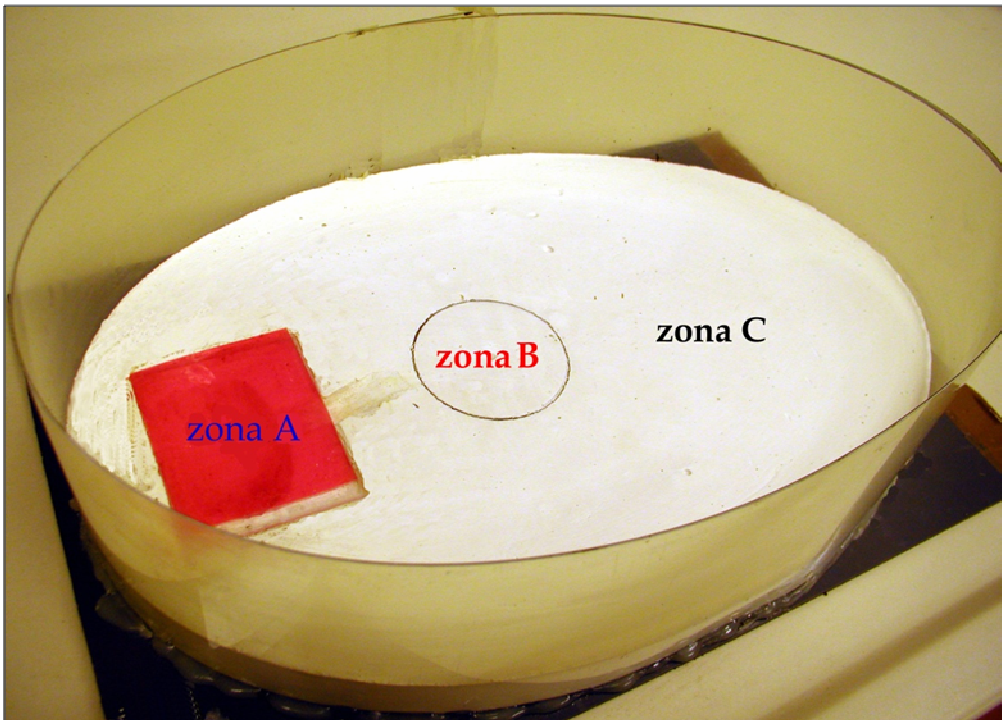


Figura 6.1
Arena sperimentale in cui si distinguono le tre zone: la nicchia di nidificazione (**Zona B**), l'area dello stimolo (**Zona A**) e l'area di foraggiamento (**Zona C**).

Ogni stimolo è stato presentato solo una volta per ogni arena. In totale sono state effettuate 60 prove. Il tempo sperimentale di osservazione era di 10 minuti suddiviso in 20 intervalli da 30" ciascuno.

c) Parametri analizzati

In questi esperimenti sono stati registrati diversi parametri allo scopo di descrivere sia il movimento delle operaie nello spazio, sia il tipo di comportamenti effettuati in risposta allo stimolo presentato. Durante il tempo sperimentale alla fine di ogni intervallo sono stati registrati i seguenti parametri di "attività locomotoria":

5. Numero di formiche uscite dalla zona A;
6. Numero di formiche presenti nella zona B;
7. Numero totale di formiche all'esterno del nido (B + C);
8. Numero di formiche entrate nella zona B.

I dati ottenuti sono stati analizzati statisticamente utilizzando il software di analisi statistica SPSS® (ver. 13.0). I trattamenti sono stati confrontati fra di loro tramite

MANOVA, Analisi Discriminante, ANOVA e test HSD di Tuckey e Games-Howell per i confronti post-hoc.

Parallelamente è stata effettuata anche una analisi di tipo comportamentale di tipo “scan sampling”: in ogni prova venivano registrati i principali comportamenti aggressivi (Tab. 6.1) effettuati nella zona B (area dello stimolo) da parte di ogni formica presente nella zona. Tutti i dati sono stati raccolti utilizzando il software NOLDUS “The Observer” ® ver. 5.0, specifico per analisi etologiche. I dati ottenuti sono stati confrontati fra di loro utilizzando il test non parametrico Kruskal-Wallis.

Postura Eretta	Postura di allerta in cui l'individuo si solleva sulle zampe anteriori mantenendo le antenne dritte e rivolte in avanti
Scatti	Movimenti brevi e rapidi (a scatto) generalmente effettuati in avanti o lateralmente con tutto il corpo
Minaccia	Apertura evidente delle mandibole
Flessione del Gastro	Flessione in avanti del gastro tra le zampe posteriori come nell'atto di spruzzare (a volte è accompagnato dall'emissione del secreto di ghiandole addominali)
Chiusura delle mandibole (Snapping)	Schioccamento delle mandibole, chiusura repentina delle mandibole come nell'atto di mordere (morsi a vuoto)
Morsi	Morsi che possono essere portati a termine o meno su un oggetto

Tabella 6.1

Principali comportamenti aggressivi osservati nella zona circolare dove veniva posizionato lo stimolo (Zona A)

Risultati

a) Analisi dei parametri di "attività locomotoria"

Il test MANOVA è risultato significativo ($F=3.557$; $p<0.001$); l'Analisi Discriminante sui parametri considerati individua 4 funzioni discriminanti di cui solo la prima, che spiega il 90.8 % della varianza totale, discrimina significativamente tra i trattamenti (Wilks' $\lambda=0.543$, $\chi^2_{(15)}=43.683$, $p<0.001$) (Fig. 6.2). L'ANOVA ad un criterio di classificazione effettuata sui punteggi discriminati della funzione 1 è risultata essere significativa ($F_{(5,71)}=10.167$, $p<0.001$) e l'analisi post-hoc (Games-Howell) presenta due cluster statisticamente separati; il primo (**A**, Fig. 6.3) è rappresentato dal solo trattamento "ghiandola mandibolare" e il secondo (**B**, Fig. 6.3) da tutti gli altri trattamenti ed il controllo.

	Funzione 1
Numero di formiche presenti nella zona B	0.596*
Numero totale di formiche all'esterno del nido	0.201
Numero di formiche entrate nella zona B	0.148
Numero di formiche uscite dalla zona A	0.825*

Tabella 6.2
Matrice di struttura dei parametri di "attività locomotoria" per la specie *F. cunicularia*. * è il parametro che meglio discrimina tra i trattamenti.

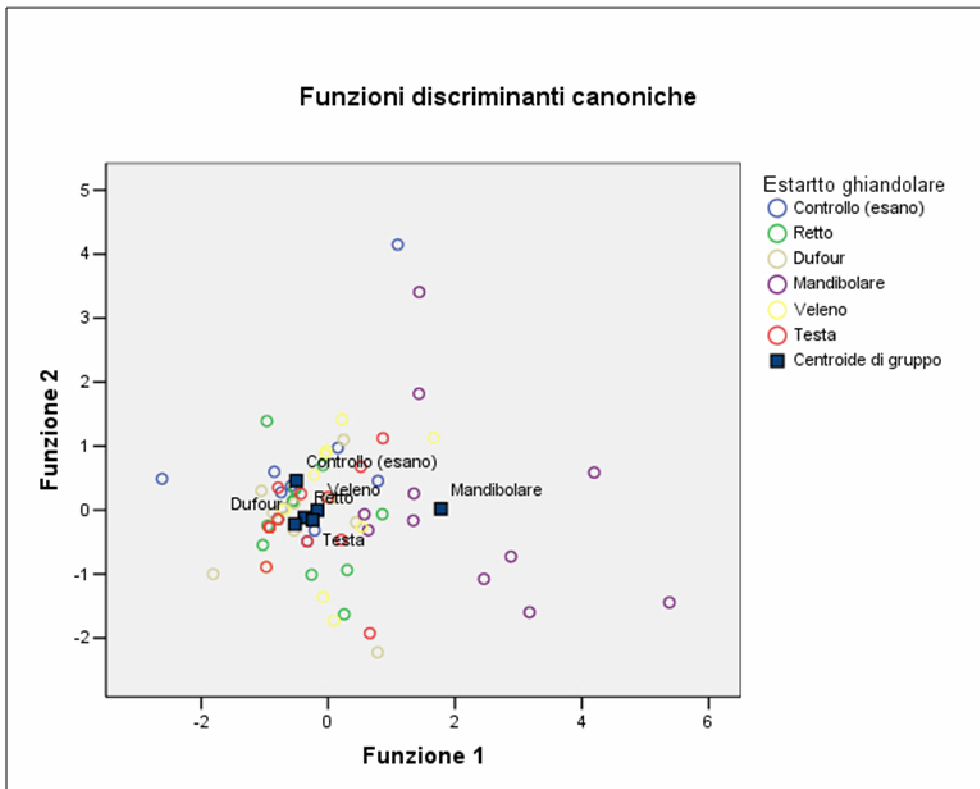


Figura 6.2
 Plot dei punteggi discriminanti dell'Analisi Discriminante effettuata sui parametri di "Attività locomotoria" della specie *F. cunicularia*.

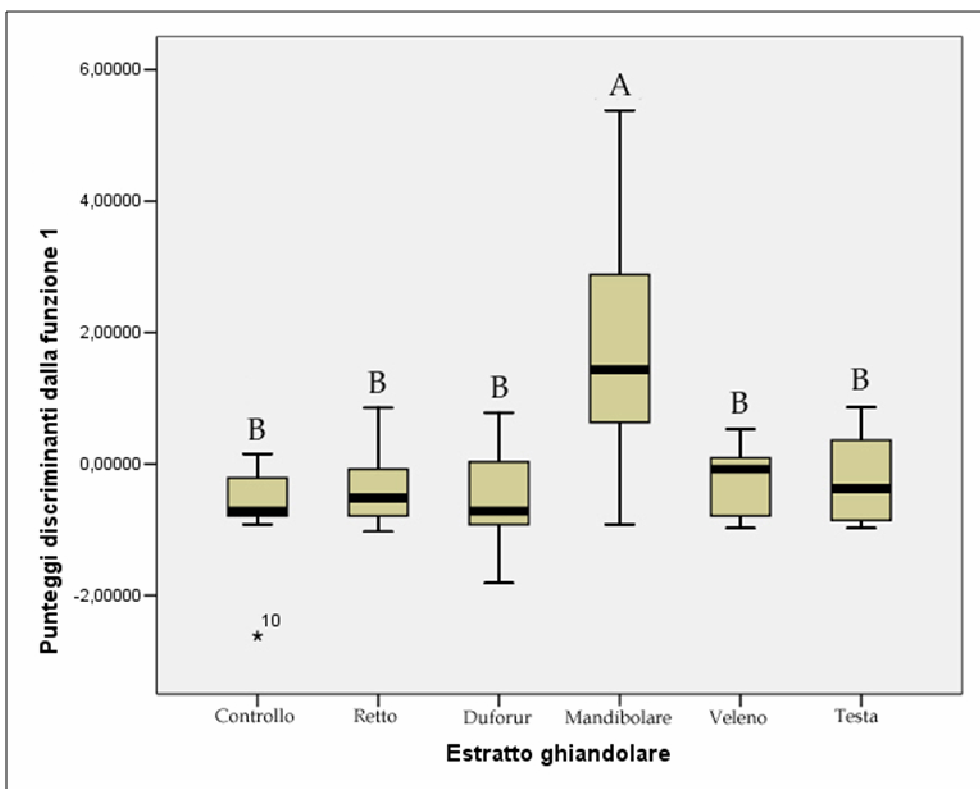


Figura 6.3
 Grafico Box-Plot dei punteggi discriminanti della funzione 1. Si evidenziano i 2 cluster separati: il primo (A) formato dal solo trattamento "Ghiandola mandibolare", mentre il secondo (B) da tutti gli altri trattamenti e dal controllo.

Sulla base della matrice di struttura (Tab. 6.2) i parametri che pesano di più nel discriminare tra i trattamenti risultano essere Numero di formiche uscite dalla zona A ed il Numero di formiche presenti nella zona B. Questi parametri sono stati analizzati

singolarmente con una statistica di tipo univariata; l'ANOVA ad un criterio di classificazione è risultata significativa per entrambi i parametri:

- Numero di formiche uscite dalla zona A ($F_{(5,71)}=7.086, p<0.001$)
- Numero di formiche presenti nella zona B ($F_{(5,71)}=3.849, p=0.004$)

L'analisi post-hoc dimostra come il trattamento "ghiandola mandibolare" sia significativamente diverso da tutti gli altri trattamenti; ed in particolare è associata ad un numero maggiore di uscite dal nido (Media \pm E.S.: Controllo: 6.4 ± 2.2 ; Retto 5.4 ± 0.9 ; Dufour 4.7 ± 1.1 ; Mandibolare 18.5 ± 3.3 ; Veleno 6.2 ± 1.8 ; Testa 5.8 ± 1.6) (Fig. 6.4) ed una maggiore presenza di formiche nella zona B (area dello stimolo) (Controllo: 0.6 ± 0.2 ; Retto 0.9 ± 0.3 ; Dufour 1.1 ± 0.5 ; Mandibolare 2.7 ± 0.6 ; Veleno 0.9 ± 0.2 ; Testa 1.0 ± 0.3) (Fig. 6.5).

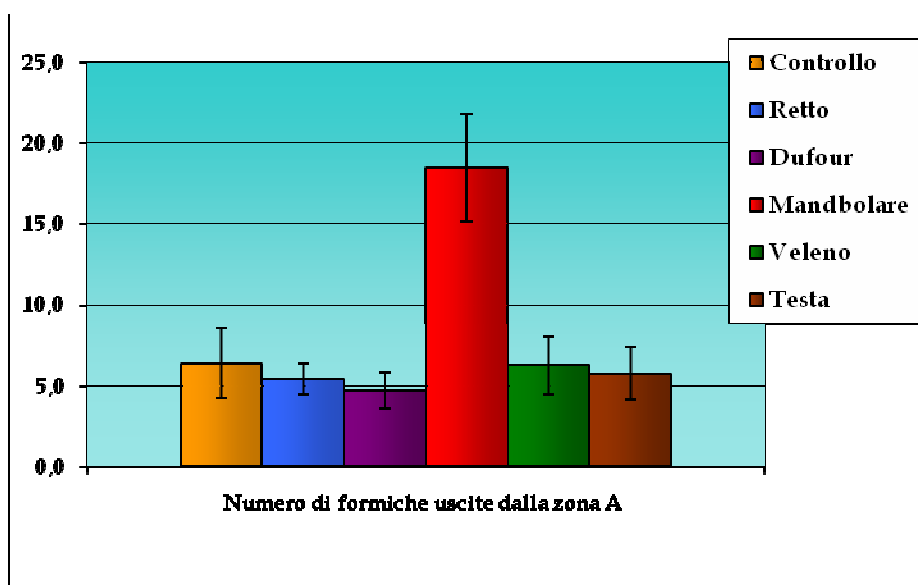


Figura 6.4
Numero di operaie di *F. cunicularia* uscite dalla zona A: gli istogrammi rappresentano la media, le barre rappresentano l'Errore Standard.

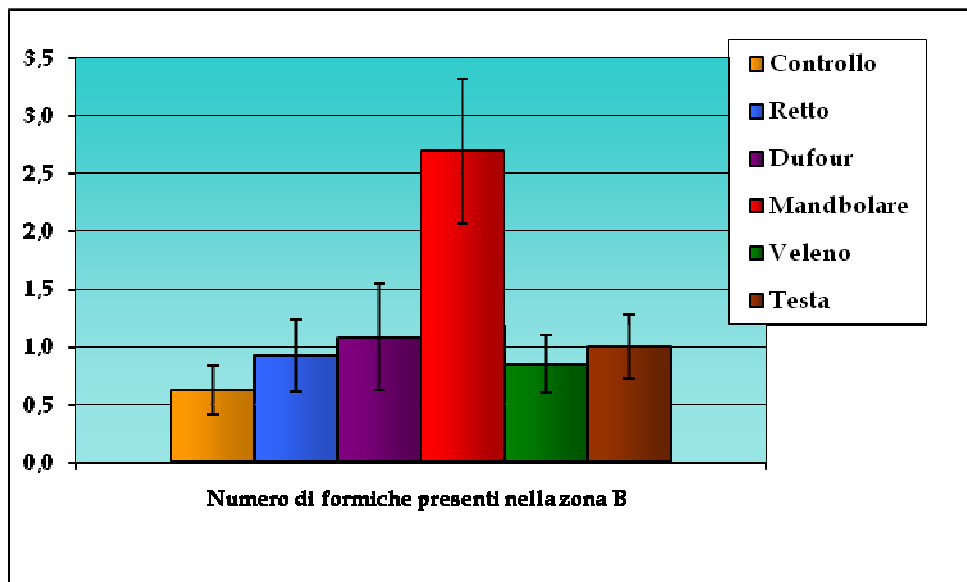


Figura 6.5
 Numero di operaie di *F. cunicularia* presenti nella zona B: gli istogrammi rappresentano la media, le barre rappresentano l'Errore Standard.

b) Analisi dei display comportamentali

Il test di Kruskal-Wallis effettuato per ogni singolo comportamento osservato (Tab 6.1) è risultato significativo per i comportamenti di Scatti ($\chi^2_{(5)}=17.517, p=0.004$), Minaccia ($\chi^2_{(5)}=19.542, p=0.002$), Snapping ($\chi^2_{(5)}=26.644, p<0.001$), mentre non è risultato significativo per i comportamenti di Postura eretta, Flessione del gastro e Morsi. L'analisi post-hoc effettuata dimostra come il trattamento "ghiandola mandibolare" sia significativamente diverso da tutti gli altri trattamenti; ed in particolare induce una frequenza maggiore di scatti (Mediana \pm D.S.: Controllo: 0.1 ± 0.2 ; Retto 0.4 ± 0.3 ; Dufour 0.2 ± 0.4 ; Mandibolare 0.8 ± 0.1 ; Veleno 0.6 ± 0.4 ; Testa 0.0 ± 0.3) (Fig. 6.6), minacce (Controllo: 0.1 ± 0.2 ; Retto 0.0 ± 0.3 ; Dufour 0.2 ± 0.3 ; Mandibolare 1.0 ± 0.0 ; Veleno 0.3 ± 0.4 ; Testa 0.2 ± 0.3) (Fig. 6.7) e snapping (Controllo: 0.0 ± 0.0 ; Retto 0.0 ± 0.0 ; Dufour 0.0 ± 0.0 ; Mandibolare 0.3 ± 0.3 ; Veleno 0.0 ± 0.0 ; Testa 0.0 ± 0.0) (Fig. 6.8) rispetto a tutti gli altri trattamenti ed il controllo, i quali tra loro non sono significativamente differenti.

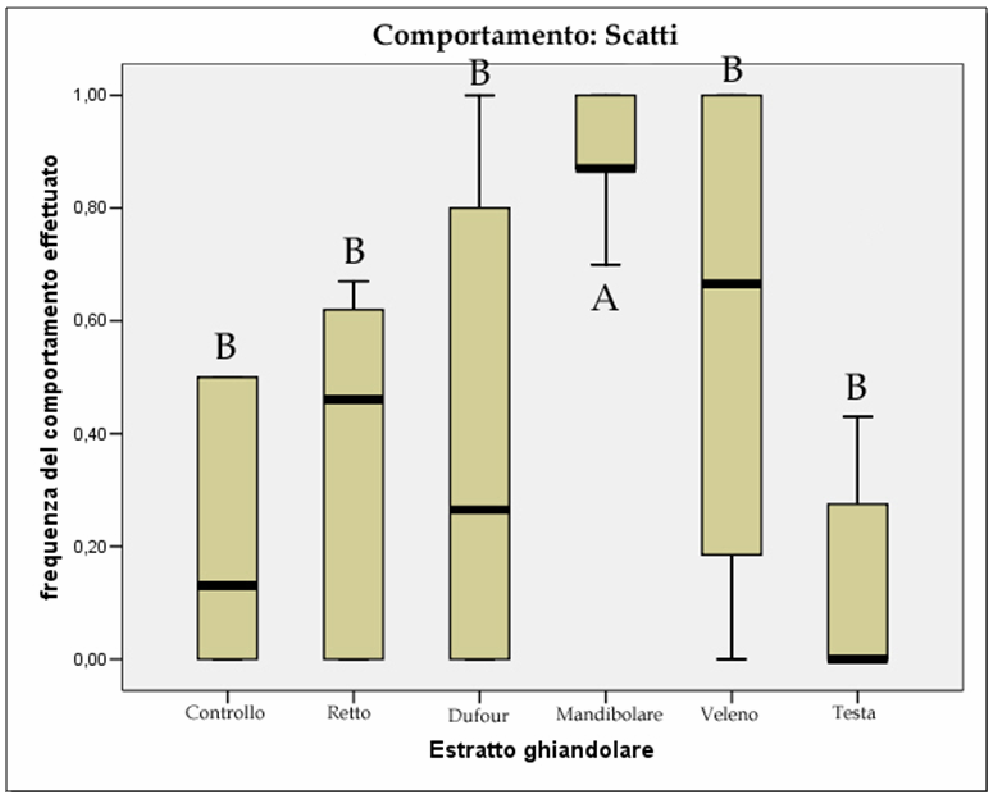


Figura 6.6
 Grafico Box-Plot delle frequenze osservate per il comportamento Scatti. Le mediane con la stessa lettera non sono statisticamente differenti.

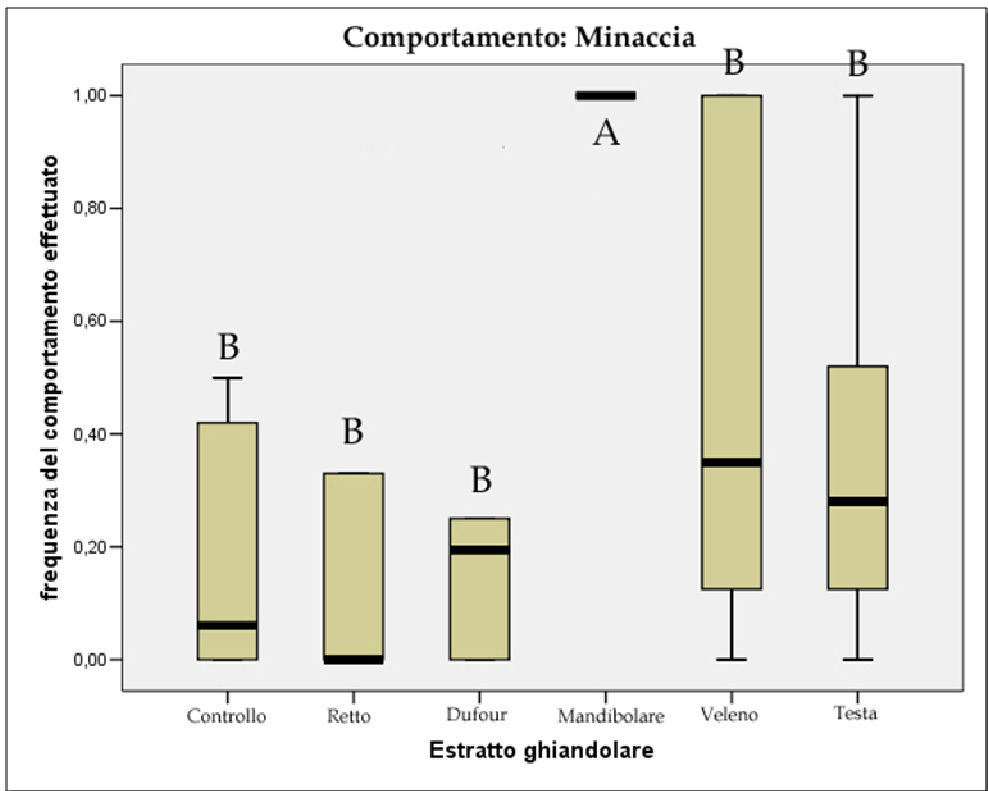


Figura 6.7
 Grafico Box-Plot delle frequenze osservate per il comportamento Minaccia. Le mediane con la stessa lettera non sono statisticamente differenti.

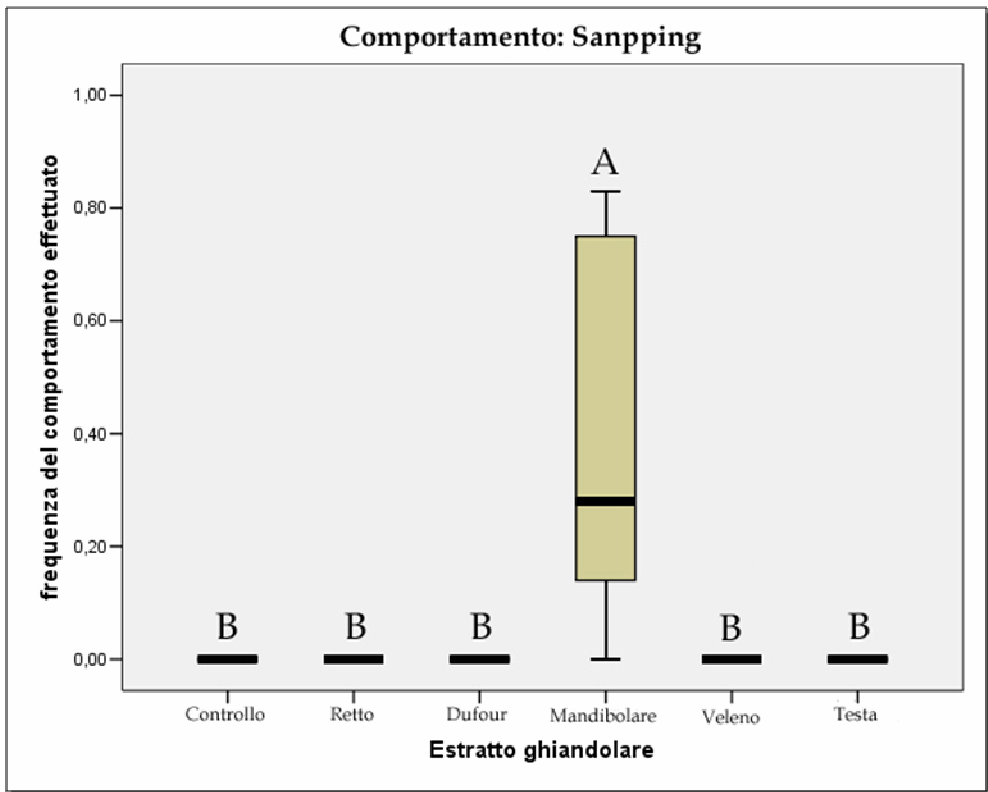


Figura 6.8
 Grafico Box-Plot delle frequenze osservate per il comportamento Snapping. Le mediane con la stessa lettera non sono statisticamente differenti

Materiali e Metodi

a) Apparato sperimentale

Durante il periodo estivo 2005 sono state raccolte in natura frammenti di colonie diverse (operaie, bozzoli, larve e pupe) della specie *F. cunicularia*. I frammenti sono stati successivamente alloggiati in contenitori di vetro con terra e materiale organico proveniente dal nido d'origine in modo da garantire condizioni di vita del tutto simili a quelle naturali. Le colonie così allestite sono state mantenute in laboratorio in condizioni controllate di temperatura (26-28 °C) e di umidità (50-60 %). Il periodo di luce giornaliera era costante di 12 ore. Ogni frammento è stato alimentato fornendo acqua, miele e frammenti di insetti.

Per questo esperimento sono state allestite 8 arene contenenti ognuna 250 operaie ciascuna. Queste erano formate da un contenitore a base rettangolare (11x21x12 cm) coperte con il proprio coperchio in modo da non permettere alla luce di penetrare. Il coperchio presentava inoltre due fori rettangolari dotati di una apposita griglia in modo da fare passare arie ma non luce. Questa parte dell'apparato rappresentava la parte interna del nido. Un tubo di plastica trasparente collegava la parte interna con una parte esterna del nido (area di foraggiamento) formata da un contenitore in plastica a base circolare dal diametro di 20 cm (Fig. 6.9). Il tubo di plastica trasparente era dotato di un sistema a doppia paratia che regolava l'ingresso delle formiche nella parte esterna dell'apparato (Fig. 6.10). Anche in questo caso ogni giorno le operaie morte erano sostituite in modo tale da mantenere costante il numero di individui per ogni arena.

In questa serie di esperimenti solo le tre principali ghiandole esocrine (Ghiandola mandibolare, Ghiandola di Dufour e Ghiandola del veleno), potenzialmente coinvolte nella comunicazione di allarme, sono state saggiate allo scopo di meglio caratterizzare questo fenomeno. Le ghiandole, estratte direttamente da individui provenienti dalla stessa colonia, venivano schiacciate su di un pezzo di carta da filtro e posizionate al centro della

parte circolare dell'arena (la parte esterna del nido). A questo punto veniva permesso ad una sola operaia di entrare nell'area di foraggiamento e si dava inizio alla prova. Il solo pezzo di carta da filtro era utilizzato come trattamento di controllo. Ogni trattamento è stato testato 15 volte in ordine random per ogni arena per un totale di 60 prove. Il tempo sperimentale era di 10 minuti.

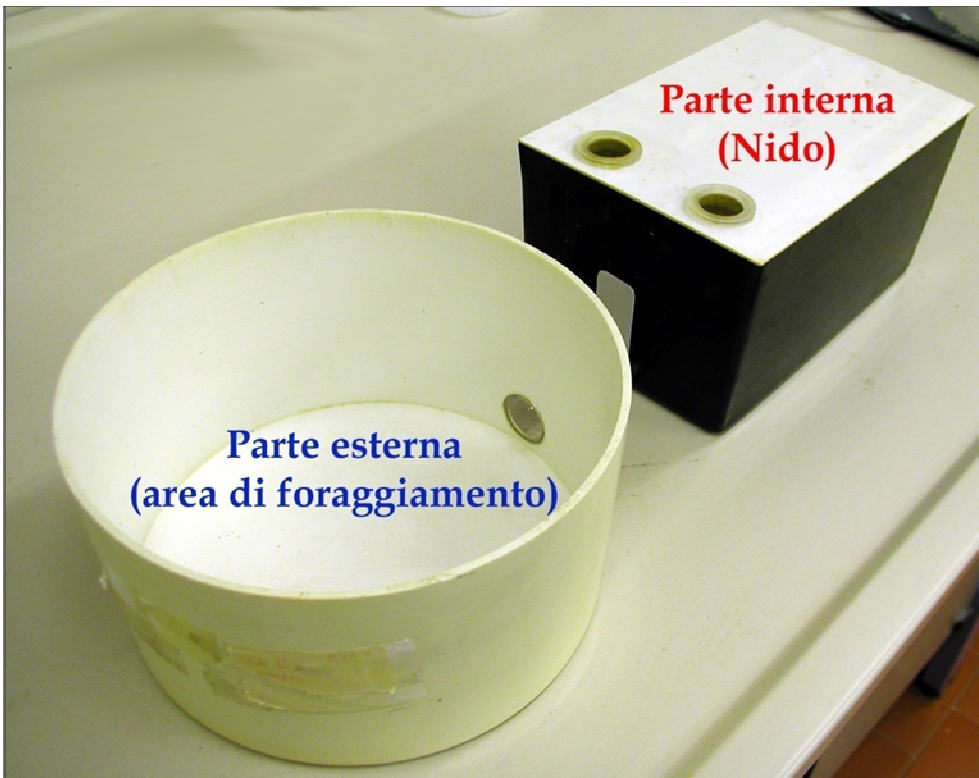


Figura 6.9
Apparato sperimentale in cui si distinguono le due zone principali: la parte interna (Nido) e la parte esterna (Area di foraggiamento)

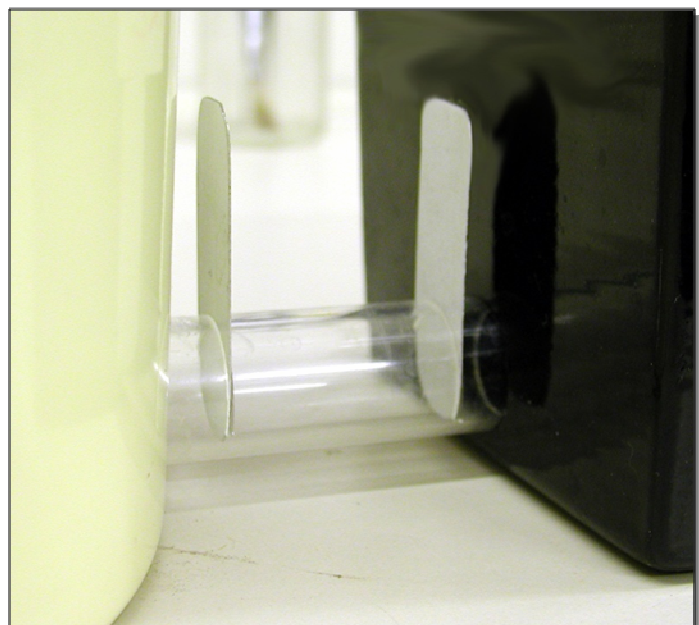


Figura 6.10
Particolare dell'apparato sperimentale in cui si vede il tubo di plastica trasparente e le due paratie che regolavano il flusso delle formiche verso la parte esterna.

b) Parametri analizzati

In questi esperimenti sono stati registrati diversi parametri allo scopo di descrivere sia il movimento delle operaie nello spazio dell'arena sperimentale, sia il tipo di comportamenti effettuati in risposta allo stimolo presentato. Durante il tempo sperimentale sono stati registrati i seguenti parametri di "attività locomotoria" utilizzando il software per analisi etologiche NOLDUS "Ethovision Pro" ® ver. 2.1.6:

- Distanza percorsa
- Velocità media
- Velocità angolare media
- Turn Angle
- Meander

I trattamenti sono stati confrontati fra di loro tramite MANOVA, Analisi Discriminante, ANOVA e test HSD di Tuckey e Games-Howell per i confronti post-hoc.

E' stata effettuata inoltre una analisi di tipo comportamentale di tipo "scan sampling": in ogni prova venivano registrati i comportamenti aggressivi effettuati nell'intera zona circolare (Tab. 6.1). In queste prove è stato registrato un comportamento peculiare chiamato "minaccia prolungata" in cui l'individuo si mantiene per diverso tempo in stato di minaccia con le mandibole aperte. Tutti i dati sono stati raccolti utilizzando il NOLDUS "The Observer" ® ver. 5.0. I dati ottenuti sono stati confrontati fra di loro utilizzando il test non parametrico Kruskal-Wallis.

Risultati

a) Analisi dei parametri di "attività locomotoria"

Il test MANOVA è risultato significativo ($F=2.744$; $p=0.001$); l'Analisi Discriminante sui parametri considerati individua 3 funzioni discriminanti di cui solo la prima, che spiega il 87.6 % della varianza totale, discrimina significativamente tra i trattamenti (Wilks' $\lambda=0.531$, $\chi^2_{(15)}=43.683$, $p=0.003$) (Fig. 6.11). L'ANOVA ad un criterio di classificazione effettuata sui punteggi discriminati della funzione 1 è risultata essere significativa ($F_{(3,56)}=13.292$, $p<0.001$) e l'analisi post-hoc (Games-Howell) presenta due cluster statisticamente separati; il primo (A) è rappresentato dal trattamento "ghiandola di Dufour" e dal controllo "", mentre il secondo (B) dai trattamenti "ghiandola mandibolare" e "ghiandola del veleno" (Fig. 6.12).

	Funzione 1
Turn Angle	-0.424*
Velocità angolare	-0.059
Meander	-0.069
Velocità media	-0.269*
Distanza percorsa	-0.278*

Tabella 6.2

Matrice di struttura dei parametri registrati con il software "Ethovision" per la specie *F. cunicularia*. * è il parametro che meglio discrimina tra i trattamenti.

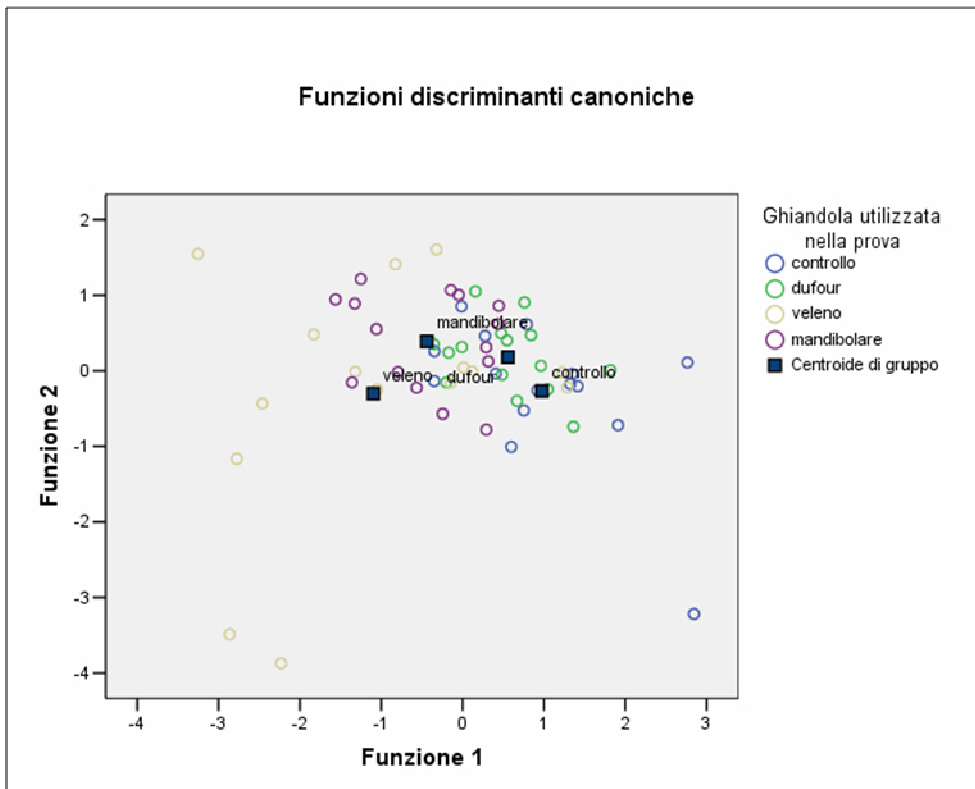


Figura 6.11
 Plot dei punteggi discriminanti dell'Analisi Discriminante effettuata sui parametri registrati con il software "Ethovision" per la specie *F. cunicularia*.

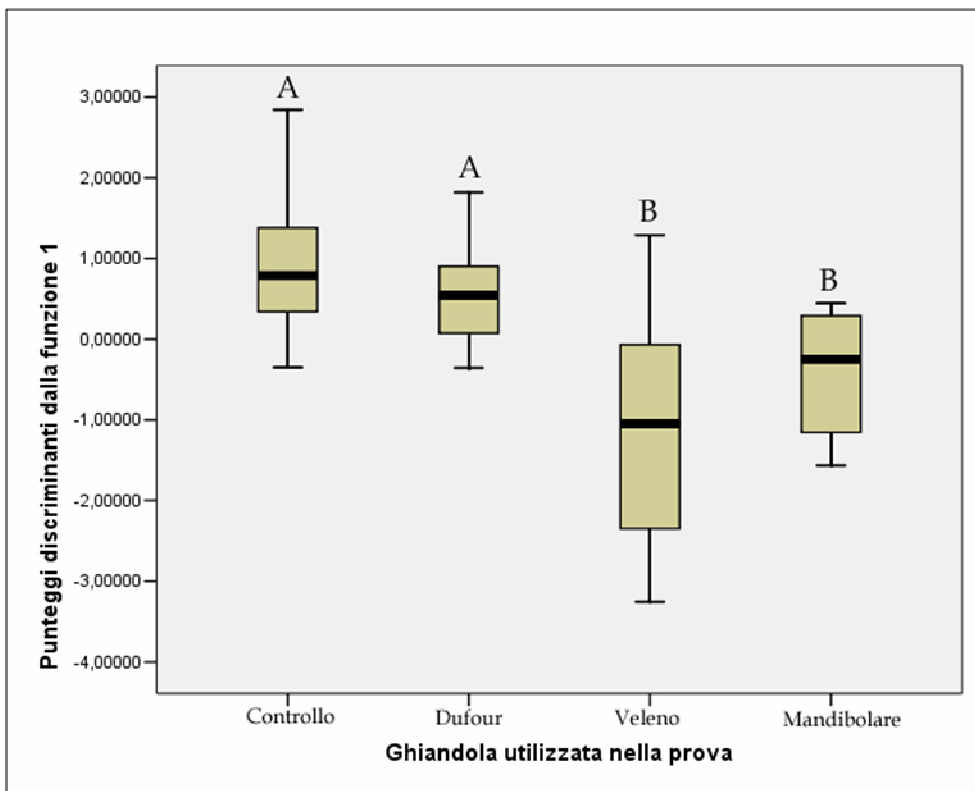


Figura 6.12
 Grafico Box-Plot dei punteggi discriminanti della funzione 1. Si evidenziano i 2 cluster separati: il primo (A) formato dal controllo e dal trattamento "Ghiandola di Dufour", mentre il secondo (B) dai trattamenti "Ghiandola mandibolare" e "Ghiandola del veleno".

Sulla base della matrice di struttura (Tab. 6.2) i parametri che pesano di più nel discriminare tra i trattamenti risultano essere: Turn Angle, Velocità media e Distanza percorsa. Questi parametri sono stati analizzati anche singolarmente con una statistica di

tipo univariata; l'ANOVA ad un criterio di classificazione non è risultata significativa per nessun parametro.

b) Analisi dei display comportamentali

Il test di Kruskal-Wallis effettuato per ogni singolo comportamento osservato (Tab. 6.1) è risultato significativo per i comportamenti di Postura eretta ($\chi^2_{(3)}=41.555$, $p<0.001$), Scatti ($\chi^2_{(3)}=35.992$, $p<0.001$) e Minaccia prolungata ($\chi^2_{(3)}=41.382$, $p<0.001$) mentre non è risultato significativo per i comportamenti di Snapping, Flessione del gastro e Morsi. L'analisi post-hoc effettuata dimostra come i trattamenti "ghiandola mandibolare" e "ghiandola del veleno" (non differenti fra di loro) siano significativamente diversi dal trattamento "ghiandola di Dufour" e dal controllo (non differenti tra di loro); ed in particolare inducono una frequenza maggiore di Postura eretta (Mediana: Controllo: 0.45, Dufour: 0.50, Veleno: 2.50, Mandibolare: 2.50) (Fig. 6.13) e Scatti (Mediana: Controllo: 0.20, Dufour: 0.50, Veleno: 1.70, Mandibolare: 1.45) (Fig. 6.14), e una durata maggiore di Minaccia prolungata (Mediana: Controllo: 2.57, Dufour: 2.90, Veleno: 78.89, Mandibolare: 53.33) (Fig. 6.15).

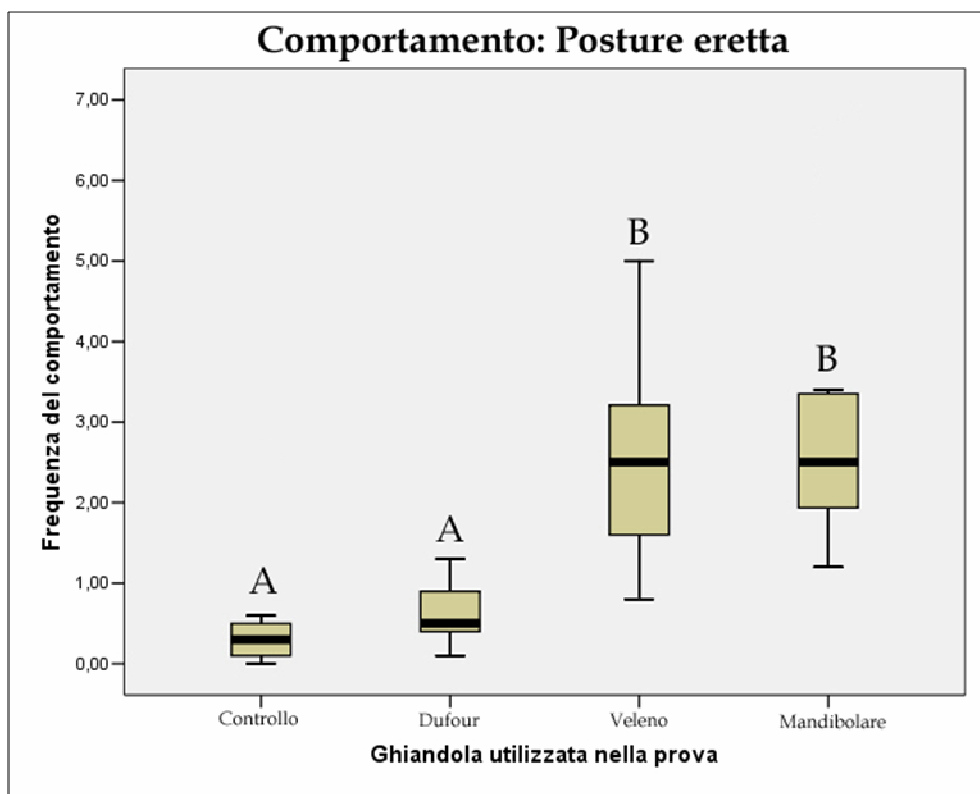


Figura 6.13
Grafico Box-Plot delle frequenze osservate per il comportamento Postura eretta. Le mediane con la stessa lettera non sono statisticamente differenti

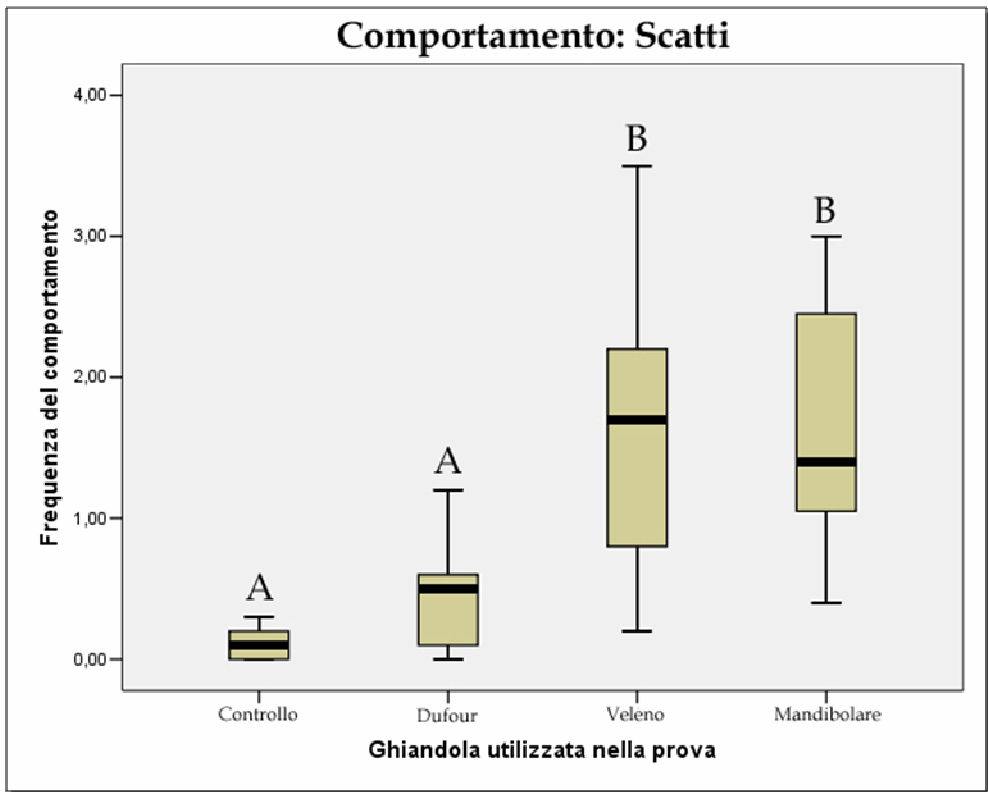


Figura 6.14
 Grafico Box-Plot delle frequenze osservate per il comportamento Scatti. Le mediane con la stessa lettera non sono statisticamente differenti

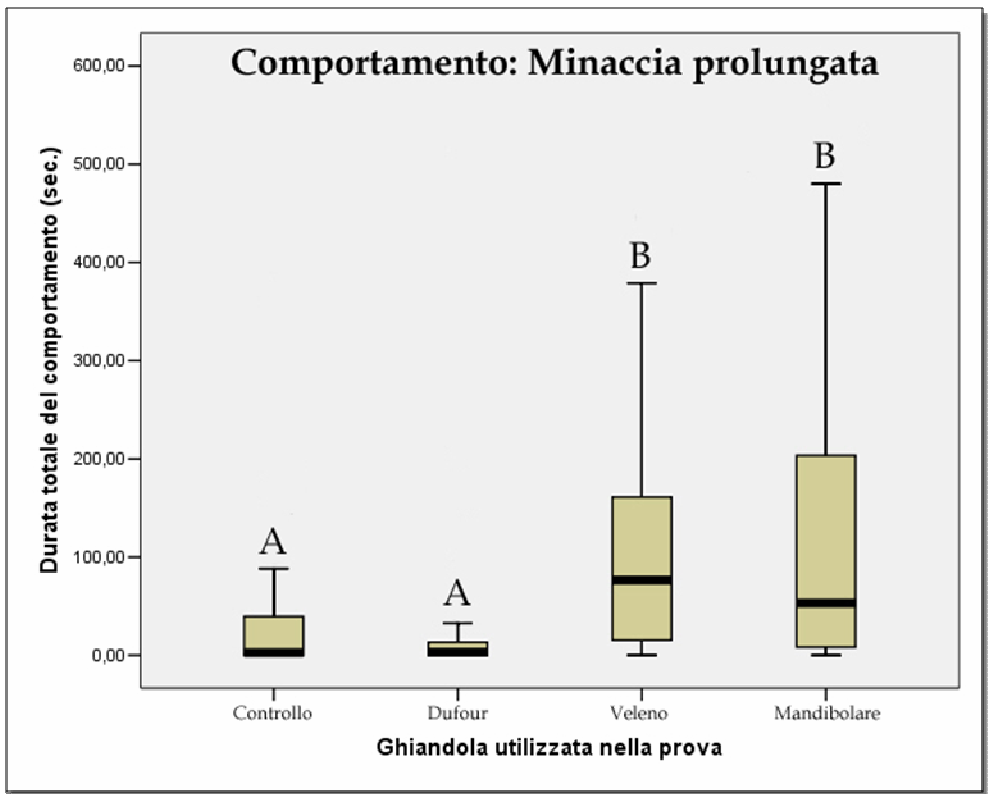


Figura 6.15
 Grafico Box-Plot della durata osservata per il comportamento Minaccia prolungata. Le mediane con la stessa lettera non sono statisticamente differenti

Conclusioni

Come tutte le attività collettive che si svolgono all'interno e all'esterno del nido, anche il comportamento di difesa cooperativa si basa sull'invio di particolari segnali che avvertono le compagne dell'imminenza di un pericolo e, spesso, mediano l'organizzazione di reazioni di risposta. Come per la maggior parte dei comportamenti espressi dalle formiche, anche le risposte comportamentali alle fonti di disturbo sono principalmente mediate da segnali chimici prodotti dalle numerose ghiandole esocrine presenti nel loro corpo (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990; BILLEN e MORGAN, 1998). Questi segnali permettono di organizzare una difesa collettiva dal momento che, in un breve lasso di tempo, un solo individuo emettitore può informare più individui di un potenziale pericolo, mobilitandoli verso un particolare settore dello spazio in modo da rendere il più efficace possibile la risposta difensiva. La difesa di gruppo nelle formiche è resa, quindi, possibile da fenomeni di comunicazione di allarme su base chimica. I feromoni di allarme sono, in genere, sostanze chimiche dalla natura estremamente volatile e vengono prodotti da una o più ghiandole esocrine (in successione o contemporaneamente) (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990). Le risposte comportamentali evocate dai feromoni di allarme possono essere varie e anche molto complesse. Si va da uno stato di allerta accompagnato da un aumento dell'attività locomotoria con fuga dalla sorgente dello stimolo oppure attrazione verso questa, fino alla manifestazione di comportamenti aggressivi aperti (morsi o emissione di sostanze difensive) (BUSCHINGER e MASCHWITZ, 1984).

Questa parte di lavoro è stata focalizzata sullo studio della comunicazione di allarme della specie *F. cunicularia*, con particolare riguardo alla individuazione delle sorgenti ghiandolari dei feromoni di allarme ed allo studio delle risposte comportamentali che questi segnali evocano (quando percepiti nei pressi dell'ingresso del nido) in un frammento di colonia e successivamente in singoli individui.

I risultati del primo set sperimentale hanno dimostrato che il contenuto della ghiandola mandibolare ha un ruolo chiave nella fuoriuscita delle formiche dal nido e nel loro reclutamento nei pressi dell'area dello stimolo. Il secreto di tale ghiandola è stato l'unico ad indurre tali comportamenti in modo significativo e nessuna reazione rilevante è stata osservata per gli estratti delle altre ghiandole, neppure per quello del capo privato delle mandibole e ghiandole annesse, utilizzato come controprova per escludere

definitivamente il coinvolgimento di altre ghiandole cefaliche. Il secreto della ghiandola mandibolare è stato inoltre l'unico ad evocare in modo significativo alcuni comportamenti propri della reazione di allarme e della difesa di gruppo: "movimento a scatti", "snapping" e "minaccia". Sebbene in percentuale non significativa (ma prossimo al livello di significatività), il secreto della ghiandola mandibolare ha anche indotto una certa quantità di morsi (massima espressione dell'aggressione aperta in queste formiche) sul pezzo di carta sperimentale. Il mancato raggiungimento della significatività in questo caso potrebbe essere dovuto all'assenza di un oggetto appropriato su cui riversare l'attacco. Ciò è in accordo con altri studi che hanno evidenziato che pur in presenza di uno stimolo allarmante molto forte (il secreto della ghiandola mandibolare), la mancanza di un oggetto nei pressi dello stimolo non permette la completa espressione del comportamento (morsi) (WILSON, 1958; DUFFIELD *et al.*, 1977; BLUM *et al.*, 1968).

Nel secondo set sperimentale l'analisi focalizzata su singoli individui ha permesso di osservare il comportamento di una sola operaia non influenzata da quello delle compagne di nido che, una volta allertate, possono emettere degli ulteriori segnali di allarme. I risultati hanno confermato il ruolo del secreto della ghiandola mandibolare nell'evocare i comportamenti riconducibili alla reazione di allarme ed alla difesa di gruppo; hanno inoltre dimostrato il coinvolgimento del secreto della ghiandola del veleno in tale fenomeno. Il secreto di tali ghiandole induce un forte stato di agitazione, dimostrato dall'aumento dei parametri di velocità di movimento e di distanza percorsa, accompagnato da una intensa attività esplorativa, dimostrata dall'aumento del parametro di Turn Angle (parametro che esprime il cambiamento di direzione di un movimento). Dall'analisi dei moduli comportamentali si vede come anche in questo caso i secreti della ghiandola mandibolare e della ghiandola del veleno inducono comportamenti aggressivi tipici della difesa come la "postura eretta", i "movimenti a scatti" e lo "stato di minaccia a mandibole aperte". La principale e originaria funzione della ghiandola del veleno è quella di sorgente di sostanze difensive/offensive con attività neurotossica (nel caso di *Formica cunicularia* l'acido formico) capaci di respingere il nemico. In questa specie il secreto di tale ghiandola sembra avere assunto, tramite un processo di "ritualizzazione", anche un ruolo comunicativo (BLUM, 1985; HÖLLDOBLER e WILSON, 1990; BILLEN e MORGAN, 1998). In particolare la reazione di allarme evocata potrebbe avere una importante funzione nel suscitare allerta nei riceventi e indurre un aumento di agitazione allo scopo di rendere più efficace la risposta di difesa della colonia. Inoltre, diversamente dalle altre specie

appartenenti alla sottofamiglia delle *Formicinae* (PARRY e MORGAN, 1979) ed in particolare dalle altre specie appartenenti al genere *Formica* (MASCHWITZ, 1964), questi risultati sembrano escludere il coinvolgimento della ghiandola di Dufour nel contesto della comunicazione di allarme della specie *F. cunicularia*.

In conclusione, dai dati ottenuti si può descrivere la comunicazione di allarme in *F. cunicularia* come una comunicazione basata su feromoni prodotti a livello di più sorgenti ghiandolari (multisource alarm pheromon communication) (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990). In particolare il secreto della ghiandola mandibolare sembra essere coinvolto nelle fasi iniziali della reazione di allarme, provocando l'uscita delle operaie dal nido e l'attrazione verso la fonte dello stimolo, mentre il secreto della ghiandola del veleno sembra esserne coinvolto in una fase successiva, quando la fonte di pericolo è già stata individuata e permetterebbe di mantenere alto e prolungato nel tempo lo stato di agitazione proprio di questa reazione difensiva.

Capitolo 8

**INDIVIDUAZIONE DELLE SORGENTI
GHANDOLARI DEI FEROMONI DI
ALLARME IN *Formica rufibarbis*
(HYMENOPTERA, FORMICIDAE)**

Materiali e Metodi

a) Apparato sperimentale

Durante il periodo estivo 2005 sono state raccolte in natura frammenti di colonie diverse (operaie, bozzoli, larve e pupe) della specie *F. rufibarbis*. I frammenti sono stati successivamente alloggiati in contenitori di vetro con terra e materiale organico proveniente dal nido d'origine in modo da garantire condizioni di vita del tutto simili a quelle naturali. Le colonie così allestite sono state mantenute in laboratorio in condizioni controllate di temperatura (26-28 °C) e di umidità (50-60 %). Il periodo di luce giornaliera era costante di 12 ore. Ogni frammento è stato alimentato fornendo acqua, miele e frammenti di insetti.

Per questo esperimento sono state allestite 10 arene contenenti ciascuna 50 operaie e 10 bozzoli. Le arene erano costituite da una base rigida in PVC di 37x25 cm, sopra la quale era stata fissata una struttura in gesso di forma ovale (34.5x24 cm) alta 2 cm. La nicchia di nidificazione (6x7 cm) era ricavata nel gesso e chiusa da un coperchio in plastica trasparente e da un foglio lucido rosso delle stesse dimensioni in modo da permettere la visione dell'interno della nicchia e allo stesso tempo di mantenere gli individui in condizione di penombra. Il resto dell'arena costituiva l'area di foraggiamento a cui le operaie potevano accedere liberamente. Ogni giorno le operaie morte erano sostituite in modo tale da mantenere costante il numero di individui per ogni arena.

Allo scopo di individuare le sorgenti ghiandolari dei feromoni di allarme sono stati saggiati estratti delle più importanti strutture secernenti dell'intera formica:

- Ghiandola Mandibolare
- Ghiandola del Veleno
- Ghiandola di Dufour
- Sacco Rettale
- Capo in toto (privato delle ghiandole mandibolare)

L'estrazione del contenuto ghiandolare è stato effettuata tramite solvente (esano): ogni ghiandola estratta da un individuo era messa in un vial in modo tale da mantenere una concentrazione costante di una ghiandola per 10 µl di solvente. In questo modo 10 µl di estratto corrispondevano ad un individuo-equivalente (nel caso della ghiandola mandibolare, che è una struttura pari, la concentrazione era di 2 ghiandole ogni 10 µl). Il procedimento di estrazione era lasciato avvenire per almeno 24 ore. Gli estratti così ottenuti sono stati saggiati nell'apparato descritto.

b) Protocollo sperimentale

10 µl di soluzione ghiandolare erano iniettati su di un pezzo di carta filtro e lasciati adsorbire. Questo era poi posizionato con uno spillo metallico al centro di una zona circolare ($r = 3$ cm) nell'area di foraggiamento dell'arena a circa 5 cm di distanza dall'ingresso della nicchia di nidificazione. Il solo pezzo di carta da filtro è stato usato come controllo. L'arena sperimentale era poi suddivisa in 3 zone diverse (Fig. 7.1):

- **Zona A:** nido o nicchia di nidificazione
- **Zona B:** area circolare dove era posizionato lo stimolo
- **Zona C:** resto dell'arena (area di foraggiamento)

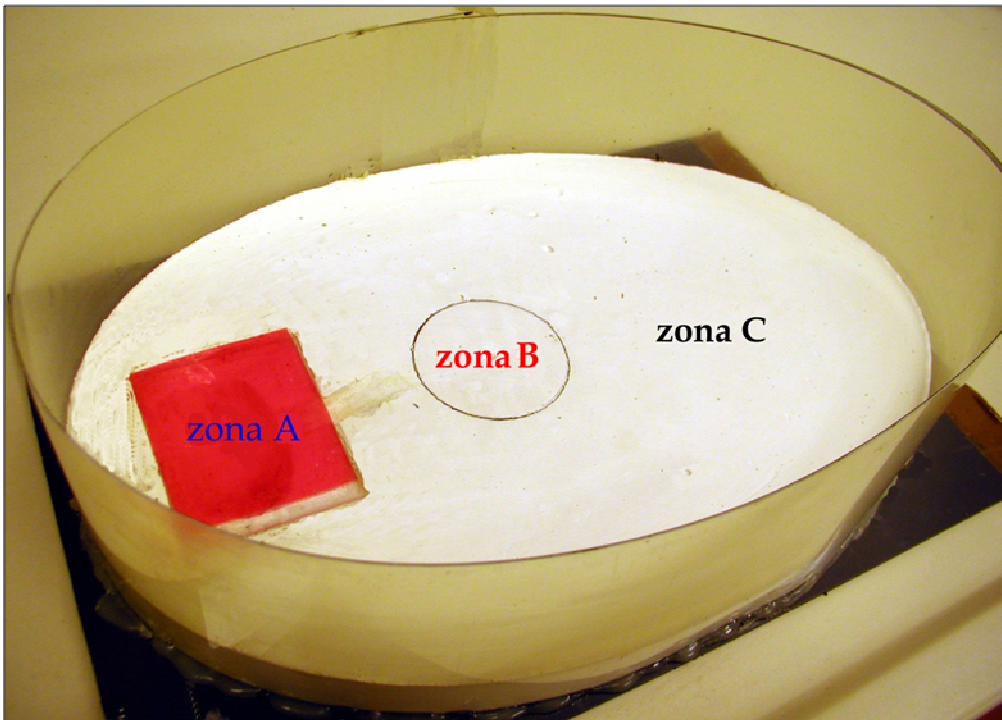


Figura 7.1

Arena sperimentale in cui si distinguono le tre zone: la nicchia di nidificazione (Zona B), l'area dello stimolo (Zona A) e l'area di foraggiamento (Zona C).

Ogni stimolo è stato presentato solo una volta per ogni arena. In totale sono state effettuate 60 prove. Il tempo sperimentale di osservazione era di 10 minuti suddiviso in 20 intervalli da 30" ciascuno.

c) Parametri analizzati

In questi esperimenti sono stati registrati diversi parametri allo scopo di descrivere sia il movimento delle operaie nello spazio, sia il tipo di comportamenti effettuati in risposta allo stimolo presentato. Durante il tempo sperimentale alla fine di ogni intervallo sono stati registrati i seguenti parametri di "attività locomotoria":

1. Numero di formiche uscite dalla zona A;
2. Numero di formiche presenti nella zona B;
3. Numero totale di formiche all'esterno del nido (B + C);
4. Numero di formiche entrate nella zona B.

I dati ottenuti sono stati analizzati statisticamente utilizzando il software di analisi statistica SPSS® (ver. 13.0). I trattamenti sono stati confrontati fra di loro tramite

MANOVA, Analisi Discriminante, ANOVA ed i test HSD di Tuckey e Games-Howell per i confronti post-hoc.

Parallelamente è stata effettuata anche una analisi di tipo comportamentale di tipo “scan sampling”: in ogni prova venivano registrati i principali comportamenti aggressivi (Tab. 7.1) effettuati nella zona B (area dello stimolo) da parte di ogni formica presente nella zona. Tutti i dati sono stati raccolti utilizzando il software NOLDUS “The Observer” ® ver. 5.0, specifico per analisi etologiche. I dati ottenuti sono stati confrontati fra di loro utilizzando il test non parametrico Kruskal-Wallis.

Postura Eretta	Postura di allerta in cui l'individuo si solleva sulle zampe anteriori mantenendo le antenne dritte e rivolte in avanti
Scatti	Movimenti brevi e rapidi (a scatto) generalmente effettuati in avanti o lateralmente con tutto il corpo
Minaccia	Apertura evidente delle mandibole
Flessione del Gastro	Flessione in avanti del gastro tra le zampe posteriori come nell'atto di spruzzare (a volte è accompagnato dall'emissione del secreto di ghiandole addominali)
Chiusura delle mandibole (Snapping)	Schioccamento delle mandibole, chiusura repentina delle mandibole come nell'atto di mordere (morsi a vuoto)
Morsi	Morsi che possono essere portati a termine o meno su un oggetto

Tabella 7.1

Principali comportamenti aggressivi osservati nella zona circolare dove veniva posizionato lo stimolo (Zona A)

Risultati

a) Analisi dei parametri di "attività locomotoria"

Il test MANOVA è risultato significativo ($F=1.858$; $p<0.001$); l'Analisi Discriminante sui parametri considerati individua 4 funzioni discriminanti di cui solo la prima, che spiega il 69.9 % della varianza totale, discrimina significativamente tra i trattamenti (Wilks' $\lambda=0.604$, $\chi^2_{(20)}=33.316$, $p<0.001$) (Fig. 7.2). L'ANOVA ad un criterio di classificazione effettuata sui punteggi discriminati della funzione 1 è risultata essere significativa ($F_{(5,66)}=5.331$, $p<0.001$) e l'analisi post-hoc (Games-Howell) presenta due cluster statisticamente separati; il primo (**B**, Fig. 7.3) è rappresentato dal solo trattamento "ghiandola mandibolare" e il secondo (**A**, Fig. 7.3) da tutti gli altri trattamenti ed il controllo.

	Funzione 1
Numero di formiche presenti nella zona B	0.619*
Numero totale di formiche all'esterno del nido	0.237
Numero di formiche entrate nella zona B	0.648*
Numero di formiche uscite dalla zona A	0.296

Tabella 7.2
Matrice di struttura dei parametri di "attività locomotoria" per la specie *F. rufibarbis*. * è il parametro che meglio discrimina tra i trattamenti.

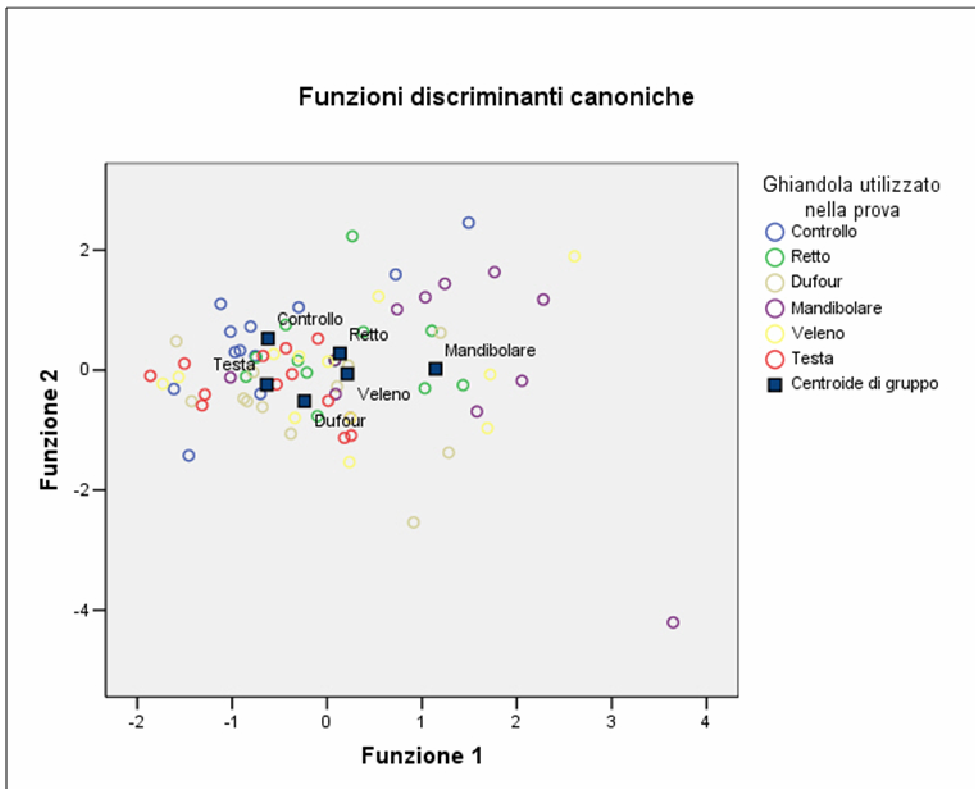


Figura 7.2
 Plot dei punteggi discriminanti dell'Analisi Discriminante effettuata sui parametri di "Attività locomotoria" della specie *F. rufibarbis*.

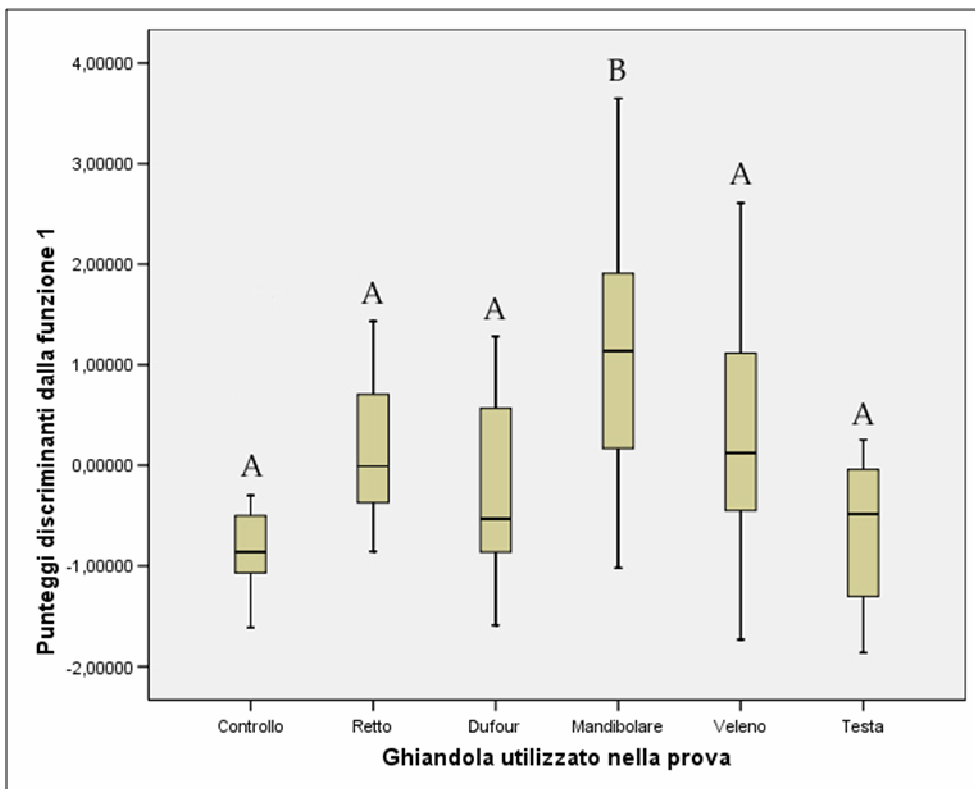


Figura 7.3
 Grafico Box-Plot dei punteggi discriminanti della funzione 1. Si evidenziano i 2 cluster separati: il primo (B) formato dal solo trattamento "Ghiandola mandibolare", mentre il secondo (A) da tutti gli altri trattamenti e dal controllo.

Sulla base della matrice di struttura (Tab. 7.2) i parametri che pesano di più nel discriminare tra i trattamenti risultano essere Numero di formiche presenti nella zona B e Numero di formiche entrate nella zona B. Questi parametri sono stati analizzati

singolarmente con una statistica di tipo univariata; l'ANOVA ad un criterio di classificazione è risultata significativa per entrambi i parametri:

- Numero di formiche entrate nella zona B ($F_{(5,66)}=2.464, p=0.042$)
- Numero di formiche presenti nella zona B ($F_{(5,66)}=3.39, p=0.047$)

L'analisi post-hoc dimostra come il trattamento "ghiandola mandibolare" sia significativamente diverso da tutti gli altri trattamenti, ed in particolare è associato ad un numero maggiore di entrate nella zona dello stimolo (Media \pm E.S.: Controllo: 33.0 ± 7.7 ; Retto 43.8 ± 10.2 ; Dufour 47.3 ± 12.8 ; Mandibolare 75.2 ± 12.9 ; Veleno 51.3 ± 11.1 ; Testa 28.8 ± 7.0) (Fig. 7.4) ed una maggiore presenza di formiche nella zona B (area dello stimolo) (Controllo: 3.0 ± 0.7 ; Retto 3.3 ± 0.6 ; Dufour 2.4 ± 0.8 ; Mandibolare 5.1 ± 0.8 ; Veleno 3.3 ± 1.0 ; Testa 1.6 ± 0.4) (Fig. 7.5). Anche l'ANOVA sul parametro Numero di formiche uscite dalla zona A è risultata significativa ($F_{(5,66)}=2.679, p=0.049$) e anche in questo caso il trattamento "ghiandola mandibolare" è diverso da tutti gli altri trattamenti, inducendo in particolare un aumento delle formiche uscite dal nido (Controllo: 17.0 ± 3.9 ; Retto 16.8 ± 3.5 ; Dufour 17.3 ± 4.7 ; Mandibolare 28.6 ± 3.6 ; Veleno 18.3 ± 4.9 ; Testa 13.0 ± 3.3) (Fig. 7.6).

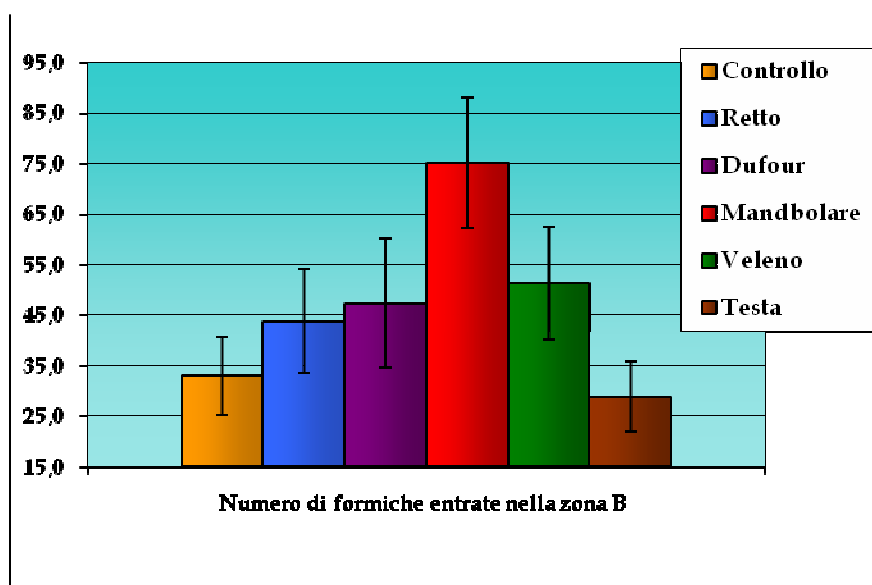


Figura 7.4
Numero di operaie di *F. rufibarbis* entrate nella zona B: gli istogrammi rappresentano la media, le barre rappresentano l'Errore Standard.

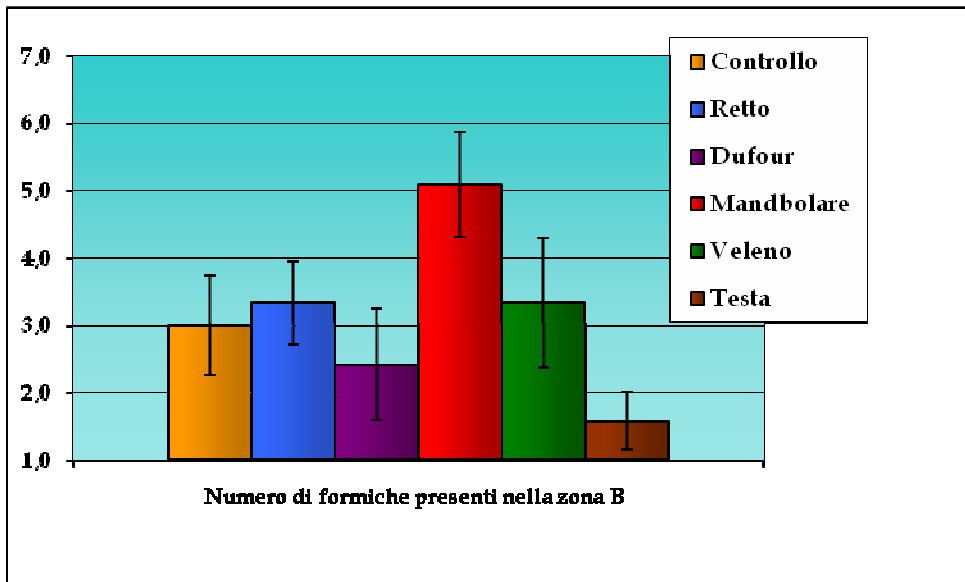


Figura 7.5
 Numero di operaie di *F. rufibarbis* presenti nella zona B: gli istogrammi rappresentano la media, le barre rappresentano l'Errore Standard.

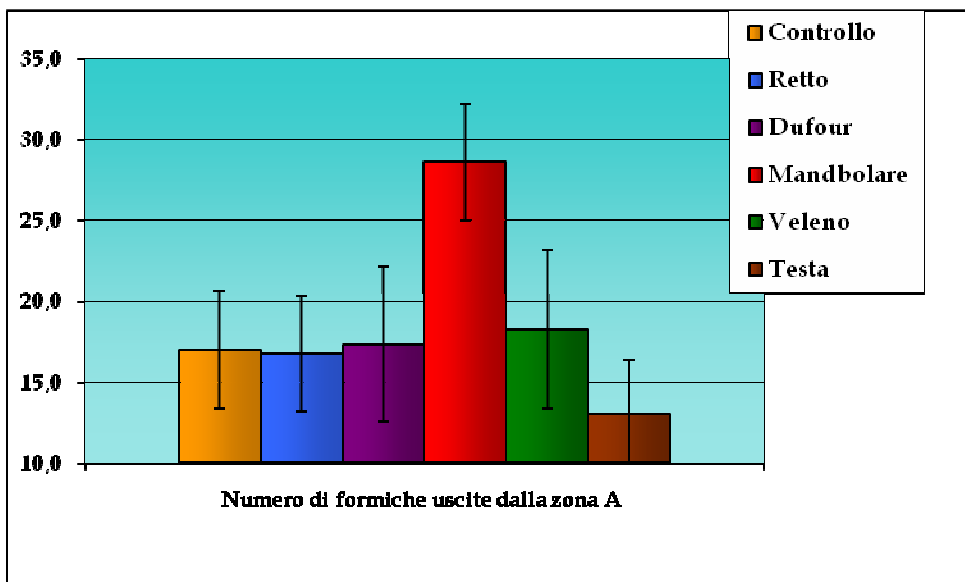


Figura 7.6
 Numero di operaie di *F. rufibarbis* uscite dalla zona A: gli istogrammi rappresentano la media, le barre rappresentano l'Errore Standard.

b) Analisi dei display comportamentali

Il test di Kruskal-Wallis effettuato per ogni singolo comportamento osservato (Tab 7.1) non è risultato significativo per nessuno dei comportamenti analizzati anche se tendenze di significatività sono state osservate per i comportamenti di “postura eretta”, “movimenti a scatti” e “minaccia”. Per verificare la presenza (a livello di aggressività generale) di differenze nella reazione generale provocata è stato allora calcolato l'Indice di aggressività (cfr. pag. 59) ed analizzato con il test di Kruskal-Wallis. Questo è risultato significativo ($\chi^2_{(5)}=10.795$, $p=0.05$) e l'analisi post-hoc effettuata dimostra come il trattamento “ghiandola mandibolare” sia significativamente diverso da tutti gli altri

trattamenti. In particolare induce un aumento dell'Indice di Aggressività se paragonato a tutti gli altri trattamenti ed il controllo, i quali tra loro non sono significativamente differenti (Mediana \pm D.S.: Controllo: 0.13 ± 0.08 ; Retto 0.19 ± 0.10 ; Dufour 0.13 ± 0.05 ; Mandibolare 0.37 ± 0.12 ; Veleno 0.09 ± 0.04 ; Testa 0.11 ± 0.06) (Fig. 7.7).

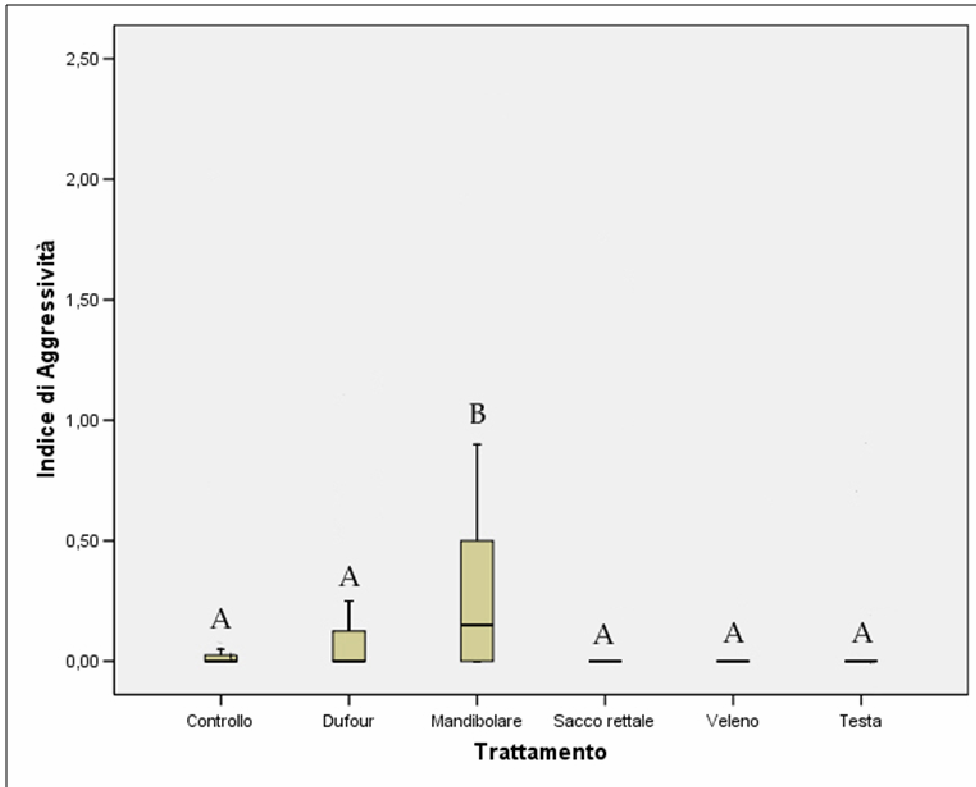


Figura 7.7
Grafico Box-Plot dell'Indice di Aggressività in *F. rufibarbis* calcolato per ogni trattamento. Le mediane con la stessa lettera non sono statisticamente differenti

Materiali e Metodi

a) Apparato sperimentale

Durante il periodo estivo 2006 sono state raccolte in natura frammenti di colonie diverse (operaie, bozzoli, larve e pupe) della specie *F. rufibarbis*. I frammenti sono stati successivamente alloggiati in contenitori di vetro con terra e materiale organico proveniente dal nido d'origine in modo da garantire condizioni di vita del tutto simili a quelle naturali. Le colonie così allestite sono state mantenute in laboratorio in condizioni controllate di temperatura (26-28 °C) e di umidità (50-60 %). Il periodo di luce giornaliera era costante di 12 ore. Ogni frammento è stato alimentato fornendo acqua, miele e frammenti di insetti.

Per questo esperimento sono state allestite 8 arene contenenti ognuna 250 operaie ciascuna. Le arene erano formate da un contenitore a base rettangolare (11x21x12 cm) coperte con il proprio coperchio in modo da non permettere alla luce di penetrare. Il coperchio presentava inoltre due fori rettangolari dotati di una apposita griglia in modo da fare passare arie ma non luce. Questa parte dell'apparato costituiva la parte interna del nido. Un tubo di plastica trasparente collegava la parte interna con una parte esterna del nido (area di foraggiamento) formata da un contenitore in plastica a base circolare dal diametro di 20 cm (Fig. 7.8). Il tubo di plastica trasparente era dotato di un sistema a doppia paratia che regolava l'ingresso delle formiche nella parte esterna dell'apparato (Fig. 7.9). Anche in questo caso ogni giorno le operaie morte erano sostituite in modo tale da mantenere costante il numero di individui per ogni arena.

In questa serie di esperimenti solo le tre principali ghiandole esocrine (Ghiandola mandibolare, Ghiandola di Dufour e Ghiandola del veleno), potenzialmente coinvolte nella comunicazione di allarme, sono state saggiate allo scopo di meglio caratterizzare questo fenomeno. Le ghiandole, estratte direttamente da individui provenienti dalla stessa colonia, erano schiacciate su di un pezzo di carta da filtro e posizionate al centro della parte circolare dell'arena (la parte esterna del nido). A questo punto era permesso ad una

sola operaia di entrare nell'area di foraggiamento e si dava inizio alla prova. Il solo pezzo di carta da filtro era utilizzato come trattamento di controllo. Ogni trattamento, presentato in ordine random, è stato testato su 15 formiche differenti. In totale sono state effettuate 60 prove. Il tempo sperimentale era di 10 minuti.

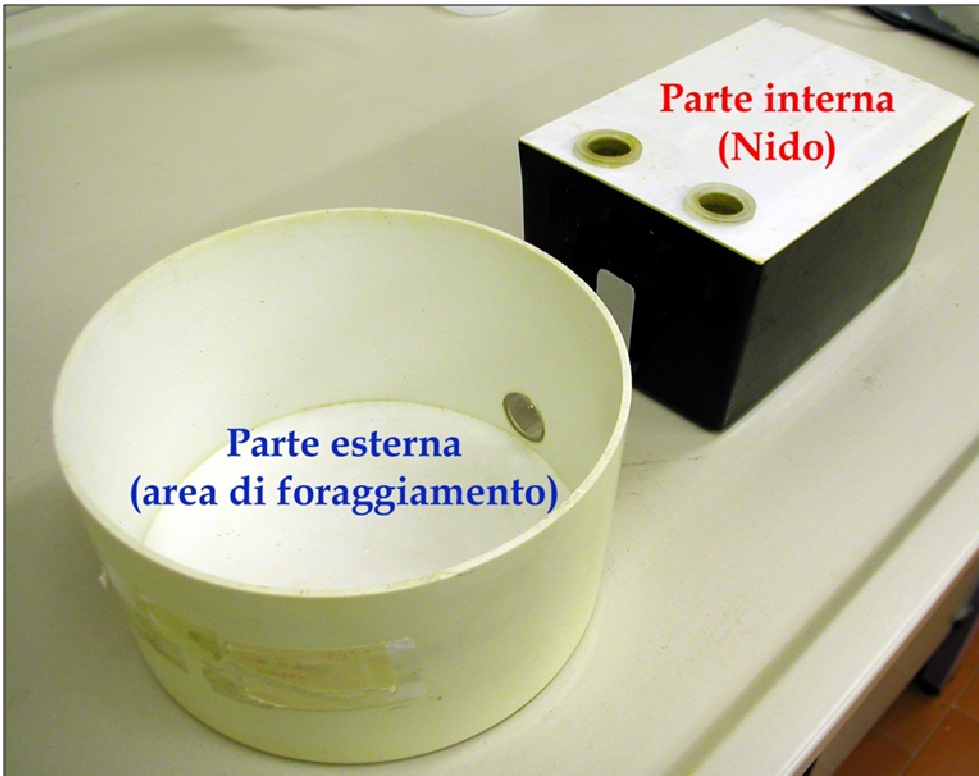


Figura 7.8
Apparato sperimentale in cui si distinguono le due zone principali: la parte interna (Nido) e la parte esterna (Area di foraggiamento)

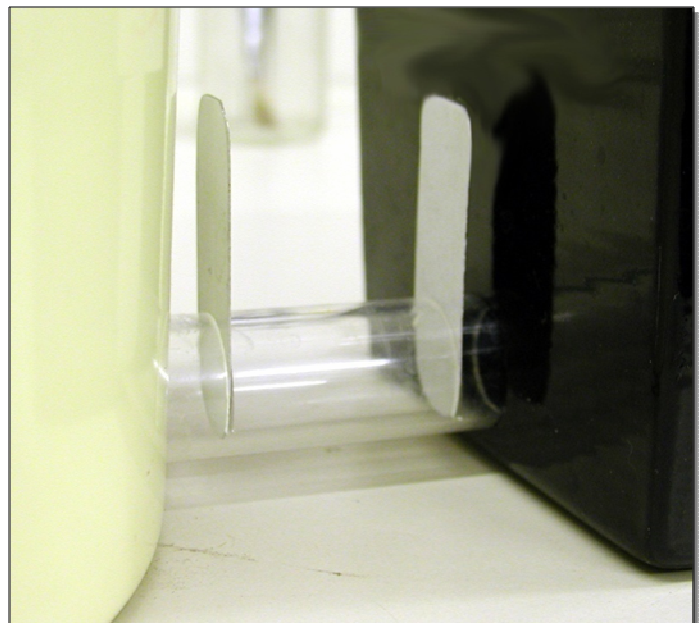


Figura 7.9
Particolare dell'apparato sperimentale in cui si vede il tubo di plastica trasparente e le due paratie che regolavano il flusso delle formiche verso la parte esterna.

b) Parametri analizzati

In questi esperimenti sono stati registrati diversi parametri allo scopo di descrivere sia il movimento delle operaie nello spazio dell'arena sperimentale, sia il tipo di comportamenti effettuati in risposta allo stimolo presentato. Durante il tempo sperimentale sono stati registrati i seguenti parametri di "attività locomotoria" utilizzando il software per analisi etologiche NOLDUS "Ethovision Pro" ® ver. 2.1.6:

- Distanza percorsa
- Velocità media
- Velocità angolare media
- Turn Angle
- Meander

I trattamenti sono stati confrontati fra di loro tramite MANOVA, Analisi Discriminante, ANOVA ed i test HSD di Tuckey e Games-Howell per i confronti post-hoc.

E' stata effettuata inoltre una analisi di tipo comportamentale di tipo "scan sampling": in ogni prova venivano registrati i comportamenti aggressivi effettuati nell'intera zona circolare (Tab. 7.1). In queste prove è stato registrato un comportamento peculiare chiamato "minaccia prolungata" in cui l'individuo si mantiene per diverso tempo in stato di minaccia a mandibole aperte. Tutti i dati sono stati raccolti utilizzando il NOLDUS "The Observer" ® ver. 5.0. I dati ottenuti sono stati confrontati fra di loro utilizzando il test non parametrico Kruskall-Wallis.

Risultati

a) Analisi dei parametri di "attività locomotoria"

Il test MANOVA è risultato significativo ($F_{(15)}=3.429$; $p<0.001$); l'Analisi Discriminante sui parametri considerati individua 3 funzioni discriminanti di cui solo la prima, che spiega il 87.6 % della varianza totale, discrimina significativamente tra i trattamenti (Wilks' $\lambda=0.333$, $\chi^2_{(15)}=54.362$, $p<0.001$) (Fig. 7.10). L'ANOVA ad un criterio di classificazione effettuata sui punteggi discriminati della funzione 1 è risultata essere significativa ($F_{(3,51)}=24.979$, $p<0.001$) e l'analisi post-hoc (Games-Howell) presenta tre cluster statisticamente separati; il primo (**A**, Fig. 7.11) è rappresentato dal trattamento "ghiandola di Dufour" e dal controllo, il secondo (**B**, Fig. 7.11) dal trattamento "ghiandola del veleno" ed il terzo (**C**, Fig. 7.11) dal trattamento "ghiandola mandibolare".

	Funzione 1
Turn Angle	0.330*
Velocità angolare	0.454*
Meander	0.039
Velocità media	0.465*
Distanza percorsa	0.338*

Tabella 7.3

Matrice di struttura dei parametri registrati con il software "Ethovision" per la specie *F. rufibarbis*. * è il parametro che meglio discrimina tra i trattamenti.

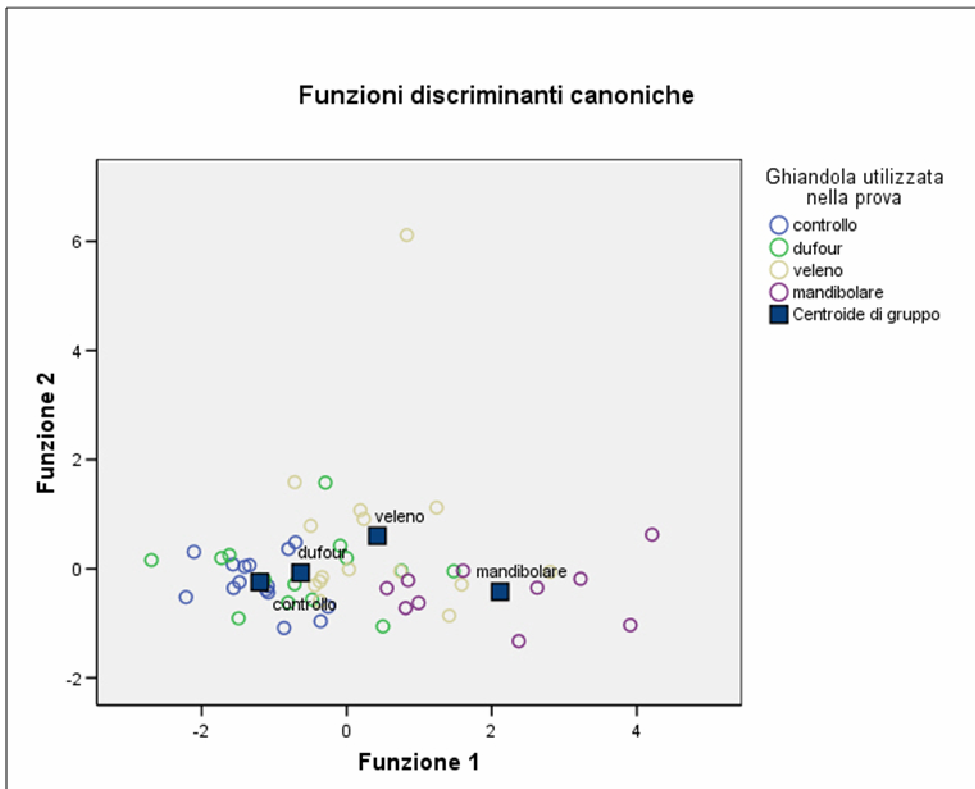


Figura 7.10
 Plot dei punteggi discriminanti dell'Analisi Discriminante effettuata sui parametri registrati con il software "Ethovision" per la specie *F. rufibarbis*.

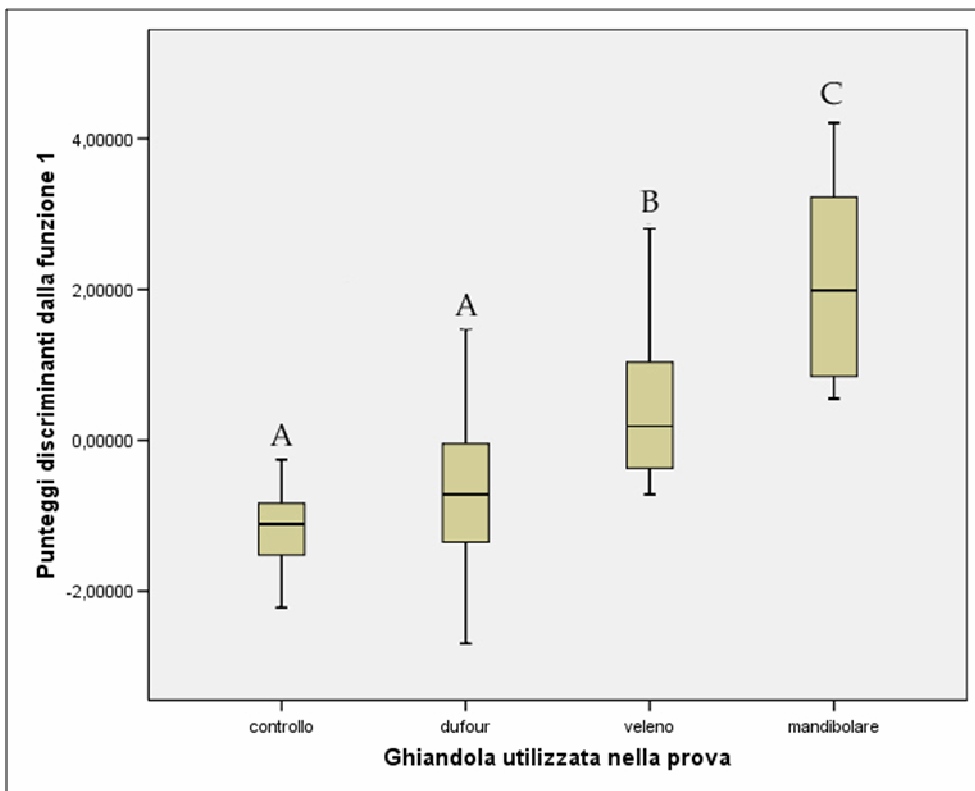


Figura 7.11
 Grafico Box-Plot dei punteggi discriminanti della funzione 1. Si evidenziano i 3 cluster separati: il primo (A) formato dal controllo e dal trattamento "Ghiandola di Dufour, il secondo (B) dal trattamento "Ghiandola del veleno" ed il terzo (C) dal trattamento "Ghiandola mandibolare".

Sulla base della matrice di struttura (Tab. 7.3) i parametri che pesano di più nel discriminare tra i trattamenti risultano essere: Velocità media, Distanza percorsa, Turn Angle e Velocità angolare. Questi parametri sono stati analizzati singolarmente con una

statistica di tipo univariata; l'ANOVA ad un criterio di classificazione è risultata significativa per tutti i parametri:

- Velocità media ($F_{(3,51)}=5.912, p=0.002$)
- Distanza percorsa ($F_{(3,51)}=2.918, p=0.043$)
- Turn angle ($F_{(3,51)}=3.919, p=0.014$)
- Velocità angolare ($F_{(3,51)}=6.043, p=0.001$)

L'analisi post-hoc per il parametro "Velocità media" dimostra come il trattamento "ghiandola mandibolare" induca un aumento della velocità media rispetto a tutti gli altri trattamenti che tra loro non sono differenti (Media \pm E.S.: Controllo: 2.9 ± 0.2 ; Dufour: 2.9 ± 0.2 ; Mandibolare 4.5 ± 0.4 ; Veleno 3.3 ± 0.9) (Fig. 7.12). L'analisi post-hoc per gli altri parametri dimostra come i trattamenti "ghiandola mandibolare" e "ghiandola del veleno" (non differenti fra di loro) siano significativamente diversi dal trattamento "ghiandola di Dufour" e dal controllo (non differenti tra di loro) In particolare i primi due trattamenti inducono un aumento distanza percorsa (Media \pm E.S.: Controllo: 1052.6 ± 96.2 ; Dufour: 1096.1 ± 110.5 ; Mandibolare 1593.9 ± 0.4 ; Veleno 1279.3 ± 123.3) (Fig. 7.13), della velocità angolare (Media \pm E.S.: Controllo: 129.8 ± 7.0 ; Dufour: 159.3 ± 13.8 ; Mandibolare 201.6 ± 10.8 ; Veleno 188.5 ± 15.9) (Fig. 7.14) e del turn angle (Media \pm E.S.: Controllo: 28.1 ± 1.8 ; Dufour: 35.3 ± 3.7 ; Mandibolare 42.4 ± 2.3 ; Veleno 43.2 ± 4.8) (Fig. 7.15).

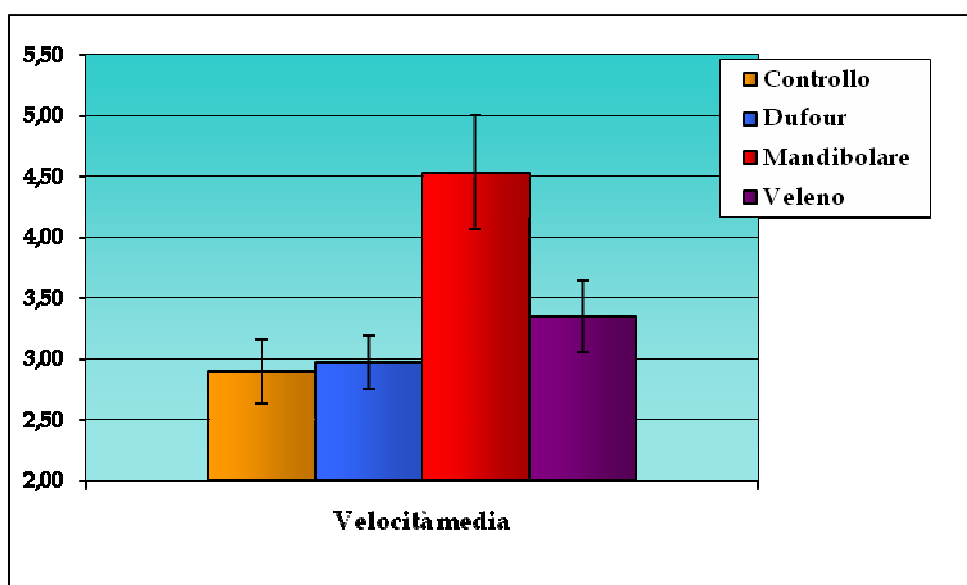


Figura 7.12
Velocità media espressa dalle operaie di *F. rufibarbis*: gli istogrammi rappresentano la media, le barre rappresentano l'Errore Standard.

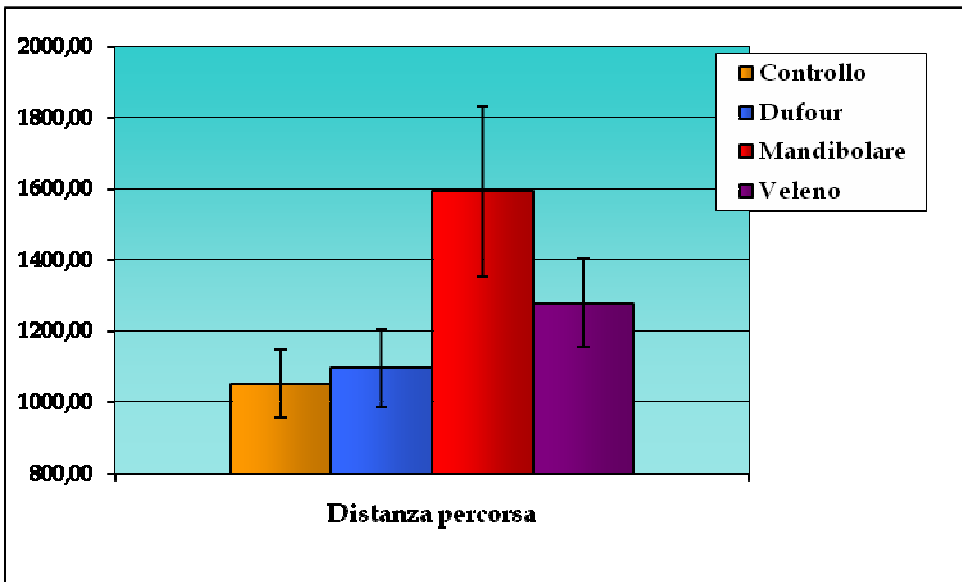


Figura 7.13
Distanza percorsa dalle operaie di *F. rufibarbis*: gli istogrammi rappresentano la media, le barre rappresentano l'Errore Standard.

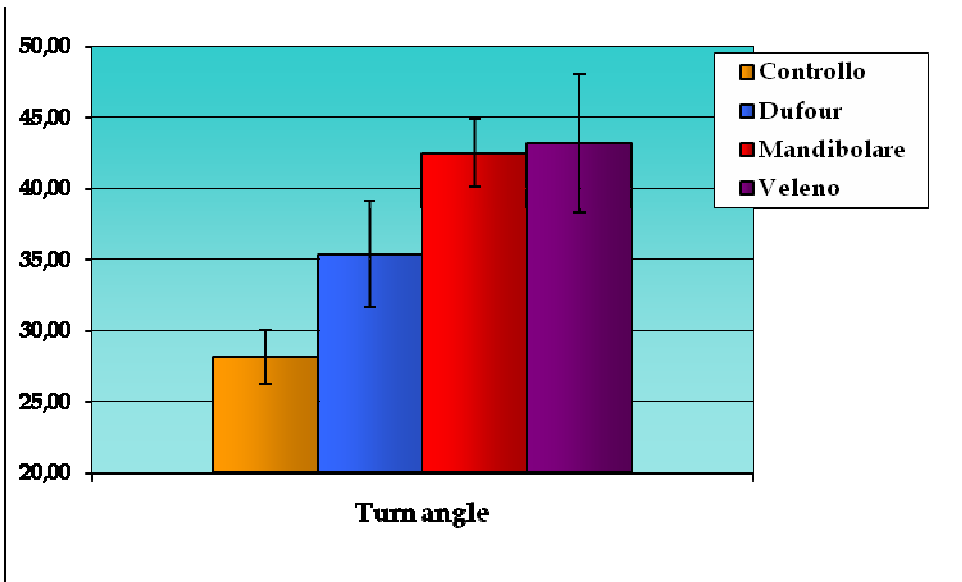


Figura 7.14
Valore medio di Turn angle espresso dalle operaie di *F. rufibarbis*: gli istogrammi rappresentano la media, le barre rappresentano l'Errore Standard.

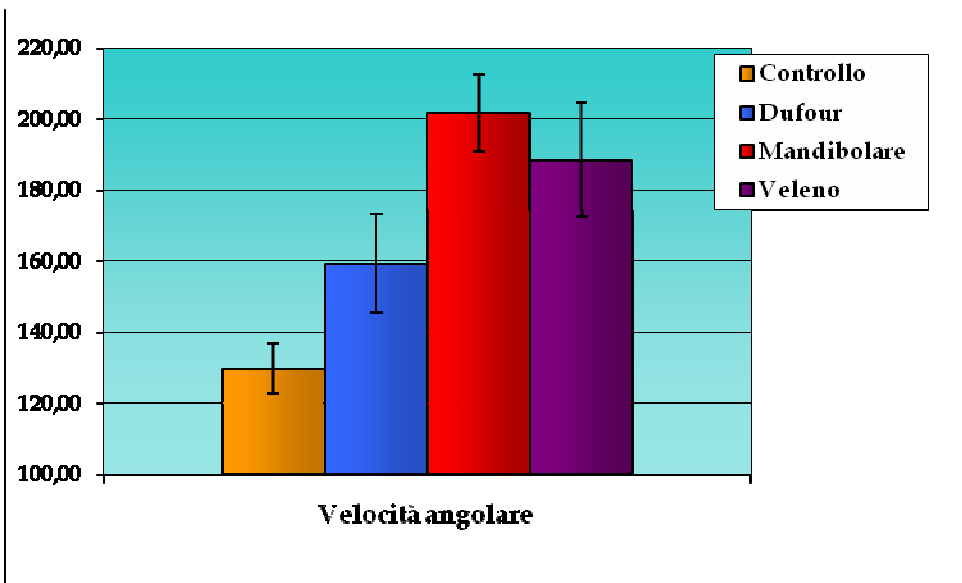


Figura 7.15
Velocità angolare media espressa dalle operaie di *F. rufibarbis*: gli istogrammi rappresentano la media, le barre rappresentano l'Errore Standard.

b) Analisi dei display comportamentali

Il test di Kruskal-Wallis effettuato per ogni singolo comportamento osservato (Tab. 7.1) è risultato significativo per i comportamenti di Postura eretta ($\chi^2_{(3)}=35.792$, $p<0.001$), Minaccia ($\chi^2_{(3)}=26.679$, $p<0.001$), Scatti ($\chi^2_{(3)}=38.810$, $p<0.001$) e Minaccia prolungata ($\chi^2_{(3)}=49.784$, $p<0.001$) mentre non è risultato significativo per i comportamenti di Snapping, Flessione del gastro e Morsi. L'analisi post-hoc effettuata per il comportamento di "postura eretta" dimostra come i trattamenti "ghiandola mandibolare" e "ghiandola del veleno" (non differenti fra di loro) inducano un aumento della frequenza di questo comportamento rispetto al trattamento "ghiandola di Dufour" ed al controllo (non differenti tra di loro) (Mediana: Controllo: 0.3, Dufour: 0.2, Veleno: 2.8, Mandibolare: 2.6) (Fig. 7.16). Per il comportamento "minaccia", il trattamento "Ghiandola del veleno" induca un aumento della frequenza di tale comportamento rispetto a tutti gli altri trattamenti (non differenti tra loro) (Mediana: Controllo: 0.0, Dufour: 0.0, Veleno: 0.2, Mandibolare: 0.1) (Fig. 7.17). Per il comportamento "scatti", il trattamento "ghiandola del veleno" è associato ad una frequenza maggiore di tale comportamento rispetto a tutti gli altri trattamenti e il trattamento "ghiandola mandibolare" è associato ad una frequenza maggiore rispetto al trattamento "ghiandola di Dufour" e al controllo (non differenti fra di loro) (Mediana: Controllo: 0.2, Dufour: 0.2, Veleno: 4.5, Mandibolare: 2.1) (Fig. 7.18). Per il comportamento di "minaccia prolungata", i trattamenti "ghiandola mandibolare" e "ghiandola del veleno" (non differenti fra di loro) sono associati ad una durata maggiore di questo comportamento rispetto al trattamento "ghiandola di Dufour" ed al controllo (non differenti tra di loro) (Mediana: Controllo: 0.0, Dufour: 0.0, Veleno: 119.1, Mandibolare: 87.2) (Fig. 7.19).

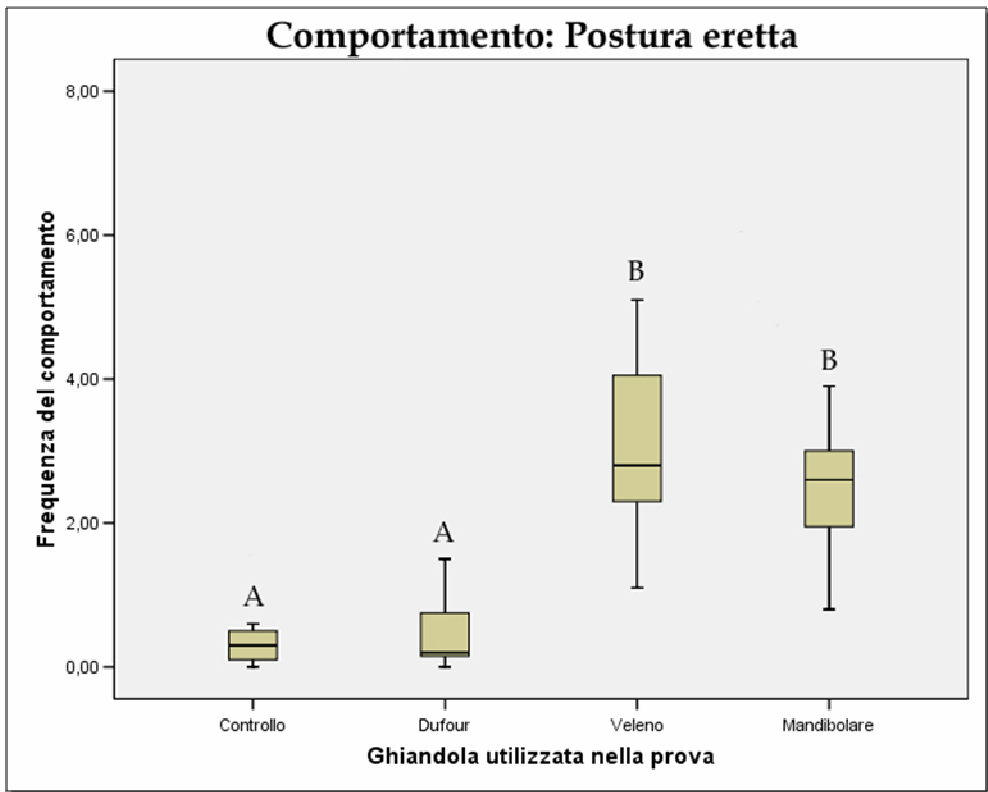


Figura 7.16
 Grafico Box-Plot delle frequenze osservate per il comportamento Postura eretta. Le mediane con la stessa lettera non sono statisticamente differenti

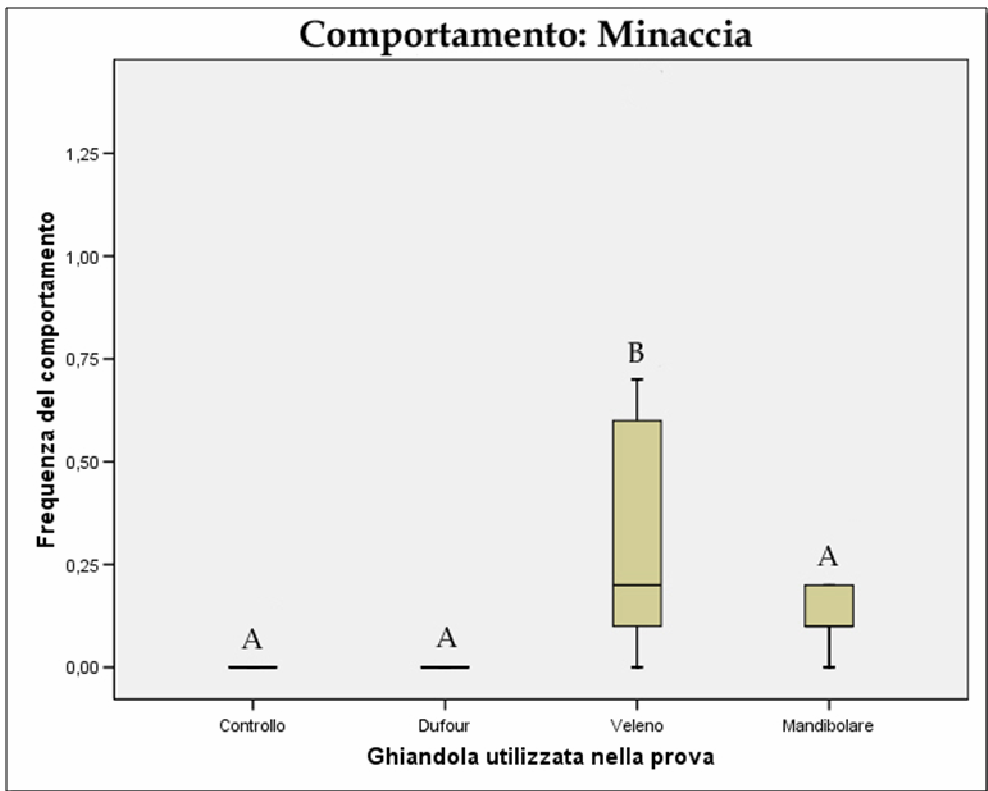


Figura 7.17
 Grafico Box-Plot delle frequenze osservate per il comportamento Minaccia. Le mediane con la stessa lettera non sono statisticamente differenti

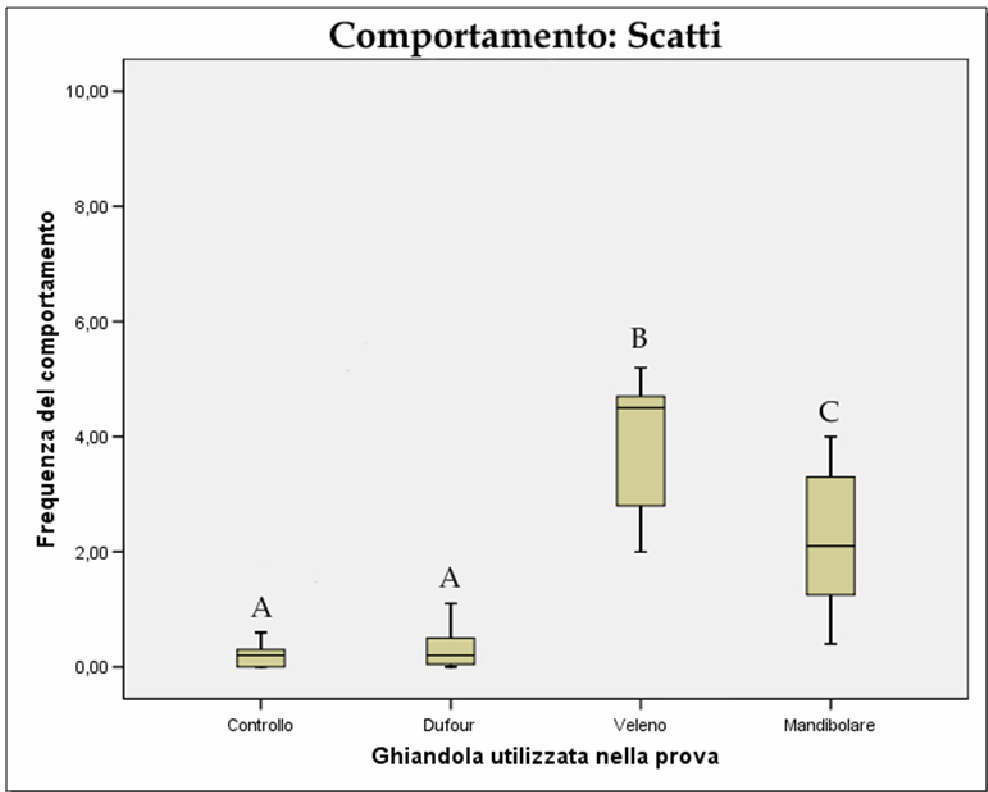


Figura 7.18
 Grafico Box-Plot delle frequenze osservate per il comportamento Scatti. Le mediane con la stessa lettera non sono statisticamente differenti

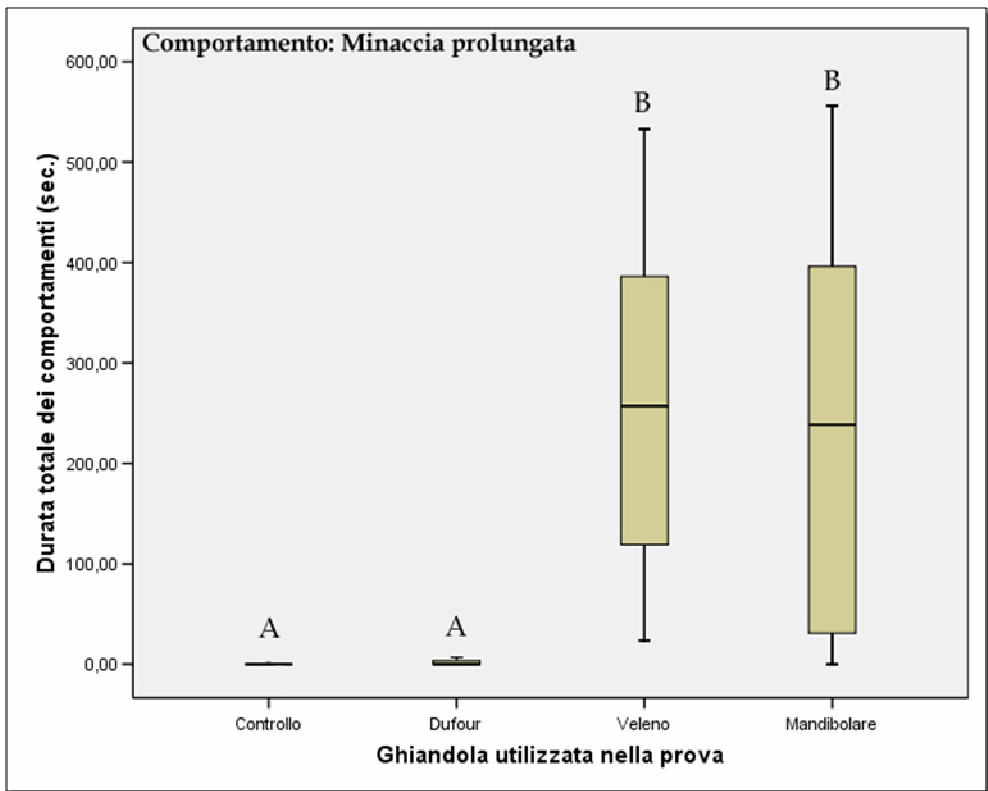


Figura 7.19
 Grafico Box-Plot della durata osservata per il comportamento Minaccia prolungata. Le mediane con la stessa lettera non sono statisticamente differenti

Conclusioni

Come tutte le attività collettive che si svolgono all'interno e all'esterno del nido, anche il comportamento di difesa cooperativa si basa sull'invio di particolari segnali che avvertono le compagne dell'imminenza di un pericolo e mediano l'organizzazione di reazioni di risposta. Come per la maggior parte dei comportamenti espressi dalle formiche, anche le risposte comportamentali alle fonti di disturbo sono principalmente mediate da segnali chimici prodotti dalle numerose ghiandole esocrine presenti nel loro corpo (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990; BILLEN e MORGAN, 1998). Questi segnali permettono di organizzare una difesa collettiva dal momento che, in un breve lasso di tempo, un solo individuo emettitore può informare più individui di un pericolo imminente, mobilitandoli verso un particolare settore dello spazio in modo da rendere il più efficace possibile la risposta difensiva. La difesa di gruppo nelle formiche è resa, quindi, possibile da fenomeni di comunicazione di allarme su base chimica. I feromoni di allarme sono, in genere, sostanze chimiche dalla natura estremamente volatile e sono prodotti da una o più ghiandole esocrine (in successione o contemporaneamente) (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990). Le risposte comportamentali evocate dai feromoni di allarme possono essere varie e anche molto complesse. Si va da uno stato di allerta accompagnato da un aumento dell'attività locomotoria con fuga dalla sorgente dello stimolo oppure attrazione verso questa, fino alla manifestazione di comportamenti aggressivi aperti (morsi o emissione di sostanze difensive) (BUSCHINGER e MASCHWITZ, 1984).

Questa parte di lavoro è stata focalizzata sullo studio della comunicazione di allarme della specie *F. rufibarbis* con particolare riguardo alla individuazione delle sorgenti ghiandolari dei feromoni di allarme ed allo studio delle risposte comportamentali che questi segnali evocano (quando percepiti nei pressi dell'ingresso del nido) in un frammento di colonia e successivamente in singoli individui.

I risultati dell'analisi dei dati di "attività locomotoria" del primo set sperimentale hanno dimostrato che, come per la specie congenere *F. cunicularia*, i feromoni prodotti a livello della ghiandola mandibolare hanno un ruolo chiave nella fuoriuscita delle formiche dal nido e nel loro reclutamento nei pressi dell'area dello stimolo. L'aumento del parametro di entrate nella zona dello stimolo che il secreto di questa ghiandola induce,

dimostra anche l'alto stato di agitazione che le formiche mantengono una volta raggiunta la sorgente dello stimolo.

Per quanto riguarda l'analisi dei singoli moduli comportamentali, questi non sembrano essere associati a differenze tra i trattamenti. L'analisi dei moduli comportamentali attraverso il calcolo dell'Indice di aggressività ha invece permesso di evidenziare una significatività anche in questo caso per il secreto della ghiandola mandibolare. Il secreto di tale ghiandola sembra quindi indurre in generale una reazione comportamentale più aggressiva rispetto a tutte le altre ghiandole.

Sulla base dei dati presentati il secreto della ghiandola mandibolare sembra avere quindi una importante funzione nell'organizzazione della direzionalità della reazione di allarme e di difesa e solo in parte nell'indurre i moduli comportamentali propri di tali reazioni. La mancanza di significatività nell'analisi dei singoli comportamenti potrebbe essere dovuta al fatto che non una sola ghiandola, ma più ghiandole sono coinvolte sinergicamente nell'evocare le risposte comportamentali di allarme e di difesa (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990).

Nel secondo set sperimentale l'analisi focalizzata su singoli individui ha permesso di osservare il comportamento di una sola operaia non influenzato da quello delle compagne di nido che, una volta allertate, possono emettere degli ulteriori segnali di allarme. I risultati hanno confermato il ruolo del secreto della ghiandola mandibolare nell'organizzazione della reazione di allarme e difesa di gruppo; hanno inoltre dimostrato il coinvolgimento del secreto della ghiandola del veleno in tale fenomeno. Il secreto di tali ghiandole induce un forte stato di agitazione, dimostrato dall'aumento dei parametri di velocità di movimento e di distanza percorsa (per quanto riguarda il parametro di velocità media il trattamento "ghiandola del veleno" non risulta significativo ma è prossimo ad un livello di significatività), accompagnato da una intensa attività esplorativa, dimostrata dall'aumento dei parametri di Velocità angolare e Turn angle (parametro che esprime il cambiamento di direzione di un movimento).

Dall'analisi dei moduli comportamentali si vede come i secreti di queste due ghiandole inducono comportamenti aggressivi tipici della difesa come la "postura eretta", i "movimenti a scatti" e lo "stato di minaccia a mandibole aperte". Il secreto della ghiandola del veleno è stato più efficace nell'indurre i "movimenti a scatti" rispetto a quello della ghiandola mandibolare ed è stato l'unico ad indurre il comportamento di minaccia (differente dallo "stato di minaccia prolungato" in quanto è caratterizzato

dall'apertura e dalla chiusura delle mandibole in un breve periodo di tempo). Per questo il secreto della ghiandola del veleno sembra essere più efficiente del secreto della ghiandola mandibolare nell'evocare i moduli comportamentali propri della reazione di allarme e di difesa. La principale e originaria funzione della ghiandola del veleno è quella di sorgente di sostanze difensive/offensive con attività neurotossica (nel caso di *Formica cunicularia* l'acido formico) capaci di respingere il nemico. In questa specie il secreto di tale ghiandola sembra avere assunto, tramite un processo di "ritualizzazione", anche un ruolo comunicativo (BLUM, 1985; HÖLLDOBLER e WILSON, 1990; BILLEN e MORGAN, 1998). In particolare la reazione di allarme evocata potrebbe avere una importante funzione nel suscitare allerta nei riceventi e indurre un aumento di agitazione allo scopo di rendere più efficace la risposta di difesa della colonia. Inoltre, diversamente dalle altre specie appartenenti alla sottofamiglia delle *Formicinae* (PARRY e MORGAN, 1979) ed in particolare dalle altre specie appartenenti al genere *Formica* (MASCHWITZ, 1964), questi risultati sembrano escludere il coinvolgimento della ghiandola di Dufour nel contesto della comunicazione di allarme della specie *F. rufibarbis*.

In conclusione, dai dati ottenuti si può descrivere la comunicazione di allarme in *F. rufibarbis* come una comunicazione basata su feromoni prodotti a livello di più sorgenti ghiandolari (multisource alarm pheromon communication) (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990). In particolare il secreto della ghiandola mandibolare sembra essere coinvolto nelle fasi iniziali della reazione di allarme provocando l'uscita delle operaie dal nido, l'attrazione verso la fonte dello stimolo e inducendo una forte agitazione in tale punto. Il secreto della ghiandola del veleno sembra esserne coinvolto in una fase successiva, quando la fonte di pericolo è già stata individuata, permettendo da una parte di mantenere alto e prolungato nel tempo lo stato di agitazione e dall'altra di rendere più efficace la risposta inducendo più comportamenti aggressivi e con maggiore intensità e frequenza.

Capitolo 9

LA COMUNICAZIONE DI ALLARME IN
Formica cunicularia: **IDENTIFICAZIONE E**
RUOLO DEL
3-ETIL-4-METILPENTANOLO **QUALE**
COMPONENTE DEL FEROMONE DI
ALLARME

1. Analisi chimica

Materiali e Metodi

Durante il periodo estivo 2006 sono state raccolte in natura le formiche utilizzate per la preparazione dei campioni di estratto ghiandolare. La dissezione delle ghiandole è avvenuta in acqua distillata dopo aver lasciato in freezer la formica per almeno 5 minuti. Ogni ghiandola mandibolare è stata asportata dalla capsula cefalica e dalla struttura mandibolare utilizzando un microscopio binoculare (Zeiss©, Stemi 2000-C, 0.65x/5x). Ogni estratto ghiandolare era formato da 20µl di solvente diclorometano (CH₂Cl₂) in cui venivano immerse 4 ghiandole mandibolari per ogni campione. In totale sono stati realizzati 4 campioni sperimentali per un totale di 16 ghiandole mandibolari. L'estrazione è stata lasciata avvenire per 24 ore prima dell'analisi.

L'analisi chimica è stata effettuata con tecnica accoppiata di Gas-cromatografia e Spettrometria di massa (GC-MS) utilizzando un gas-cromatografo Agilent Technologies 6890N accoppiato ad uno spettrografo di massa 5973N (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Le macchine sono state programmate secondo le seguenti condizioni: "DB-5 capillary column (30 m, 0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness; J&W Scientific, Folsom, CA) with oven temperature programmed from 40°C for 1 min, then increased to 270°C at 20°C/min. Head pressure was 6.93 psi; injector temperature: 250°C; injection mode: 1 min pulsed splitless at 20 psi, volume injected 2µl; detector temperature: 280°C; carrier gas: helium. MS conditions: ion source temperature: 230°C; electron impact: 70 eV; acquisition mode: scan (m/z 30-420)". Le strutture dei composti trovati sono state verificate con composti standard".

Risultati

L'analisi GC-MS degli estratti di ghiandola mandibolare ha individuato un totale di 10 sostanze. L'esadecanolo è risultato essere la sostanza più abbondante e corrisponde al 27% della miscela. Meno abbondanti sono risultati essere il metil-6-metilsalicilato ed il metil-oleato corrispondenti rispettivamente al 10.8% e al 10.5% della miscela. Tutti le altre sostanze individuate corrispondono ad una percentuale minore del 10% (Fig. 8.1; Tab. 8.1)

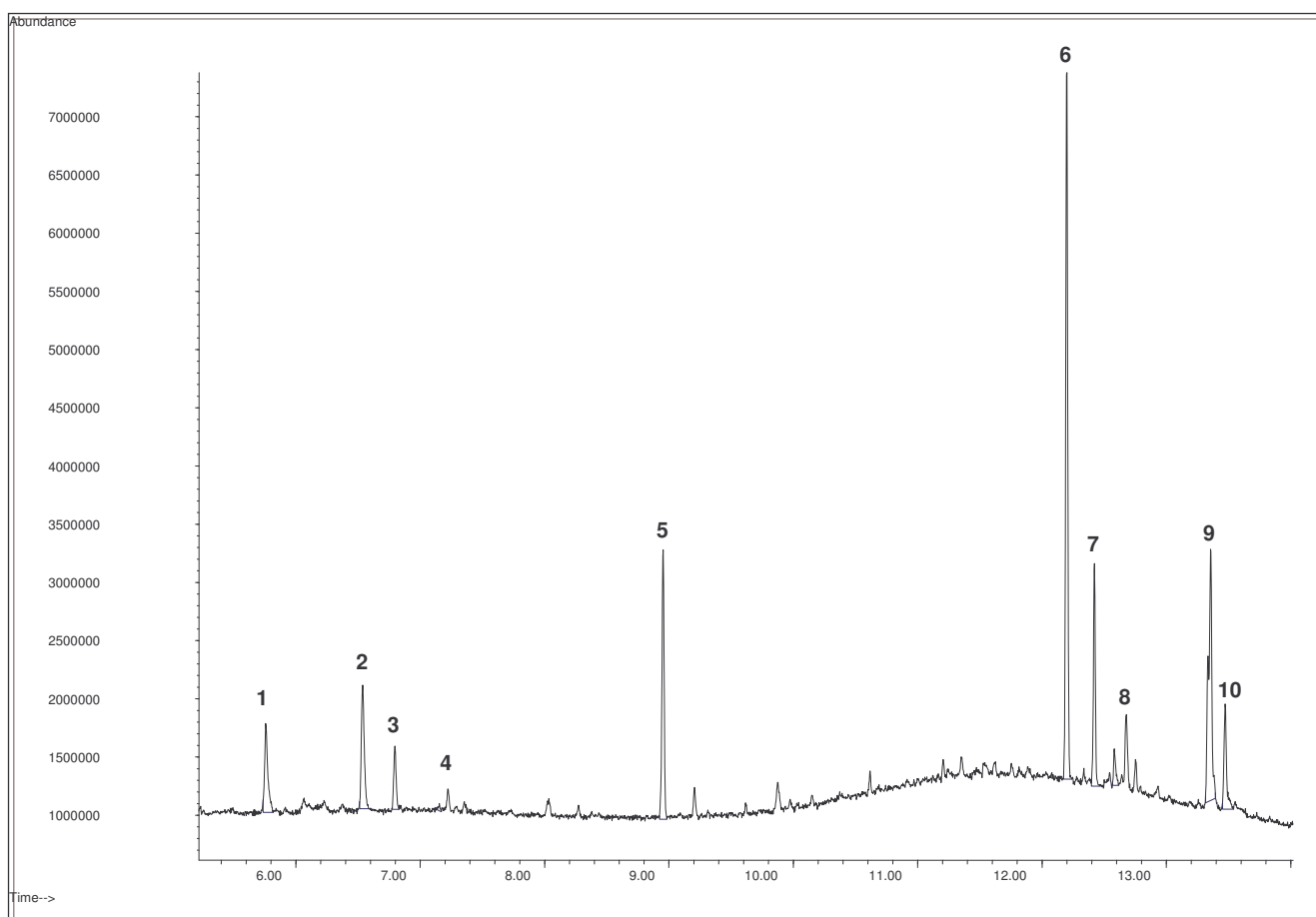


Figura 8.1

Profilo gas-cromatografico delle sostanze presenti nell'estratto della ghiandola mandibolare di operaie di *F. cunicularia*. L'elenco delle sostanze corrispondenti ai picchi sono elencate in Tab. 8.1.

Composto chimico	Tempo di ritenzione (min.)	%
(1) 4-metil-3-eptanone	5.76	5.1
(2) 4-etil-3-metil-1-pentanololo	6.54	6.4
(3) 4-etil-3-metil-acido pentanoico	6.80	2.7
(4) Nonaldeide	7.15	<1
(5) Metil-6-metilsalicilato	8.95	10.8
(6) Esadecanololo	12.20	27.2
(7) Metil-palmitato	12.42	7.8
(8) Acido palmittico	12.58	1.4
(9) Metil-oleato	13.35	10.5
(10) Metil- stearato	13.47	4.8

Tabella 8.1

Elenco dei composti individuati negli estratti della ghiandola mandibolare di operie di *F. cunicularia*. Per ogni sostanza è indicato il tempo di ritenzione e la percentuale media di abbondanza.

2. Byoassays comportamentali

Materiali e Metodi

a) Apparato sperimentale

Durante il periodo estivo 2007 sono state raccolte in natura frammenti di colonie diverse (operaie, bozzoli, larve e pupe) della specie *F. cunicularia*. I frammenti sono stati successivamente alloggiati in contenitori di vetro con terra e materiale organico proveniente dal nido d'origine in modo da garantire condizioni di vita del tutto simili a quelle naturali. Le colonie così allestite sono state mantenute in laboratorio in condizioni controllate di temperatura (26-28 °C) e di umidità (50-60 %). Il periodo di luce giornaliera era costante di 12 ore. Ogni frammento è stato alimentato fornendo acqua, miele e frammenti di insetti.

Per questo esperimento sono state allestite 10 arene contenenti ciascuna 50 operaie e 10 bozzoli. Le arene erano costituite da una base rigida in PVC di 37x25 cm, sopra la quale era stata fissata una struttura in gesso di forma ovale (34.5x24 cm) alta 2 cm. La nicchia di nidificazione (6x7 cm) era ricavata nel gesso e chiusa da un coperchio in plastica trasparente e da un foglio lucido rosso delle stesse dimensioni in modo da permettere la visione dell'interno della nicchia e allo stesso tempo di mantenere gli individui in condizione di penombra. Il resto dell'arena rappresentava l'area di foraggiamento in cui le operaie potevano accedere liberamente. Ogni giorno le operaie morte erano sostituite in modo tale da mantenere costante il numero di individui per ogni arena.

Allo scopo di verificare quale fra le sostanze presenti nel secreto della ghiandola mandibolare fossero le componenti attive del feromone di allarme, sono state testate le seguenti:

- 4-metil-3-eptanone
- 3-etil-4-metil-1-pentanololo
- Metil-6-metilsalicilato
- Esadecanololo

Le sostanze sono state scelte sulla base di criteri di abbondanza e di alta volatilità, ma anche sulla base di dati già pubblicati in letteratura.

Ogni sostanza è stata testata in soluzioni in esano: in un palloncino tarato veniva mantenuta una concentrazione costante di 10ng di sostanza pura per 10 μ l di solvente, in modo tale che 10 μ l di soluzione corrispondessero ad un individuo-equivalente. 10 μ l di soluzione venivano iniettati su di un pezzo di carta filtro e lasciati adsorbire. Questo era poi posizionato con uno spillo metallico al centro di una zona circolare ($r = 3$ cm) nell'area di foraggiamento dell'arena a circa 5 cm di distanza dall'ingresso della nicchia di nidificazione. Sopra il pezzo di carta da filtro era posizionato e fissato con lo stesso spillo metallico un piccolo cubo di vetro (cm 0.5x0.5) allo scopo di rappresentare un oggetto sul quale dirigere i comportamenti di aggressività aperta. Il solo supporto era utilizzato come trattamento di controllo. L'arena sperimentale era poi suddivisa in 3 zone diverse (Fig. 8.2):

- **Zona A:** nido o nicchia di nidificazione
- **Zona B:** area circolare dove veniva posizionato lo stimolo
- **Zona C:** resto dell'arena (area di foraggiamento)

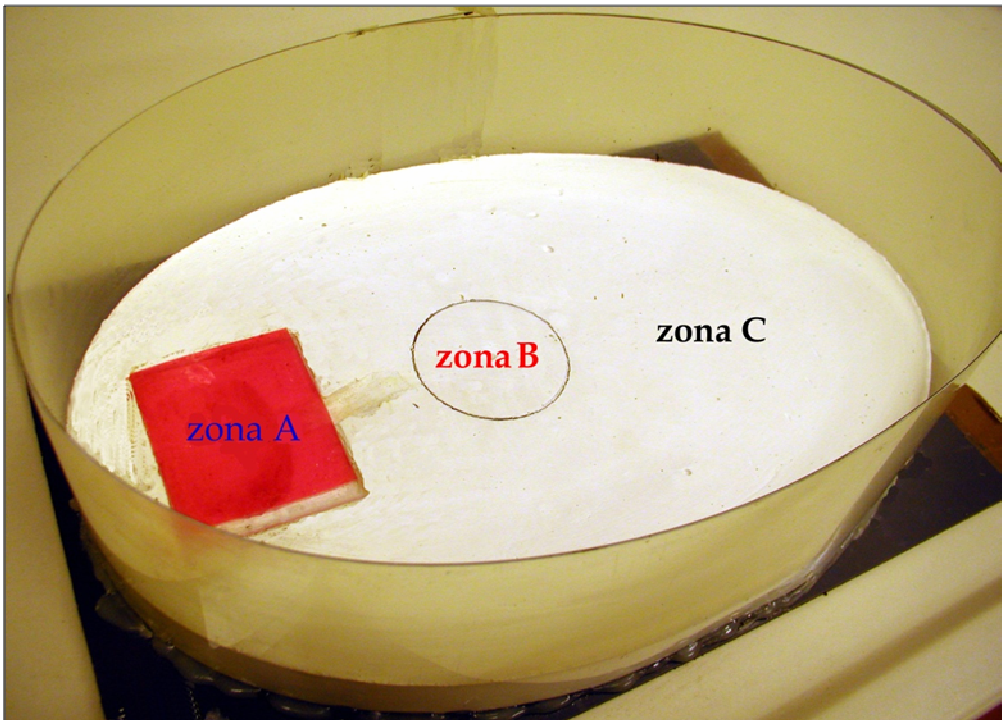


Figura 8.2
Arena sperimentale in cui si distinguono le tre zone: la nicchia di nidificazione (**Zona B**), l'area dello stimolo (**Zona A**) e l'area di foraggiamento (**Zona C**).

Ogni stimolo veniva presentato solo una volta per ogni arena. In totale sono state effettuate 50 prove. Il tempo sperimentale di osservazione era di 10 minuti suddiviso in 20 intervalli da 30" ciascuno.

b) Parametri analizzati

In questi esperimenti sono stati registrati diversi parametri allo scopo di descrivere sia il movimento delle operaie nello spazio dell'arena sperimentale, sia il tipo di comportamenti effettuati in risposta allo stimolo presentato. Durante il tempo sperimentale alla fine di ogni intervallo sono stati registrati i seguenti parametri di "attività locomotoria":

1. Numero di formiche uscite dalla zona A;
2. Numero di formiche presenti nella zona B;
3. Numero totale di formiche all'esterno del nido (B + C);
4. Numero di formiche entrate nella zona B.

I dati ottenuti sono stati analizzati statisticamente utilizzando il software di analisi statistica SPSS® (ver. 13.0). I trattamenti sono stati confrontati fra di loro tramite

MANOVA, Analisi Discriminante, ANOVA e test HSD di Tuckey e Games-Howell per i confronti post-hoc.

Parallelamente è stata effettuata anche una analisi di tipo comportamentale di tipo “scan sampling”: in ogni prova venivano registrati i principali comportamenti aggressivi (Tab. 8.2) effettuati nella zona B (area dello stimolo) da parte di ogni formica presente nella zona. Tutti i dati sono stati raccolti utilizzando il NOLDUS “The Observer” ® ver. 5.0, un software specifico per analisi etologiche. I dati ottenuti sono stati confrontati fra di loro utilizzando il test non parametrico Kruskal-Wallis.

Postura Eretta	Postura di allerta in cui l'individuo si solleva sulle zampe anteriori mantenendo le antenne dritte e rivolte in avanti
Scatti	Movimenti brevi e rapidi (a scatto) generalmente effettuati in avanti o lateralmente con tutto il corpo
Minaccia	Apertura evidente delle mandibole
Flessione del Gastro	Flessione in avanti del gastro tra le zampe posteriori come nell'atto di spruzzare (a volte è accompagnato dall'emissione del secreto di ghiandole addominali)
Chiusura delle mandibole (Snapping)	Schioccamento delle mandibole, chiusura repentina delle mandibole come nell'atto di mordere (morsi a vuoto)
Morsi	Morsi che possono essere portati a termine o meno su un oggetto

Tabella 8.2

Principali comportamenti aggressivi osservati nella zona circolare dove veniva posizionato lo stimolo (Zona A)

Risultati

a) Analisi dei parametri di "attività locomotoria"

Il test MANOVA è risultato significativo ($F=2.983$; $p<0.001$); l'Analisi Discriminante sui parametri considerati individua 4 funzioni discriminanti di cui solo la prima, che spiega il 96.9 % della varianza totale, discriminano significativamente tra i trattamenti (Funzione 1: Wilks' $\lambda=0.068$, $\chi^2_{(20)}=64.388$, $p<0.001$; Funzione 2: Wilks' $\lambda=0.381$, $\chi^2_{(12)}=64.388$, $p=0.026$) (Fig. 8.4). L'ANOVA ad un criterio di classificazione effettuata sui punteggi discriminati della funzione 1 e della funzione 2 è risultata essere significativa (Funzione 1: $F_{(4,25)}=28.535$, $p<0.001$; Funzione 2: $F_{(4,25)}=7.557$, $p<0.001$)) e l'analisi post-hoc (Games-Howell) presenta tre cluster statisticamente separati; il primo è rappresentato dal solo controllo; il secondo dai trattamenti "4-metil-3-eptanone", "esadecanolo" e "metil-6-metilsalicilato"; il terzo dal solo trattamento "3-etil-4-metil-1-pentanololo" (Fig. 8.4, 8.5).

	Funzione 1	Funzione 2
Numero di formiche presenti nella zona B	0.622*	0.462
Numero totale di formiche all'esterno del nido	0.472	0.811*
Numero di formiche entrate nella zona B	0.739*	0.582
Numero di formiche uscite dalla zona A	0.632*	0.327

Tabella 8.3

Matrice di struttura dei parametri di "attività locomotoria" per la specie *F. cunicularia*. * è il parametro che meglio discrimina tra i trattamenti.

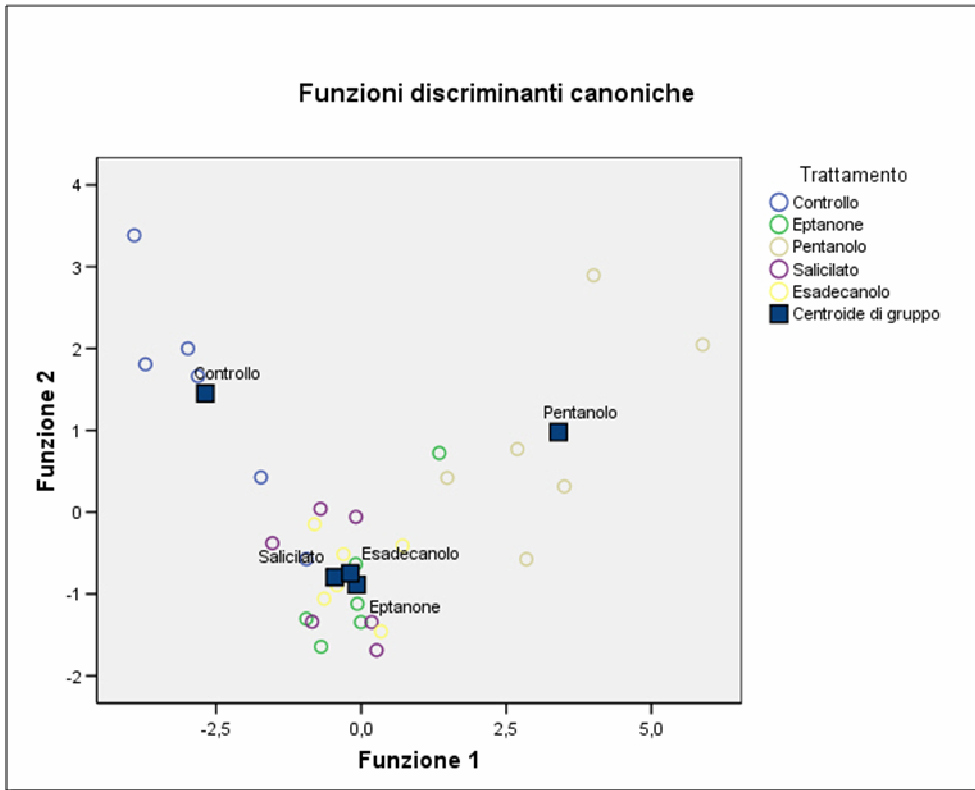


Figura 8.3
 Plot dei punteggi discriminanti dell'Analisi Discriminante effettuata sui parametri di "Attività locomotoria" della specie *F. cunicularia*.

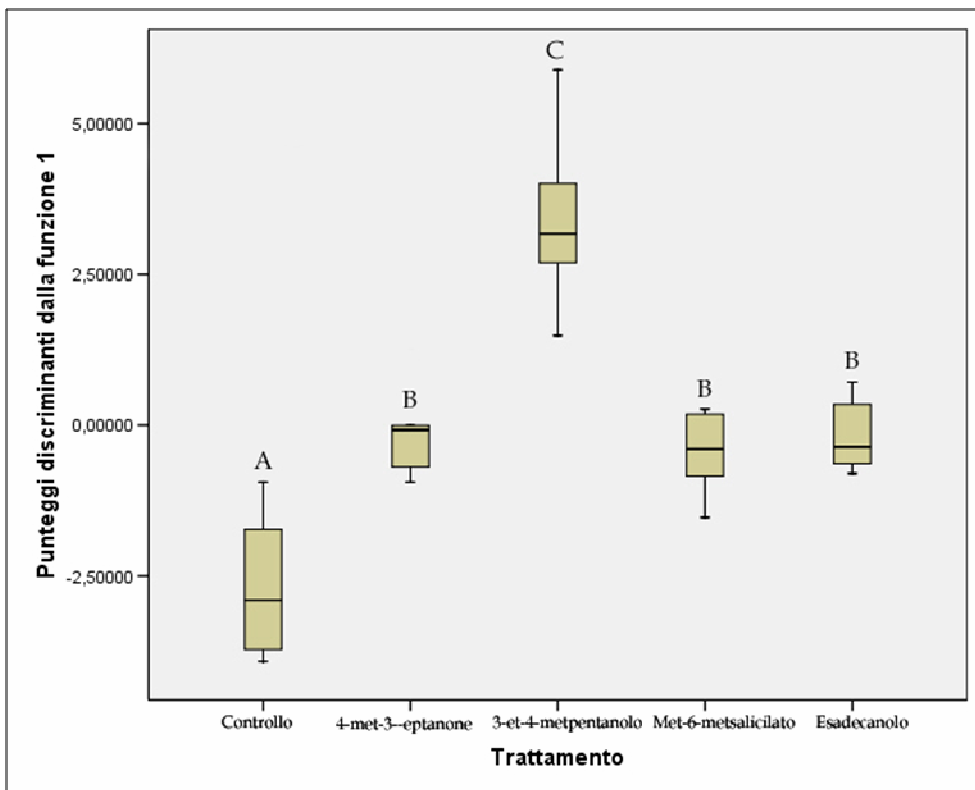


Figura 8.4
 Grafico Box-Plot dei punteggi discriminanti della funzione 1. Si evidenziano i 3 cluster separati: il primo (A) formato dal solo controllo, il secondo (B) dai trattamenti "4-metil-3-eptanone", "metil-6-metilsalicilato" e "esadecanolo", e il terzo (C) dal solo trattamento "3-etil-4-metilpentanolo".

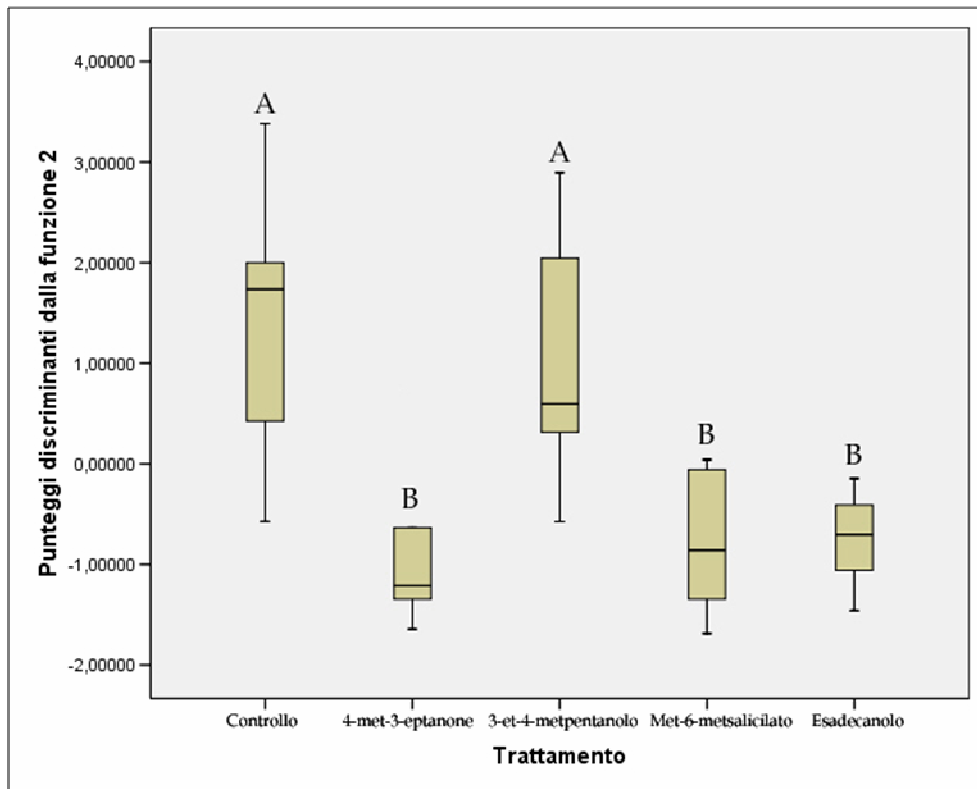


Figura 8.5

Grafico Box-Plot dei punteggi discriminanti della funzione 2. Si evidenziano i 2 cluster separati: il primo (A) formato dal controllo e dal trattamento "3-etil-4-metil-1-pentanol" e il secondo (B) dai rimanenti trattamenti.

Sulla base della matrice di struttura (Tab. 8.3) i parametri che pesano di più nel discriminare tra i trattamenti per la funzione 1 sono: Numero di formiche presenti nella zona B, Numero di formiche entrate nella zona B, Numero di formiche uscite dalla zona A; e per la funzione 2 è il Numero totale di formiche all'esterno del nido. Questi parametri sono stati analizzati singolarmente con una statistica di tipo univariata; l'ANOVA ad un criterio di classificazione è risultata significativa per tutti i parametri:

- Numero di formiche presenti nella zona B ($F_{(4,25)}=12.808, p<0.001$)
- Numero di formiche entrate nella zona B ($F_{(4,25)}=18.195, p<0.001$)
- Numero di formiche uscite dalla zona A ($F_{(4,25)}=12.219, p<0.001$)
- Numero totale di formiche all'esterno del nido ($F_{(4,25)}=11.329, p<0.001$)

L'analisi post-hoc dimostra come il trattamento "3-etil-4-metil-1-pentanol" sia significativamente diverso da tutti gli altri trattamenti; ed in particolare causa una maggiore presenza di formiche nella zona B (area dello stimolo) (Media \pm E.S.: Controllo: 1.1 ± 0.0 ; 4-metil-3-eptanone: 0.3 ± 0.1 ; 3-etil-4-metil-1-pentanol: 2.4 ± 0.5 ; Metil-6-metilsalicilato: 0.3 ± 0.1 ; Esadecanolo: 0.6 ± 0.1) (Fig. 8.6), un numero maggiore di entrate nella zona B (area dello stimolo) (Media \pm E.S.: Controllo: 3.1 ± 1.0 ; 4-metil-3-eptanone: 8.6

± 4.1 ; 3-etil-4-metil-1-pentanol: 42.0 ± 6.6 ; Metil-6-metilsalicilato: 7.0 ± 2.0 ; Esadecanolo: 7.3 ± 1.7) (Fig. 8.7), un numero maggiore di uscite dal nido (Media \pm E.S.: Controllo: 1.1 ± 0.6 ; 4-metil-3-eptanone: 5.8 ± 1.2 ; 3-etil-4-metil-1-pentanol: 19.3 ± 4.1 ; Metil-6-metilsalicilato: 4.3 ± 0.8 ; Esadecanolo: 5.1 ± 0.8) (Fig. 8.8) e una maggiore presenza di formiche in totale all'esterno del nido (Media \pm E.S.: Controllo: 2.2 ± 0.4 ; 4-metil-3-eptanone: 1.1 ± 0.5 ; 3-etil-4-metil-1-pentanol: 5.8 ± 1.1 ; Metil-6-metilsalicilato: 1.2 ± 0.2 ; Esadecanolo: 1.4 ± 0.1) (Fig. 8.9).

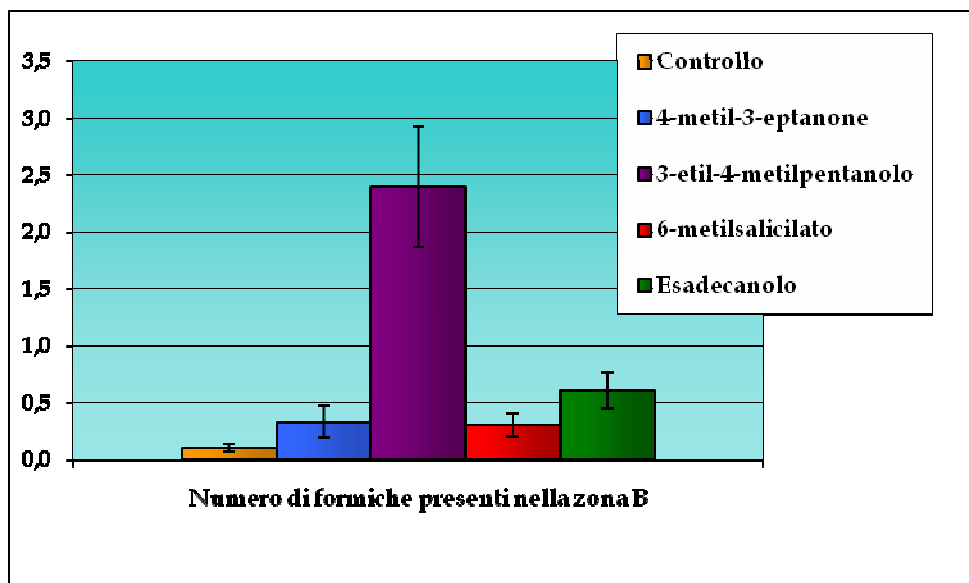


Figura 8.6

Numero di operaie di *F. cunicularia* presenti nella zona B (area dello stimolo): gli istogrammi rappresentano la media, le barre rappresentano l'Errore Standard.

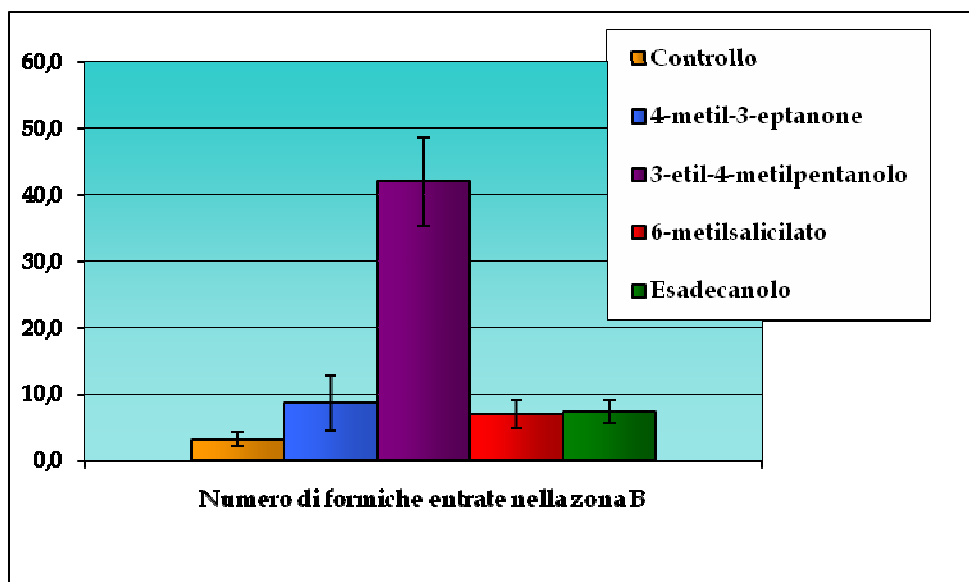


Figura 8.7

Numero di operaie di *F. cunicularia* entrate nella zona B (area dello stimolo): gli istogrammi rappresentano la media, le barre rappresentano l'Errore Standard.

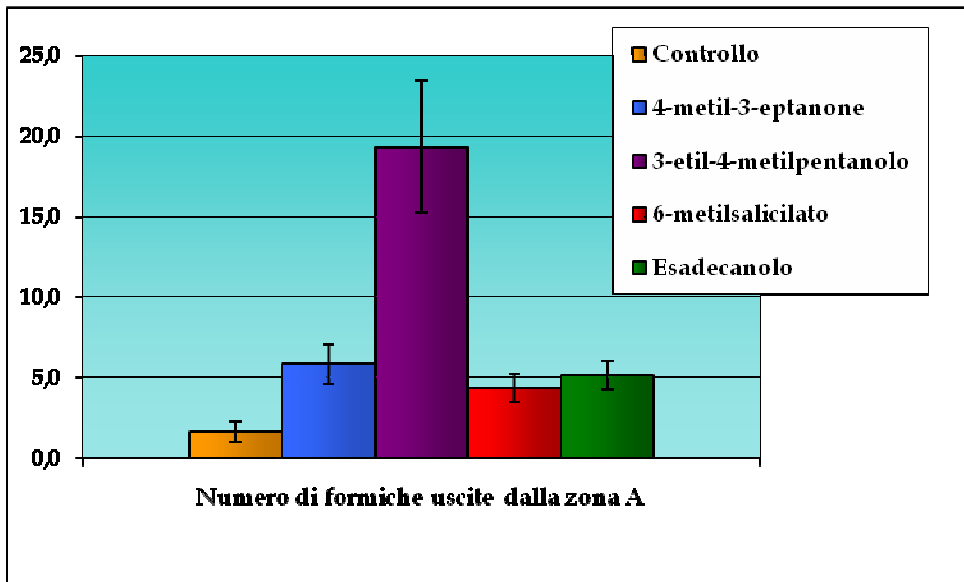


Figura 8.8
 Numero di operaie di *F. cunicularia* uscite dalla zona A (nido): gli istogrammi rappresentano la media, le barre rappresentano l'Errore Standard.

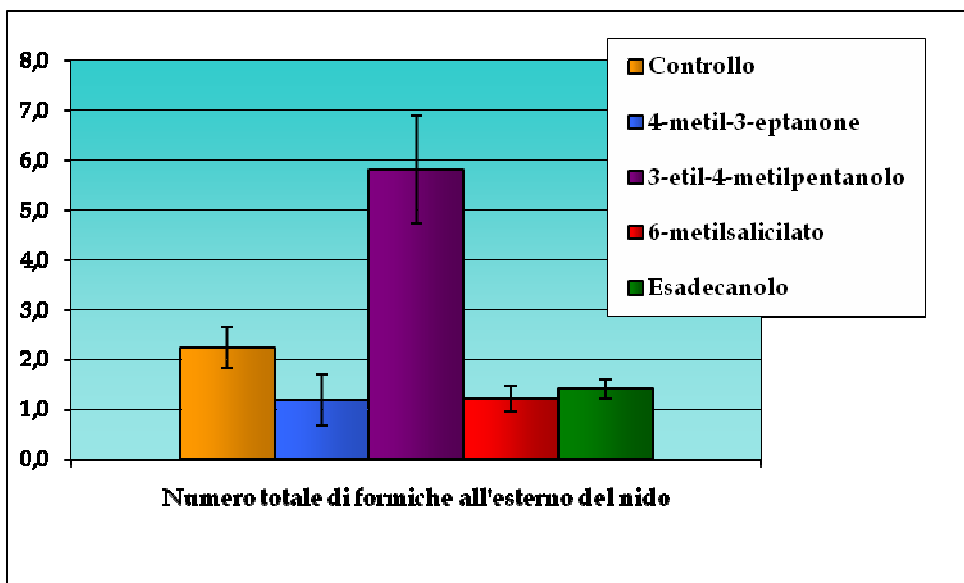


Figura 8.9
 Numero di operaie di *F. cunicularia* presenti in totale all'esterno del nido: gli istogrammi rappresentano la media, le barre rappresentano l'Errore Standard.

b) Analisi dei display comportamentali

Il test di Kruskal-Wallis effettuato per ogni singolo comportamento osservato (Tab. 8.2) è risultato significativo per i comportamenti di Postura eretta ($\chi^2_{(4)}=9.938$, $p=0.041$), Scatti ($\chi^2_{(4)}=18.615$, $p=0.001$), Minaccia ($\chi^2_{(4)}=18.866$, $p=0.001$), Gaster flexing ($\chi^2_{(4)}=19.387$, $p=0.001$) e Morsi ($\chi^2_{(4)}=18.127$, $p=0.001$), mentre non è risultato significativo per il solo comportamento di Snapping. L'analisi post-hoc effettuata dimostra come il trattamento "3-etil-4-metil-1-pentanolo" sia significativamente diverso da tutti gli altri trattamenti; ed in particolare induce un numero maggiore di posture erette (Mediana \pm D.S.: Controllo: $0.0 \pm$

0.4; 4-metil-3-eptanone: 0.5 ± 0.8 ; 3-etil-4-metil-1-pentanololo: 3.0 ± 4.2 ; Metil-6-metilsalicilato: 1.0 ± 0.5 ; Esadecanolo: 0.0 ± 0.4) (Fig. 8.10), scatti (Mediana \pm D.S.: Controllo: 0.0 ± 0.5 ; 4-metil-3-eptanone: 0.0 ± 1.6 ; 3-etil-4-metil-1-pentanololo: 5.0 ± 0.8 ; Metil-6-metilsalicilato: 0.0 ± 0.5 ; Esadecanolo: 0.5 ± 0.9) (Fig. 8.11), minacce a mandibole aperte (Mediana \pm D.S.: Controllo: 0.0 ± 0.8 ; 4-metil-3-eptanone: 1.0 ± 1.8 ; 3-etil-4-metil-1-pentanololo: 8.0 ± 1.6 ; Metil-6-metilsalicilato: 0.5 ± 1.1 ; Esadecanolo: 2.0 ± 1.0) (Fig. 8.12), flessioni del gastro (Gaster flexing) (Mediana \pm D.S.: Controllo: 0.0 ± 0.6 ; 4-metil-3-eptanone: 0.0 ± 0.8 ; 3-etil-4-metil-1-pentanololo: 2.0 ± 1.2 ; Metil-6-metilsalicilato: 0.0 ± 0.5 ; Esadecanolo: 0.0 ± 0.4) (Fig. 8.13) e morsi (Mediana \pm D.S.: Controllo: 0.0 ± 0.6 ; 4-metil-3-eptanone: 0.0 ± 3.2 ; 3-etil-4-metil-1-pentanololo: 8.0 ± 14.8 ; Metil-6-metilsalicilato: 0.0 ± 1.8 ; Esadecanolo: 0.0 ± 1.6) (Fig. 8.14) rispetto a tutti gli altri trattamenti ed il controllo, i quali tra loro non sono significativamente differenti.

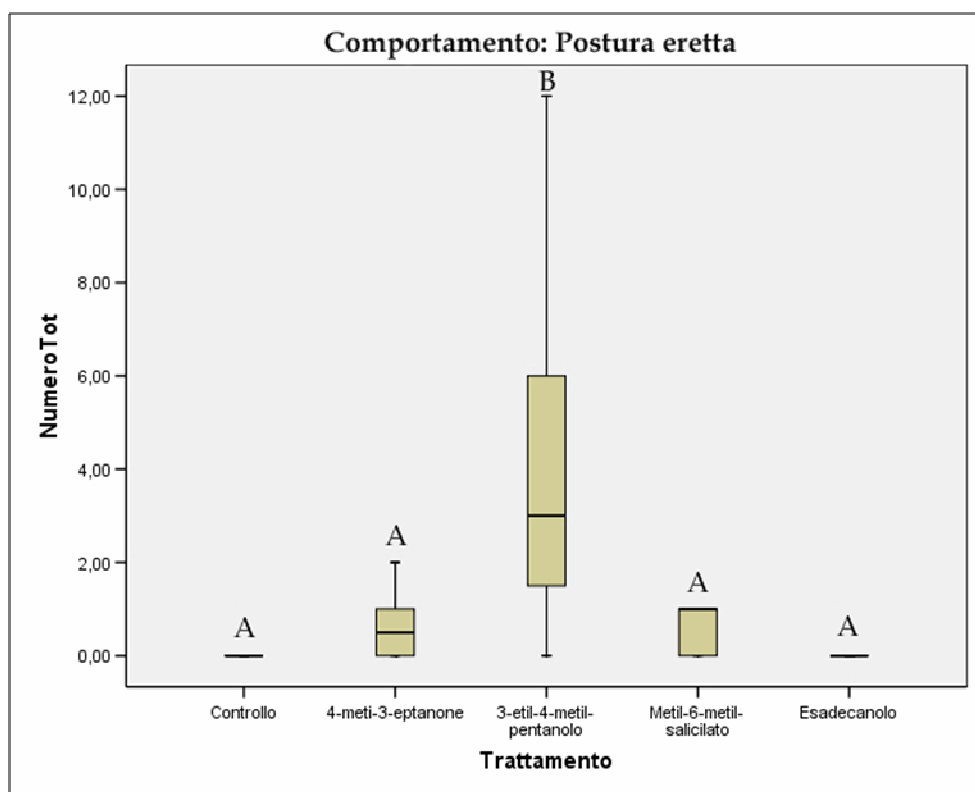


Figura 8.10
Grafico Box-Plot del numero totale di volte in cui viene osservato il comportamento Postura eretta. Le mediane con la stessa lettera non sono statisticamente differenti.

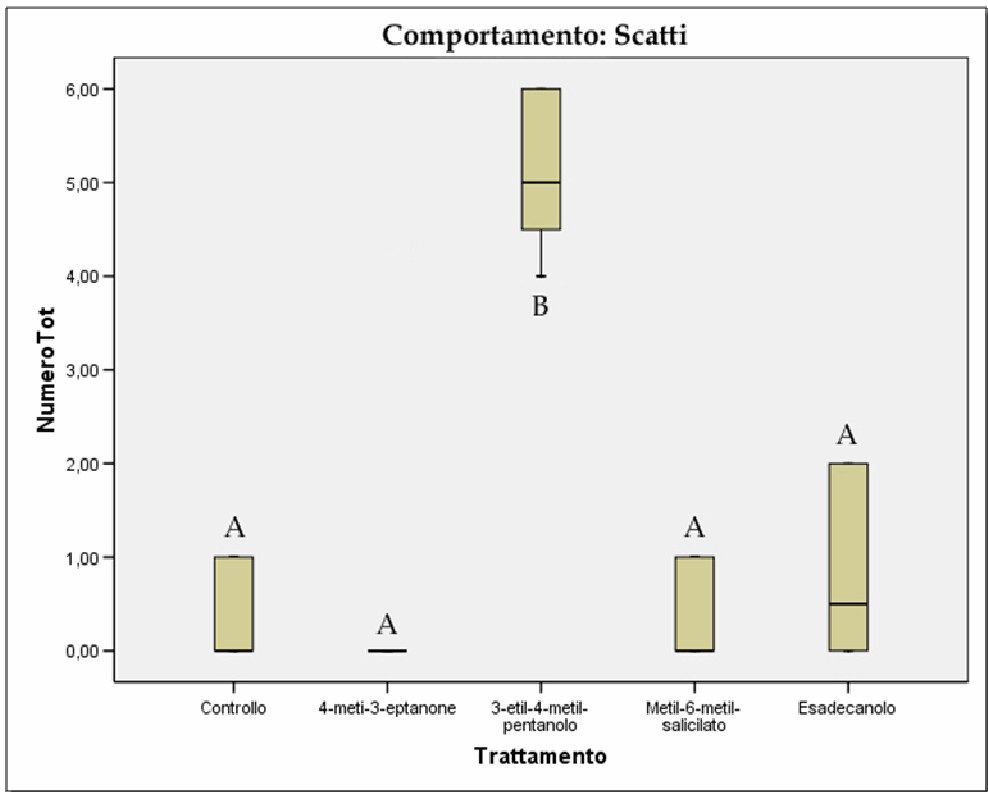


Figura 8.11
 Grafico Box-Plot del numero totale di volte in cui viene osservato il comportamento Scatti. Le mediane con la stessa lettera non sono statisticamente differenti.

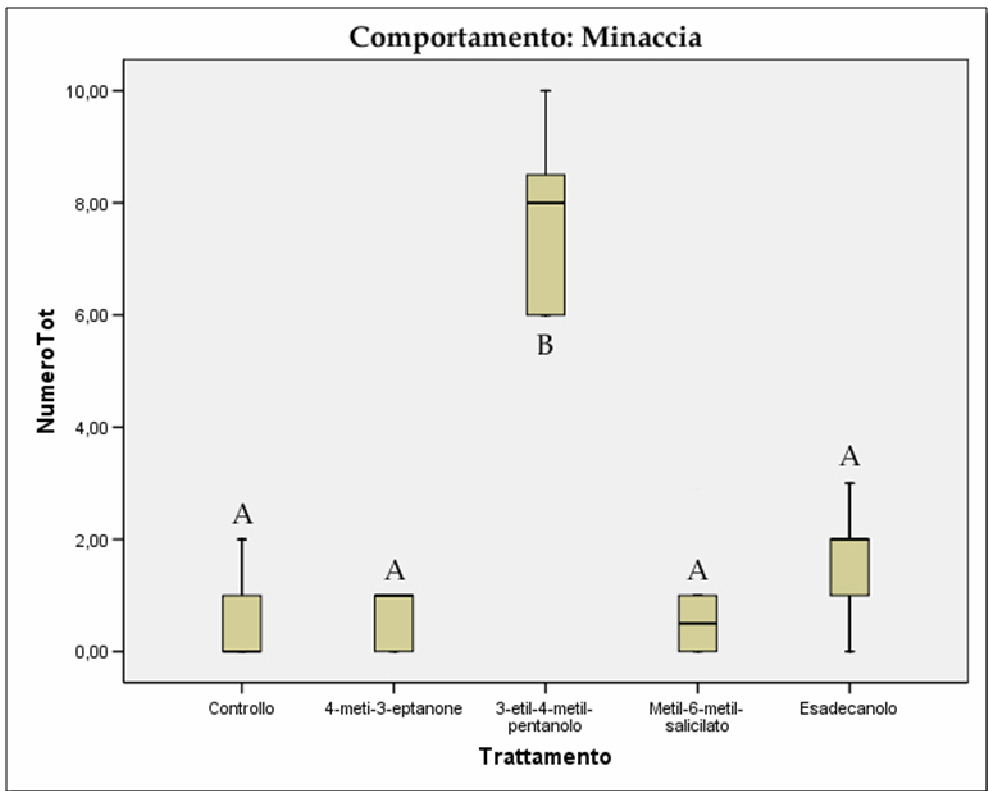


Figura 8.12
 Grafico Box-Plot del numero totale di volte in cui viene osservato il comportamento Minaccia. Le mediane con la stessa lettera non sono statisticamente differenti.

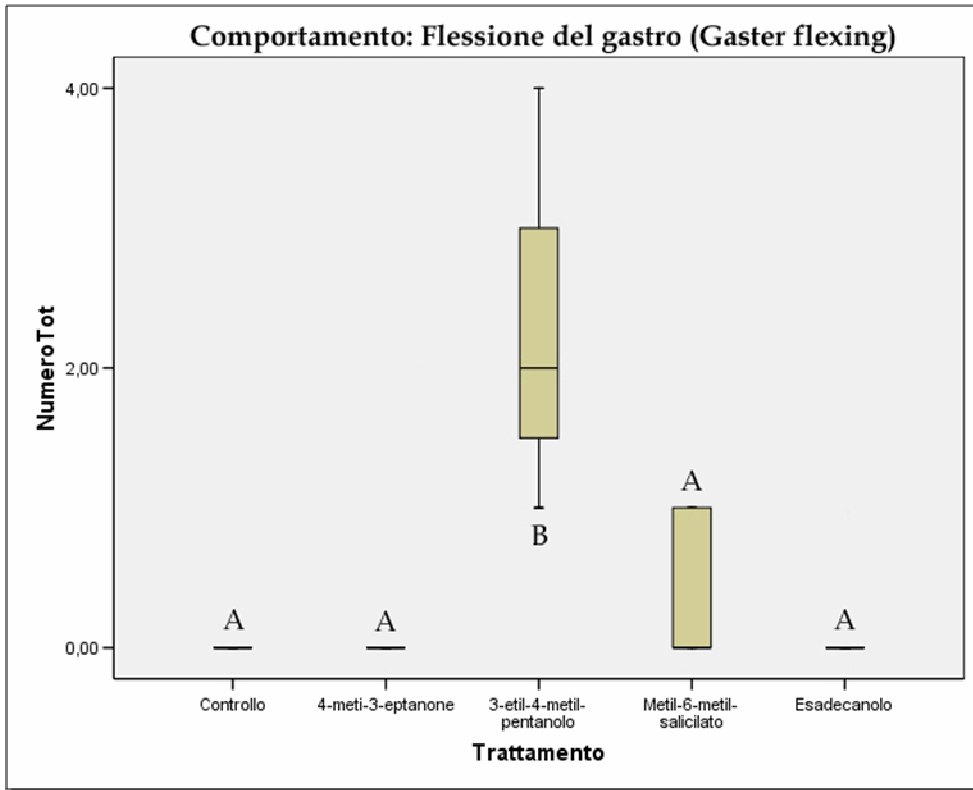


Figura 8.13
 Grafico Box-Plot del numero totale di volte in cui viene osservato il comportamento Flessione del gastro (Gaster flexing). Le mediane con la stessa lettera non sono statisticamente differenti.

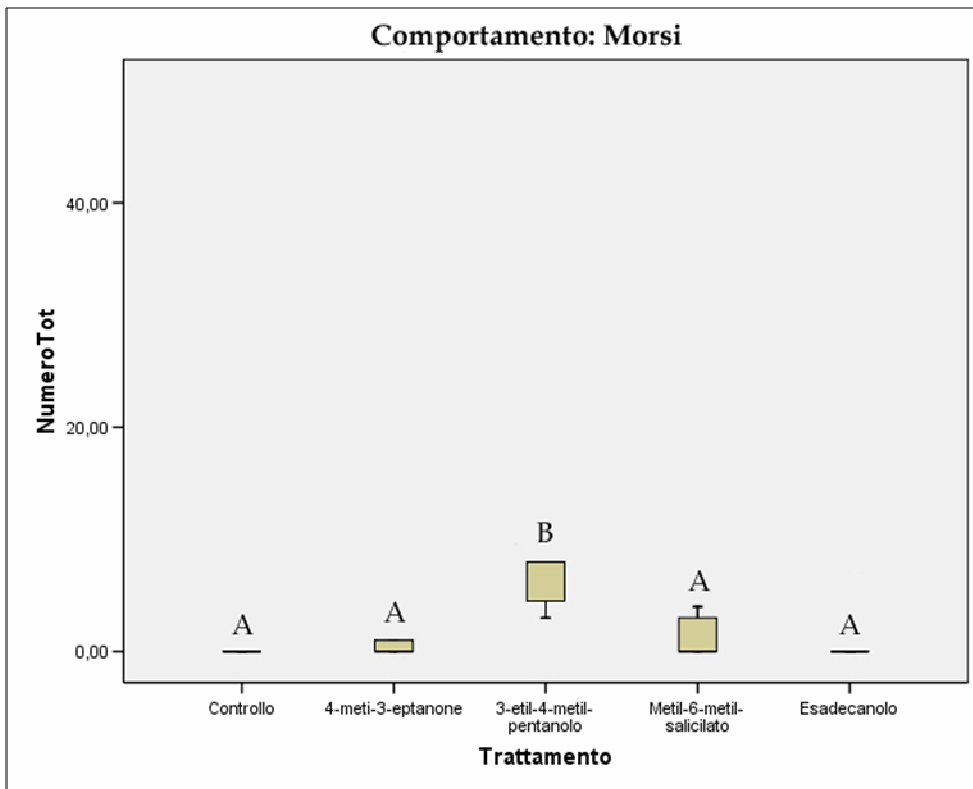


Figura 8.14
 Grafico Box-Plot del numero totale di volte in cui viene osservato il comportamento Morsi. Le mediane con la stessa lettera non sono statisticamente differenti.

Conclusioni

L'analisi chimica tramite gas-cromatografia accoppiata a spettrometria di massa ha permesso di individuare 10 sostanze presenti negli estratti delle ghiandole mandibolari di operaie di *F. cunicularia*. Cinque di questi (Nonaldeide, Metil-palmitato, Acido palmittico, Metil-stearato e Metil-oleato) sono sostanze lipidiche molto comuni che difficilmente potrebbero risultare coinvolte in un contesto di comunicazione chimica. Le cinque rimanenti sostanze potrebbero tutte essere coinvolte in processi comunicativi data anche l'alta volatilità che le caratterizza; l'Esadecanolo è risultato essere la più abbondante, comunque nessuna delle altre è presente in tracce ma sono tutte presenti in percentuali significative. Di particolare interesse è risultato essere il 4-metil-3-eptanone poiché esso è già stato individuato come sostanza presente nel secreto della ghiandola mandibolare in altre specie di formicidi: *Atta texana* (MOSER *et al.*, 1968), *Manica bradley* e *M. mutica* (FALES *et al.*, 1972), *Pachycondyla villosa* (DUFFIELD e BLUM, 1973), *Pogonomyrmex badius*, *P. californicus*, *P. desertorum*, *P. occidentalis* e *P. rugosus* (MCGURK *et al.*, 1966). In tutte queste il 4-metil-3-eptanone è stato dimostrato essere una componente attiva dei feromoni di allarme.

Nelle successive analisi comportamentali sono state saggiate le sostanze potenzialmente coinvolte nella comunicazione di allarme (il 4-etil-3-metil-acido pentanoico non è stato saggiato poiché non reperibile in commercio e la sintesi in laboratorio si è rivelata difficile e con rese di sostanze pura molto basse). Tutte le sostanze saggiate infatti sono altamente volatili e si diffondono molto velocemente, per questo sono state considerate tutte potenziali componenti del feromone di allarme in questa specie.

I risultati hanno dimostrato che tra queste, solo il 3-etil-4-metil-1-pentanololo ha provocato una reazione riconducibile alla reazione di allarme descritta nei capitoli precedenti. In particolare i risultati dell'analisi dei dati di "attività locomotoria" hanno dimostrato che tale sostanza ha un ruolo chiave nella fuoriuscita delle operaie dal nido e nel loro reclutamento nei pressi dell'area dello stimolo. Il valore del parametro di "entrate nella zona dello stimolo" dimostra l'alto stato di agitazione che le formiche mantengono una volta raggiunta la sorgente dello stimolo. Come per l'analisi precedente, anche nell'analisi dei moduli comportamentali il 3-etil-4-metil-1-pentanololo è stato l'unico ad evocare in modo significativo i comportamenti propri della reazione di allarme e della

difesa di gruppo: “postura eretta”, “movimento a scatti”, “minaccia a mandibole aperte”. In questo set sperimentale nella zona in cui veniva messa la sostanza da testare è stato messo anche un oggetto (un piccolo cubo di vetro) verso cui dirigere i comportamenti di aggressività più aperta come i morsi ed il “gaster flexing”; il 3-etil-4-metil-1-pentanololo ha evocato tali comportamenti in modo significativamente maggiore rispetto a tutte le altre sostanze ed al controllo.

In altre specie di formiche (*Gnaptogenys pleurodon* e *Pachycondyla soror*) il metil-6-metilsalicilato, prodotto però dalla ghiandola cefalica, risulta essere una componente attiva del feromone di allarme (DUFFIELD e BLUM, 1975; LONGHURST *et al.*, 1980). I risultati ottenuti sembrano escludere in *F. cunicularia* la presenza di questa sostanza tra le componenti attive di tale feromone. Non è però da escludere che questa sostanza agisca in sinergia con il 3-etil-4-metil-1-pentanololo allo scopo di provocare una reazione di allarme più intensa rispetto a quella provocata dalla sola aldeide. Questa azione sinergica è infatti già stata dimostrata nei feromoni sessuali della specie schiavista *Polyergus rufescens* (di cui *F. cunicularia* è ospite preferito) in cui il solo metil-6-metilsalicilato non induce alcuna attrazione nei confronti dei maschi, mentre una miscela di metil-6-metilsalicilato e 3-etil-4-metil-1-pentanololo risulta essere estremamente attrattiva (CASTRACANI *et al.*, IN PRESS).

Capitolo 10

CONCLUSIONI GENERALI

L'integrità di una colonia di formiche dipende in larga misura dall'abilità delle operaie che ne fanno parte di difenderla dalle numerose fonti di pericolo. La cooperazione tra i numerosi individui presenti rende estremamente efficaci i meccanismi difensivi di una colonia anche verso i nemici più pericolosi (BUSCHINGER e MASCHWITZ, 1984). Questa, come tutte le altre attività collettive che si svolgono all'interno e all'esterno del nido, si basa sull'invio di particolari segnali che avvertono le compagne dell'imminenza di un pericolo e, spesso, mediano l'organizzazione di reazioni di risposta. Come per la maggior parte dei comportamenti espressi dalle formiche, anche le risposte comportamentali alle fonti di disturbo sono principalmente mediate da segnali chimici prodotti dalle numerose ghiandole esocrine presenti nel loro corpo (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990; BILLEN e MORGAN, 1998). Questi segnali permettono di organizzare una difesa collettiva dal momento che, in un breve lasso di tempo, un solo individuo emettitore può informare più individui di un pericolo in arrivo, mobilitandoli verso un particolare settore dello spazio in modo da rendere il più efficace possibile la risposta difensiva. La difesa di gruppo nelle formiche è resa, quindi, possibile da fenomeni di comunicazione di allarme su base chimica. I feromoni di allarme sono, in genere, sostanze chimiche dalla natura estremamente volatile e vengono prodotti da una o più ghiandole esocrine (in successione o contemporaneamente) (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990). Le risposte comportamentali evocate variano da uno stato di allerta accompagnato da un aumento dell'attività locomotoria con fuga dalla sorgente dello stimolo, all'attrazione verso questa, fino alla manifestazione di comportamenti aggressivi aperti (morsi o emissione di sostanze difensive) (BUSCHINGER e MASCHWITZ, 1984).

Questa ricerca ha avuto come obiettivo quello di studiare, attraverso un approccio multidisciplinare, la reazione di allarme e la difesa cooperativa nelle due specie simpatriche *Formica cunicularia* e *Formica rufibarbis*.

La prima parte di questo studio ha dimostrato che la reazione difensiva di queste due specie nei confronti di potenziali pericoli percepiti nei pressi del nido è una reazione di Allarme Aggressivo (Aggressive Alarm) (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990). Questa reazione è caratterizzata da una rapida fuoriuscita delle operaie dal nido, dall'attrazione verso lo stimolo e dalla manifestazione di comportamenti aggressivi aperti. Questa reazione si è dimostrata essere diversa in funzione della pericolosità della minaccia che si presentava; maggiore era il pericolo, maggiore era l'intensità della risposta. Le reazioni più intense si sono manifestate infatti nei confronti del parassita *Polyergus rufescens*. Questo fenomeno prende il nome di "Enemy specification": una specie ha evoluto la capacità di riconoscere nemici particolarmente pericolosi e di adottare contro di essi specifiche misure difensive (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990). Nel contesto eco-etologico di queste specie, ed in particolare nel contesto coevolutivo ospite/parassita questo comportamento è vantaggioso quando una scout del parassita viene individuata nei pressi del nido; ucciderla significa infatti impedire che questa comunichi la posizione del nido alla colonia del parassita (LE MOLI *et al.*, 1994), impedendo quindi di subire una razzia e di conseguenza una grande perdita di prole e risorse.

La seconda parte di questo studio ha individuato le sorgenti ghiandolari dei feromoni di allarme delle due specie. In entrambe il secreto della ghiandola mandibolare ha un ruolo chiave nel provocare una risposta del tutto paragonabile a quella di Allarme Aggressivo osservata nella prima parte di questo lavoro. Il secreto di tale ghiandola induce infatti la fuoriuscita delle operaie dal nido, il reclutamento nei pressi della fonte dello stimolo e la manifestazione di comportamenti aggressivi. L'utilizzo del software "Ethovision Pro" ha anche permesso di dimostrare che il secreto di questa ghiandola induce nell'individuo un forte stato di agitazione, dimostrato dall'aumento dei parametri di velocità di movimento e di distanza percorsa, accompagnato da una intensa attività esplorativa, dimostrata dall'aumento del parametro di Turn Angle (parametro che esprime il cambiamento di direzione di un movimento). Quest'ultima analisi ha anche dimostrato il coinvolgimento della ghiandola del veleno in questo fenomeno; anche il secreto di tale ghiandola infatti induce nell'individuo un forte stato di agitazione ed una intensa attività esplorativa. In queste specie il secreto della ghiandola del veleno sembra avere assunto, per "ritualizzazione", anche un ruolo comunicativo (BLUM, 1985; HÖLLDOBLER e WILSON, 1990; BILLEN e MORGAN, 1998) essendo in grado di mediare un messaggio di pericolo e di allarme anche se non spruzzato direttamente contro

l'aggressore; in particolare la reazione di allarme evocata potrebbe avere una importante funzione nel suscitare allerta nei riceventi e indurre un aumento di agitazione allo scopo di rendere più efficace la risposta di difesa della colonia.

Questa approfondita analisi comportamentale ha dimostrato come la comunicazione di allarme in *F. cunicularia* ed in *F. rufibarbis* sia una comunicazione di tipo multimodale basata su feromoni (multisource alarm pheromon communication) (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990). In particolare il secreto della ghiandola mandibolare sembra essere coinvolto nelle fasi iniziali della reazione di allarme provocando l'uscita delle operaie dal nido e l'attrazione verso la fonte dello stimolo, mentre il secreto della ghiandola del veleno sembra esserne coinvolto in una fase successiva, quando la fonte di pericolo è già stata individuata e permetterebbe di mantenere alto e prolungato nel tempo lo stato di agitazione proprio di questa reazione difensiva.

L'ultima parte di questo studio è stata incentrata sull'analisi del contenuto della ghiandola mandibolare di operaie di *F. cunicularia* e sull'individuazione delle componenti attive del feromone di allarme in questa specie. L'analisi chimica è stata svolta in collaborazione con il Dipartimento di Chimica Organica dall'Università degli Studi di Parma. Il secreto della ghiandola mandibolare è stato estratto tramite solvente (diclorometano, CH_2Cl_2) ed è stato sottoposto a gas-cromatografia accoppiata a spettrometria di massa. I risultati hanno rivelato la presenza di 10 sostanze di cui solo 4 (4-metil-3-eptanone, 3-etil-4-metil-1-pentanololo, Metil-6-metilsalicilato, Esadecanololo) potrebbero essere coinvolte nella comunicazione di allarme poiché le altre sostanze individuate sono lipidi molto comuni che difficilmente potrebbero risultare coinvolti in un contesto di comunicazione chimica. In particolare il 4-metil-3-eptanone è la sostanza che più di tutte potrebbe essere una componente attiva in quanto è già stato dimostrato essere presente nella ghiandola mandibolare di altre specie di Formicidi, con funzione di feromone di allarme (MOSER *et al.*, 1968; FALES *et al.*, 1972; DUFFIELD e BLUM, 1973; MCGURK *et al.*, 1966).

I successivi bioassays comportamentali hanno dimostrato che il 4-metil-3-eptanone ha provocato una reazione di Allarme Aggressivo del tutto simile a quelle descritte in precedenza. Tale sostanza induce infatti la fuoriuscita delle operaie dal nido, il reclutamento nei pressi della fonte dello stimolo e la manifestazione di comportamenti aggressivi. Non è però da escludere che il Metil-6-metilsalicilato (che da solo non induce nessuna reazione significativa) agisca in sinergia con il 3-etil-4-metilpentanololo allo scopo

di provocare una reazione di allarme più intensa rispetto a quella provocata dalla sola aldeide. Questa azione sinergica è stata infatti dimostrata nella specie parassita *P. rufescens* (di cui *F. cunicularia* è ospite) (CASTRACANI *et al.*, IN PRESS).

Capitolo 11

RIASSUNTO

L'integrità di una colonia di formiche dipende in larga misura dall'abilità delle operaie che ne fanno parte di difenderla dalle numerose fonti di pericolo. La cooperazione tra i numerosi individui presenti rende estremamente efficaci i meccanismi difensivi di una colonia anche verso i nemici più pericolosi (BUSCHINGER e MASCHWITZ, 1984). Il meccanismo di difesa cooperativa si basa sull'invio di particolari segnali chimici prodotti dalle numerose ghiandole esocrine presenti nel loro corpo che avvertono le compagne dell'imminenza di un pericolo e mediano l'organizzazione delle reazioni di risposta (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990; BILLEN e MORGAN, 1998).

La prima parte di questa ricerca di dottorato ha avuto come obiettivo quello di caratterizzare la reazione di allarme delle due specie simpatriche *Formica cunicularia* e *Formica rufibarbis*. I bioassays comportamentali effettuati su frammenti di colonie hanno dimostrato che entrambe le specie attuano una strategia di Allarme aggressivo (Aggressive Alarm) e che la difesa cooperativa attuata è caratterizzata dal fenomeno dell'"Enemy specification", in particolare nei confronti del loro parassita *Polyergus rufescens*.

La seconda parte della ricerca è stata dedicata all'individuazione delle sorgenti ghiandolari dei feromoni di allarme sia di *F. cunicularia* che di *F. rufibarbis*. A tale scopo sono stati testati su frammenti di colonia e su singoli individui gli estratti del contenuto delle principali ghiandole esocrine delle Formicine. I risultati hanno dimostrato che per entrambe le specie il secreto della ghiandola mandibolare induce una risposta comportamentale del tutto paragonabile a quella dell'Allarme aggressivo. Inoltre anche il secreto della ghiandola del veleno sembra essere coinvolto in questo fenomeno ma solo nelle fasi successive. Quando le operaie sono già uscite dal nido ed hanno individuato la fonte di pericolo il secreto di tale ghiandola permette di mantenere alto e prolungato nel tempo lo stato di agitazione proprio di questa reazione difensiva.

L'ultima parte della ricerca è stata focalizzata sull'analisi del contenuto della ghiandola mandibolare di operaie di *F. cunicularia* e sull'individuazione delle componenti

attive del feromone di allarme in questa specie. L'analisi chimica effettuata con tecniche di Gas-cromatografia accoppiata a spettrometria di massa (GC-MS) ha individuato 10 sostanze presenti nel secreto della ghiandola mandibolare. Solo 4 di esse (4-metil-3-eptanone, 3-etil-4-metil-1-pentanololo, Metil-6-metilsalicilato, Esadecanololo) sono potenzialmente coinvolte in fenomeni di comunicazione chimica poichè le altre sono sostanze lipidiche molto comuni, difficilmente coinvolte in questi processi. Queste sostanze sono state saggiate in bioassays comportamentali su frammenti di colonia che hanno dimostrato il ruolo del 3-etil-4-metil-1-pentanololo nell'evocare risposte comportamentali tipiche dell'Allarme aggressivo. Il 3-etil-4-metil-1-pentanololo risulta quindi essere una componente attiva del feromone di allarme della specie *F. cunicularia*.

SUMMARY

The integrity of an ant colony mainly depends on the ability of the workers to defend it from many sources of danger. The effectiveness of the defensive mechanisms of a colony rests on a well organized cooperative defense (BUSCHINGER and MASCHWITZ, 1984). This is based on a suitable chemical communication. The production of chemical signals (produced by exocrine glands) warns about the presence of an approaching enemy and induces the right behavioural responses (HÖLLDOBLER and WILSON, 1990; BILLEN and MORGAN, 1998).

The first part of this research intended to characterize the alarm reaction of two sympatric species of the genus *Formica*: *F. cunicularia* and *F. rufibarbis*. Behavioural bioassays made on colony fragments showed that both species react to a potential threat for the colony in the same way. They both perform an "Aggressive Alarm" reaction (HÖLLDOBLER and WILSON, 1990), characterized by the exit of the workers from the nests, attraction towards the stimulus and aggressive behaviours. In this context the phenomenon of the "Enemy Specification" (HÖLLDOBLER and WILSON, 1990) was observed towards their obligate parasite *Polyergus rufescens*.

The second part of this research focused on the identification of the glandular sources of the alarm pheromones of the two studied species. Extracts of the main exocrine glands of Formicine were tested on colony fragments and on individual workers. The results shows that in both species the secretion of the mandibular gland induces a behavioural response comparable to the "Aggressive Alarm". Also the poison gland's secretion appears to be involved in this phenomenon.

The last part of this research focused on mandibular gland contents of workers of *F. cunicularia*. The chemical analysis identified 10 substances in the secretion of that gland. Only 4 of them (4-methyl-3-heptanone, 3-ethyl-4-methyl-1-pentanol, Methyl-6-methylsalicilate, Esadecanol) are potentially involved in chemical communication. Behavioural bioassays on colony fragments showed the role of the 3-ethyl-4-methyl-1-pentanol in inducing behavioural responses typical of the "Aggressive Alarm". Therefore

the 3-ethyl-4-methyl-1-pentanol is an active component of the alarm pheromone of the species *F. cunicularia*.

Capitolo 12

BIBLIOGRAFIA

- AA.VV., 1992 - Dizionario di Etologia, Einaudi, Torino. XVI + 868 pp.
- ALI M.F., ATTYGALE A.B, MORGAN E.D. e BILLEN J.P.J., 1987 - The Dufour gland substance of the workers of *Formica fusca* and *Formica lemni* (Hymenoptera: Formicidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 88: 59-63 pp.
- ALLIES A.B., BOURKE A.F. e FRANKS N.R., 1986 - Propaganda substance in the cuckoo ant *Leptothorax kutteri* and the slave-marker *Harpagoxenus sublaevis*. *J. Chem. Ecol.* 12: 1285-1293 pp.
- ALLOWAY T.M., 1990 - Slave-species ant colonies recognize slavemakers as enemies. *Animal Behaviour* 39(6): 1218-1220 pp.
- ATTYGALE A.B., MORGAN E.D., 1984 - Chemicals from the gland of ants. *Chemical Society Reviews* 13: 245-278 pp.
- BAKER T.C., CARDÉ R.T., 1984 - Techniques for behavioral bioassays. In: *Techniques in Pheromone Research*, H. E. Hummel and T. A. Miller eds., Springer-Verlag, New York.
- BERNARD F., 1968 - Les fourmis (Hymenoptera: Formicidae) d' Europe occidentale et septentrionale. Masson e Cie, Paris.
- BILLEN J., 1982 - The Dufour gland closing apparatus in *Formica sanguinea* Latreille (Hymenoptera: Formicidae). *Zoomorphology* 99: 235-244 pp.
- BILLEN J., 1993 - Morphology of the esocrine system in ants. In : *Proceedings of the Colloquia on Social Insects*. V.E. Kipyatkov (ed). Socium, St. Petersburg, 2: 1-15 pp.
- BILLEN J., MORGAN E.D., 1998 - Pheromone communication in social insects: sources and secretions. In: *Pheromone Communication in Social Insects* (R.K. Vander Meer, M.D. Breed, K.E. Espelie and M.L. Winston, Eds.), Westview Press, Boulder, Colorado, 3-33 pp.
- BILLEN J., GRASSO D.A., MORI A., LE MOLI F., 2001 - Structural and functional changes of the Dufour gland in gynes of the amazon ant *Polyergus rufescens* (Hymenoptera, Formicidae). *Zoomorphology* 121: 55-61 pp.

- BLATRIX R., HERBERS J.M., 2003 - Coevolution between slave-making ants and their hosts: host specificity and geographical variation. *Molecular ecology* 12: 2809-2816 pp.
- BLUM M.S., 1985 - Alarm pheromons. In: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* (Kerkut, G.A. and L.I. Gilbert, eds) Vol. 9: Behaviour. Pergamon Press: New York. 193-224 pp.
- BLUM M.S., HERMAN H.R., 1978 - Venoms e venom apparatuses of the Formicidae: Dolichoderinae and Anauretinae. In: *Arthropod venoms*. S. Bettini (ed). Springer, Berlin-Heidelberg-New York, 871-894 pp.
- BLUM M.S., WARTER S.L., 1966 - Chemical releasers of social behaviour. VII, The isolation of 2-heptatone from *Conomyrma pyramica* and its modus operandi as a releases of alarm and bigging behaviour. *Ann. Ent. Soc. Amer.* 59: 744-779 pp.
- BLUM M. S., DOOLITTLE R.E., BEROZA M., 1971 - Alarm pheromones: utilization in evaluation of olfactory theories. *J. Insect Physiol.* 17: 2351-2361 pp.
- BLUM M.S., PADOVANI F., HERMANN H.R., KANNOWSKI P.B., 1968 - Chemical releases of social behavior, XI: Terpenes in the mandibular glands of *Lasius umbratus*. *Ann. Entomol Soc. Am.* 61: 1354-1359 pp.
- BRADSHAW J.W.S., BARKER R., HOWSE P.E., 1979 - Multicomponent alarm pheromone in the mandubular glands of major worker of the African weaver ant, *Oecophylla longinoda*. *Physiol. Entomol.* 4: 15-25 pp.
- BRADSHAW J.W.S., HOWSE P.E., 1984 - Socialchemicals of ants. In: *Chemical ecology of insect*. W.J. Bell e R.T. Cardè (eds). Chapman and Hall Ltd., London, New York, 429-473 pp.
- BRANDT M., FOITZIK S., FISCHER-BLASS B., HEINZE J., 2005 - The coevolutionary dynamics of obligate ant social parasite systems – between prudence and antagonism. *Biological Reviews* 80: 251-267 pp.
- BREED M.D., 1998 - Recognition pheromones of the honey bee. *Bioscience*, 48: 463-470 pp.
- BROUGH E.J., 1983 - The antimicrobial activity of mandibular gland secretion of a formicine ants, *Colomyrmex* sp. (Hymenoptera: Formicidae). *J. Invertebr. Pathos.* 42: 306-311 pp.
- BROWN W.L., 1968 - An hypothesis concerning the function of the metapleural glands in ants. *Am. Nat.* 102: 188-191 pp.
- BUSCHINGER A., MASCHWITZ U., 1984 - Difensive behaviour and difensive mechanisms in ant. In: *Defensive mechanisms in social insect*. H.R. Hermann (ed.), Praeger Publishers, New York, 99-150 pp.

- CASTRACANI C., TAMARRI V., GRASSO D.A., LE MOLI F., PALLA G., MILLAR J., FRANKE W., MORI A. - Chemical communication in mating behaviour of the slave-making ant *Polyergus rufescens* (Hymenoptera, Formicidae): 3-ethyl-4-methylpentanol as a critical component of the queen sex pheromone. *Insectes sociaux*. In press.
- CREIGHTON W.S., 1950 - The ants of North America. *Bull. Mus. Comp. Zool.* 104: 1-585 pp.
- D'ETTORRE P., BRUNNER E., WENSEELER T., HEINZE J., 2004 - Knowing your enemy: seasonal dynamics of host-social parasite recognition. *Naturwissenschaften* 91: 594-597 pp.
- DUFFIELD R.M., BLUM M.S., 1973 - 4-Methyl-3-heptanone: identification and function in *Neoponera villosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Annals of the Entomological Society of America* 66(6): 1357 p.
- DUFFIELD R.M., BLUM M.S., 1975 - Methyl 6-methyl salicylate: identification and function in a ponerine ant (*Gnamptogenys pleurodon*). *Experientia* 31(4): 466 p.
- DUFFIELD R.M., BEAND J.M., BLUM M.S., 1977 - 6-methyl-5-hepten-2-one in *Formica* species: identification and function as an alarm pheromone (Hymenoptera: Formicidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 70: 309-310 pp.
- DUFFIELD R.M., BLUM M.S., WHEELER J.W., 1976 - Alkylpyrazine alarm pheromone in primitive ants with small colonial units. *Comp. Biochem. Physiol.* 54B: 439-440 pp.
- EDMUND M., 1974 - Defence in animals. Longman Group Ltd., Harlow, England.
- ERRARD C, HEFETZ A., 1997 - Label familiarity and discriminatory of ants reared in mixed groups. *Insectes sociaux* 44: 189-198.
- FALES H.M., BLUM M.S., CREWE R.M., BRAND J.M., 1972 - Alarm pheromones in the genus *Manica* derived from the mandibular gland. *Journal of Insect Physiology* 18(6): 1077-1088 pp.
- FEENER D.H., 1986 - Alarm-recruitment behaviour in *Pheidole militica* (Hymenoptera: Formicidae). *Ecological Entomology* 11(1): 67-74 pp.
- FEENER D.H., 1987 - Response of *Pheidole morrisoni* to two species of enemy ants, and a general mode of defense behavior in *Pheidole* (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Kansas Entomological Society* 60(4): 569-575 pp.
- FINCH S., 1986 - Assessing host-plant finding by insects. In: *Insect-Plant Interactions*, Miller J.R and Miller T.A. eds, Springer-Verlag, New York, pp. 23-63 pp.

- FOITZIK S., HERBERS J.M., 2001 - Colony structure of a Slavemaking ant. II. Frequency of slave raids and impact on the slave population. *Evolution* 55(2): 316-323 pp.
- FOITZIK S., FISHER B., HEINZE J., 2003 - Arms races between social parasite and their hosts: geographic patterns of manipulation and resistance. *Behavioral Ecology* 14(2): 80-88 pp.
- FOREL A., 1920 - Les fourmis de la Suisse 2 nd ed. Impr. Cooperative, La Chaux-de-Fond, Switzerland.
- FRANKS N.R., IRELAND B., BOURKE A.F.G., 1990 - Conflicts, Social economics and life-history strategies in ants. *Behavioural Ecology and Sociobiology* 27(3): 175-181 pp.
- GHENT R.L., 1961 - Adaptive refinements in the chemical defensive mechanisms of certain Formicinae. Ph. D. Thesis. Cornell University, Ithaca, New York.
- GRASSO D.A., MORI A., LE MOLI F., 1999 - Recruitment and trail communication in two species of *Messor* ant (Hymenoptera, Formicidae). *Insect sociaux* 52: 36-44 pp.
- GRASSO D.A., SLEDGE M.F., LE MOLI F., MORI A., TURILLAZZI S., 2005 - Nest area marking with traces: a chemical signature that allows colony-level recognition in seed harvesting ants (Hymenoptera, Formicidae). *Insectes sociaux* 52: 36-44 pp.
- GRASSWITZ T.R., JONES G.R., 2003 - Chemical Ecology. In: *Nature Encyclopedia of Life Sciences*, Nature Publishing Group, London, <http://www.els.net>.
- HARA T.J., 1994 - The diversity of chemical-stimulation in fish olfaction and gestation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 4: 1-35 pp.
- HARDEE D.D., MITCHELL E.B., HUDDLESTON P.M., 1966 - Effect of age, nutrition, sex, and time of day on response of boll weevils to an attractant from cotton. *Annals of Entomological Society of America*, 59: 1024-1025 pp.
- HARE J.D., 1998 - Bioassay Methods with Terrestrial Invertebrates. In: *Methods in Chemical Ecology: Bioassay Methods*, Haynes K. F. and Millar J. G. eds., Kluwer Academic Publishers.
- HECKER E., BUTENANDT A., 1984 - Bombiskol revisited - reflections on a pioneering period and on some of its consequences. In: *Techniques in pheromones research*, Hummel & Miller eds., Springer-Verlag, New York, 1-44 pp.

- HEFETZ A., BLUM M.S., 1978 - Biosynthesis and accumulation of formic acid in the poison gland of the carpenter ant *Camponotus pennsylvanicus*. *Science* 201: 454-455 pp.
- HERMANN H.R., BLUM M.S., 1967a - The morphology and history of the hymenopterous poison apparatus, II: *Pogonomyrmex badius* (Formicidae) *Amm. Entomol. Soc. Am.* 60: 661-668 pp.
- HERMANN H.R., BLUM M.S., 1967b - The morphology and history of the hymenopterous poison apparatus, II: *Eciton hamatum* (Formicidae) *Amm. Entomol. Soc. Am.* 60: 1282-1291 pp.
- HERMANN H.R., BLUM M.S., 1981 - Defensive mechanisms in the social Hymenoptera. In: *Social Insect* H.R. Hermann (ed.), Vol. II, Academic Press, New York, 77-197 pp.
- HÖLLDOBLER B., 1978 - Ethological aspects of chemical communication in ants. In: *Advances in the study of behaviour*, Rosenblatt J. S., Hinde R. A., Beer C. and Busnel M. C. eds., Academic Press, New York, 8: 75-115 pp.
- HÖLLDOBLER B., 1981 - Trail communication in the dacetine ants *Orectognathus versicolor* (Hymenoptera, Formicidae). *Psyche* 88: 245-257 pp.
- HÖLLDOBLER B., 1982a - Communication, raiding behaviour and prey storage in *Cerapachys* (Hymenoptera, Formicidae). *Psyche* 89: 3-23 pp.
- HÖLLDOBLER B., 1982b - The cloacal gland, new pheromone gland in ant. *Naturwissenschaften* 69: 186-187 pp.
- HÖLLDOBLER B., 1984 - Evolution of insect communication. Pp. 349-377. In: *Insect communication. 12th Symposium of the Royal Entomological Society of London*, Lewis T. ed., Academic Press, London. XVII + 414 pp.
- HÖLLDOBLER B., 1986 - Food robbing in ants, a form of interference competition. *Oecologia* 69(1): 12-15 pp.
- HÖLLDOBLER B., 1987 - Communication and competition in ant communities. In Kawano S, Connel JH, Hidaka T, editors., *Evolution and coadaptation in biotic communities (Proceedings of the Second International Symposium held in conjunction with the International Prize for Biology, Tokyo, 1986)*, pp. 95-124. Tokyo University Press, Tokyo.
- HÖLLDOBLER B., ENGEL H, 1978 - Tergal and sternal glands in ants. *Psyche* 85: 285-330 pp.
- HÖLLDOBLER B., ENGEL-SIEGEL H., 1984 - On the metapleural gland of ants. *Psyche* 91: 201-224 pp.

- HÖLLDOBLER B. e MASCHWITZ U., 1965 - Der Hochzeitsschwarm der
Rossameise *Camponotus herculeanus* L.(Hym. Formycidae). Z.Vergl.
- HÖLLDOBLER B., MÖGLICH M., MASCHWITZ U., 1974 - Communication by
tandem running in the ant *Camponotus sericeus*. *J. Comp. Physiol.* 90: 105-127
pp.
- HÖLLDOBLER B., WILSON E.O., 1970 - Recruitment trails in the harvester ant
Pogonomyrmex badius. *Psyche*, 77: 385-399 pp.
- HÖLLDOBLER B., WILSON E.O., 1978 - The multiple recruitment systems of the
African Weaver ant *Oecophylla longinoda* (Latreille) (Hymenoptera:
Formicidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 3: 19-60 pp.
- HÖLLDOBLER B., WILSON E.O., 1990 – The Ants. Springer Verlag, Berlin, 732 pp.
- HOWSE P.E., STEVENS I.D.R., JONES O.T., 1998 - Insect Pheromones and their Use
in Pest Management. Chapman & Hall, London.
- JANET C., 1898 - Systèm glandulaire tégumentaire de la *Myrmica rubra*: observation
diverses sur le fourmis. G.Carrè et C. Naud.
- JONES G.R., OLDHAM N.J., 1999 - Pheromone analysis using capillary gas
chromatographic techniques. *Journal of Chromatography A*, 843:199-236 pp.
- KELLOG F.E., WRIGHT R.J., 1962 – The olfactory guidance of flying insect. III. A
technique for observing and recording flight paths. *Canadian Entomologist*, 94:
486-493 pp.
- KNOLS B.G.J., DE JONG, R. e TAKKEN W., 1994 – Trapping system for testing
olfactory responses of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* in a wind
tunnel. *Medical and Veterinary Entomology*, 8: 386-388 pp.
- KUGLER C., 1978 - A comparative study of the myrmicine sting apparatus
(Hymenoptera: Formicidae). *Studia Entomol.* 20: 413-548 pp.
- LACEY R.C. e SHERMAN P.W., 1983 - Kin recognition by phenotype matching.
American Naturalist 121: 544-546 pp.
- LAW J.H., REGNIER F.E., 1971 - Pheromones. *Annual Review of Biochemistry*, 40: 533-
548 pp.
- LAW J.H., WILSON E.O., McCLOSKEY J.A., 1965 - Biochemical polymorphism in
ants. *Science* 149:544-546 pp.
- LE MOLI F., GRASSO D.A., MORI A., UGOLINI A., 1994 - Eco-ethological factors
affecting the scouting and raiding behaviour of the slave-making ant,
Polyergus rufescens Latr. (Hymenoptera, Formicidae). *Ethology* 96: 289-302 pp.

- LENOIR A., D'ETTORRE P., ERRARD C., HEFETZ A., 2001 - Chemical ecology and social parasitism in ants. *Annual Review of Entomology* 46: 573-599 pp.
- LONGHURST C., BAKER R., HOWSE P.E., 1980 – A multicomponent mandibular gland secretion in the ponerine ant *Bothroponera soror* (Emery). *Journal of Insect Physiology* 26(8): 551-555 pp.
- MAIDL F., 1934 - Die Lebensgewohnheiten und Instinkten der staatenbildenden Insekten. Verlag Fritz Wagner, Vienna. X + 823 pp.
- MALOSSE C., RAMIREZ-LUCAS P., ROCHAT D., MORIN J.P., 1995 – Solid-phase microextraction, an alternative method for the study of airborne insect pheromones (*Metamasius-hemipterus*, Coleoptera, Curculionidae). *Journal of high resolution chromatography*, 18 (10): 669-670 pp.
- MASCHWITZ U., 1964 - Gefahrenalarmstufe und Gefahrenalarmierung bei sozialen Hymenoptera. *Z. Vergl. Psychol.* 47: 596-655 pp.
- MASCHWITZ U., 1974 - Vergleichende Untersuchungen zur Funktion der Ameisenmetathorakdrüse. *Oecologia* 16: 303-310 pp.
- MASCHWITZ U., MASCHWITZ E., 1974 - Platzende Arbeiterinnen: Ein neue Art der Fendaabwehr bei sozialen Hautflüglern. *Oecologia* 14: 289-294 pp.
- McGURK D.J., FROST J., EISENBRAUN E.J., VICK K., DREW W.A., YOUNG J., 1966 – Volatile compounds in ants: identification of 4-Methyl-3-heptanone from *Pogonomyrmex* ants. *Journal of Insect Physiology* 12(11): 1435-1441 pp.
- MORGAN E.D., 1984 - Chemical words and phrases in the language of pheromones for foraging and recruitment. In: *Dizionario di Etologia*. Mainardi D. (ed.). Einaudi, Torino, 314-317 pp.
- MORI A., GRASSO D.A., LE MOLI F., 1991 - Eco-ethological study on raiding behaviour of the European amazon ant, *Polyergus rufescens* Latr. (Hymenoptera, Formicidae). *Ethology* 88: 46-62 pp.
- MORI A., GRASSO D.A., D'ETTORRE P., LE MOLI F., 1994 - Specificity in host choice by the slave-making ant *Polyergus rufescens* Latr. (Hymenoptera Formicidae). *Ethology Ecology & Evolution Special Issue* 3: 89-93 pp.
- MORI A., GRASSO D.A., VISICCHIO R., LE MOLI F., 2000a - Colony founding in *Polyergus rufescens*: the role of the Dufour's gland. *Insectes sociaux*. 47: 7-10 pp.
- MORI A., GRASSO D.A., VISICCHIO R., LE MOLI F., 2001c - Comparison of reproductive strategies and raiding behaviour in facultative and obligatory slave-making ants: the case of *Formica sanguinea* and *Polyergus rufescens*. *Insectes Sociaux* 48(4): 302-314 pp.

- MORI A., VISICCHIO R., SLEDGE M.F., GRASSO D.A., LE MOLI F., TURILLAZZI S., SPENCER S., JONES G.R., 2000b - Behavioural assay testing the appeasement allomone of *Polyergus rufescens* queen during host-colony usurpation. *Ethol. Ecol. Evol.* 12: 315-322 pp.
- MOSER J.C., BROWNLEE R.C., SILVERSTEIN R., 1968 - Alarm pheromones of the ant *Atta texana*. *Journal of Insect Physiology* 14(4): 529-535 pp.
- OLUBAJO O., DUFFIELD R.M., WHEELER J.W., 1980 - 4-Heptatone in the mandibular glands secretion of the Nearctic ant, *Zacryptocerus varians* (Hymenoptera: Formicidae). *Ann. Ent. Soc. Amer.* 73: 93-94 pp.
- PARRY K., MORGAN E.D., 1979 - Pheromones of ants: a review. *Physiol Entomol* 4: 161-189 pp.
- PERCY J.E., WETHERSON J., 1974 - Gland structure and pheromone production in insect. In: *Pheromones*, M.C. Birch, ed., North-Holland, Amsterdam, 11-34 pp.
- SCHUMACHER A., WHITFORD W.G., 1974 - The foraging ecology of two species of Chihuahuan desert ant: *Formica perpilosa* and *Trachymyrmex smithi neomexicanus* (Hymenoptera: Formicidae). *Insect Sociaux* 21: 317-330 pp.
- SPARCKS M.R., CHEATHAM J.S., 1970 - Responses of laboratory strain of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, to artificial oviposition site. *Annals of the Entomological Society of America*, 63: 428-431 pp.
- STEINBERG S., DICKE M., VET L.E.M., WANNIGEN R., 1992 - Response of the braconid parasitoid *Cotesia* (= *Apanteles*) *glomerata* to volatile infochemicals: effect of bioassay set-up, parasitoid age and experience and barometric flux. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 63: 163-175 pp.
- TOPOFF H., COVER S., GREENBERG L., GOODLOE L., SHERMAN P., 1988 - Colony founding by queens of the obligatory slave-making ant, *Polyergus breviceps*: the role of the Dufour gland. *Ethology* 78: 209-218 pp.
- TRAYNIER R.M.M., 1967 - Effect of host plant odour on the behaviour of the adult cabbage root fly, *Erioischia brassicae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 10: 321-328 pp.
- VANDER MEER R.K., ALONSO L.E., 1998 - Pheromone directed behavior in ants. In Vander Meer R.K., Breed M., Winston M. and Espelle K.E. (ed.), *Pheromone communication in social insect*, Westview Press, Boulder, CO., 159-192 pp.
- VANDER MEER R.K., WILSON F.D., LOFGREN C.S., 1981 - Hydrocarbon components of the trail pheromone of the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*. *Tetrahedron Letters* 22: 1651-1654 pp.

- VET L.E.M., VAN LENTEREN J.C., HEYMANS M., MEELIS E., 1983 – An airflow olfactometer for measuring olfactory responses of *hymenopterous parasitoids* and other small insects. *Physiological Entomology*, 8: 536-542 pp.
- VISICCHIO R., MORI A., GRASSO D.A., CASTRACANI C., LE MOLI F., 2001 - Glandular sources of recruitment, trail, and propaganda semiochemicals in the slave-making ant *Polyergus rufescens*. *Ethology Ecology and Evolution* 4(13): 363-374 pp.
- WASMANN E., 1899 - Die psychischen Fähigkeiten der Ameisen. *Zoologica, Stuttgart* 11: 1-133 pp.
- WHEELER W.M., 1910 - Ants. Columbia Univ. Press, New York.
- WHELDEN R.M., 1960 - The anatomy of *Rhytidoponera metallica* F. Smith (Hymenoptera, Formicidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 53: 793-808 pp.
- WILSON E.O., 1958 - A chemical releaser of alarm and digging behaviour in the ant *Pogonomirmex badius* (Latreille). *Psyche* 65: 41-45 pp.
- WILSON E.O., 1971 – The insects societies. Belknap Press of Harvard University Press Cambridge, X + 548 pp.
- WILSON E.O., 1975 - Enemy Specification in the alarm-recruitment system of ant. *Science* 190: 798-800 pp.
- WILSON E.O., BOSSERT W. H., 1963 - Chemical communication among animals. *Recent Progress in Hormone Research*, 19:673-716 pp.
- WILSON E.O., BOSSERT W.H., 1963 - The analysis of olfactory communication among animals. *J. Theor. Biol.* 5: 443-469 pp.
- WILSON E.O., REGNIER F. E., JR., 1971 - The evolution of the alarm-defense system in the formicine ants. *American Naturalist*, 105: 279-289 pp.
- WYATT T.D., 2003 - Pheromones and Animal Behaviour: communication by smell and taste. Cambridge University Press, Cambridge.