

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA**

**DIPARTIMENTO DI BIOSCIENZE**

Dottorato di Ricerca in BIOLOGIA DEL COMPORTAMENTO

Ciclo XXVIII

**INTERAZIONI PIANTE-INSETTI:**

**RUOLO DELLE FORMICHE IN UN SISTEMA MULTITROFICO**

**Aspetti ecoetologici ed applicativi**

Coordinatore del Dottorato di Ricerca:

Chiar.mo Prof. STEFANO PARMIGIANI

Tutori:

Chiar.mo Prof. DONATO A. GRASSO

Chiar.ma Prof.ssa ALESSANDRA MORI

Dottorando:

MAURO SCETTINO

<b>1. INTRODUZIONE.....</b>	<b>1</b>
1.1 Le reti trofiche.....	1
1.2 Interazioni piante-insetti.....	3
1.2.1 Gli allelochimici.....	4
1.2.2 HIPVs.....	5
1.3 Interazioni piante-formiche.....	6
1.4 Interazioni formiche-insetti.....	8
1.4.1 La trofobiosi.....	8
1.4.2 La predazione.....	9
1.5 Impatto delle formiche negli agroecosistemi.....	10
1.6 Le formiche all'interno delle reti trofiche.....	12
<b>2 SCOPI DELLA RICERCA.....</b>	<b>14</b>
<b>3 LINEE GENERALI DELLA TESI.....</b>	<b>15</b>
<b>SEZIONE 1 INTERAZIONI FORMICHE-INSETTI</b>	
<b>4 MATERIALI E METODI.....</b>	<b>17</b>
4.1 Le specie del sistema multitrofico sperimentale.....	17
4.1.1 La pianta.....	17
4.1.2 Gli insetti.....	19
4.1.3 Sincronizzazione dei cicli vitali.....	31
4.2 Il sistema sperimentale.....	32
4.2.1 Esperimenti sul network multitrofico.....	32
4.2.2 Calcolo dell'Indice di Aggressività IA.....	37
4.2.3 Significato degli esperimenti sul network multitrofico.....	39

4.2.4	Esperimenti con le fighting box.....	39
4.2.5	Significato degli esperimenti con le fighting box.....	41
4.3	Analisi dei dati.....	41
4.3.1	Livello di predazione.....	42
4.3.2	Indici di Aggressività.....	42
4.3.3	Comportamento di <i>A. aphidimyza</i> in presenza di formiche.....	42
<b>5</b>	<b>RISULTATI.....</b>	<b>44</b>
5.1	Comportamento di <i>F. pratensis</i> verso <i>M. brassicae</i> .....	44
5.1.1	Predazione su <i>M. brassicae</i> .....	44
5.1.1.1	Confronto tra presenza e assenza di formiche.....	44
5.1.1.2	Confronto tra i trattamenti.....	44
5.1.2	Indici di aggressività.....	50
5.1.2.1	Continuous sampling.....	50
5.1.2.2	Scanning sampling.....	51
5.1.2.3	Fighting box.....	56
5.2	Comportamento di <i>F. pratensis</i> verso <i>A. aphidimyza</i> .....	58
5.2.1	Predazione su <i>A. aphidimyza</i> .....	58
5.2.1.1	Confronto tra presenza e assenza di formiche.....	58
5.2.2	Indici di aggressività.....	62
5.2.2.1	Continuous sampling.....	62
5.2.2.2	Scanning sampling.....	63
5.3	Comportamento di <i>A. aphidimyza</i> .....	65
<b>6</b>	<b>DISCUSSIONE.....</b>	<b>69</b>

## **SEZIONE 2 INTERAZIONI PIANTE-FORMICHE**

<b>7 MATERIALI E METODI.....</b>	<b>74</b>
7.1 Le specie del sistema multitrofico sperimentale.....	74
7.1.1 Le piante.....	74
7.1.2 Gli insetti.....	77
7.2 Il sistema sperimentale.....	80
7.2.1 Esperimenti in olfattometro.....	80
7.2.2 Programmazione degli esperimenti.....	82
7.2.3 Raccolta delle sostanze volatili prodotte dalle piante.....	84
7.2.4 Programmazione degli esperimenti.....	86
7.2.5 Analisi delle sostanze volatili in GS-MS.....	87
7.3 Analisi dei dati.....	89
<b>8 RISULTATI.....</b>	<b>90</b>
8.1 Esperimenti in olfattometro.....	90
8.2 Emissione di sostanze volatili dalle piante.....	96
8.2.1 Emissione delle piante di <i>C. sativus</i> .....	96
8.2.2 Emissione delle piante di <i>S. tuberosum</i> .....	106
<b>9 DISCUSSIONE.....</b>	<b>115</b>
<b>10 CONCLUSIONI GENERALI.....</b>	<b>118</b>
<b>11 RIASSUNTO.....</b>	<b>120</b>
<b>12 BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>122</b>

# 1 INTRODUZIONE

## 1.1 Le reti trofiche

Una rete trofica è un sistema complesso di organismi di specie diverse appartenenti al medesimo ambiente che interagiscono vicendevolmente attraverso i processi di acquisizione delle risorse alimentari. (Morlacchi 2010).

Tipicamente è costituita da uno o più organismi autotrofi definiti produttori che sono in grado, utilizzando una fonte di energia, di produrre sostanze organiche e da una serie organismi eterotrofi definiti consumatori che incamerano sostanze organiche sfruttando gli organismi produttori o alimentandosi di altri organismi consumatori (Odum 2007).

Gli insetti, costituendo quasi i due terzi della biomassa animale totale e trovandosi in moltissimi ecosistemi terrestri, giocano un ruolo chiave all'interno delle reti trofiche (Weisser & Siemann 2004. Speight *et al* 2008).

Una semplificazione del concetto di rete trofica è la catena trofica, nella quale i rapporti trofici tra gli organismi seguono un andamento lineare ed in cui è possibile individuare dei livelli trofici caratterizzati dalle modalità con cui gli organismi traggono energia dall'ambiente. Fig.1a

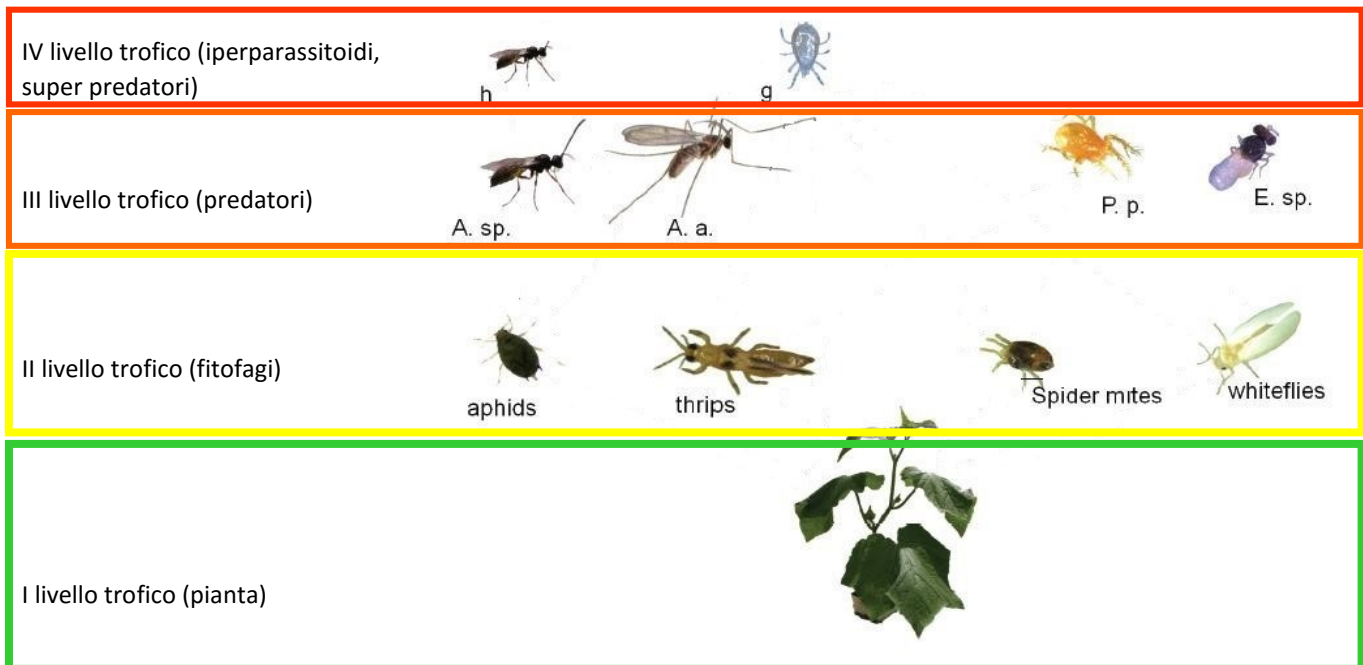


Figura 1a Rappresentazione di una catena trofica nel mondo degli artropodi con la pianta di cetriolo come produttore primario. (Messelink *et al.* 2012, modificato)



Il processo più importante delle dinamiche trofiche è il trasferimento di energia e biomassa da una parte all'altra del sistema. Questi flussi possono essere dal basso verso l'alto (bottom-up) o dall'alto verso il basso (top-down) (Hairston *et al.* 1960). Un esempio di fattore che influenza il flusso bottom up è dato dalla qualità della pianta che condiziona la popolazione del fitofago che a sua volta influenza la fitness del predatore. Un esempio di flusso top-down è la regolazione da parte del predatore della popolazione di erbivori fitofagi, che va ad influire sulla fitness della pianta.

Nelle reti trofiche è importante considerare l'interazione tra questi due processi regolatori, per comprendere gli effetti combinati che ne risultano. In altre parole, per studiare i complessi sistemi naturali è necessaria una visione complessiva, che consideri tutti i possibili effetti, risultanti dalle interazioni tra più organismi. (Hunter e Price 1992; Polis 1994; Polis e Strong 1996; Tschamntke e Hawkins 2002; Odum 2007). Studiare le interazioni tra le specie componenti le reti trofiche è di notevole importanza per ampliare la conoscenza dei sistemi naturali e degli agroecosistemi e degli equilibri che li interessano. Inoltre gli studi sulle reti trofiche possono anche avere riscontri di tipo applicativo, per esempio in campo agrario in materia di controllo biologico. Infatti, è necessario conoscere nel dettaglio le dinamiche di un sistema multitrofico, in modo da progettare un efficiente programma di gestione degli insetti dannosi in modo ecologico e sostenibile (Janssen *et al.* 1998; Janssen e Sabelis 2004; Tschamntke e Hawkins 2002; Bohan *et al.* 2013)

## **1.2 Interazioni piante-insetti**

Gli insetti e le piante nel corso del loro cammino evolutivo hanno sviluppato rapporti strettamente intrecciati in cui si manifestano tutti i tipi di interazioni trofiche.

In questo senso, salvo il caso delle piante carnivore, sono gli insetti che, operando da consumatori primari, sfruttano le risorse nutritive costituite dalle piante, da parti di esse o dalla linfa.

La fitofagia ha determinato una reazione evolutiva da parte delle piante che si è concretizzata in due diverse strategie di difesa.

1. Le difese costitutive, sempre presenti indipendentemente dalla presenza dei fitofagi. Possiamo annoverare tra questo tipo di difesa la modificazione di parti della pianta in spine, peli, tricomi ecc, la presenza all'interno della pianta o di parti di essa di sostanze chimiche deterrenti, fagoinibitrici o tossiche o l'emissione di sostanze volatili attrattive per i predatori degli insetti dannosi (allelochimici).

## 2. Le difese indotte, attivate solo in seguito all'attacco del fitofago.

Sono prevalentemente allelochimiche e sono costituite dallo stesso tipo di sostanze delle difese costitutive ma che vengono prodotte solo all'occorrenza, determinando un risparmio metabolico per la pianta. In questo caso le sostanze volatili attrattive per i predatori vengono dette HIPVs (Herbivore Induced Plant Volatiles) in quanto prodotte a seguito dell'attacco di un insetto fitofago.

In base all'effetto sull'insetto fitofago, si può fare un'ulteriore distinzione in difese dirette e difese indirette.

Le prime hanno un impatto diretto sullo sviluppo o sulla riproduzione del fitofago, le seconde hanno la funzione di attirare sulla pianta i predatori e/o i parassitoidi dei fitofagi che, con la loro azione ne limiteranno la popolazione. (fig.3).

In questo caso l'attacco da parte degli erbivori induce le piante a produrre composti volatili che, diffondendosi nell'ambiente circostante la pianta, attraggono specifici predatori e/o parassitoidi.

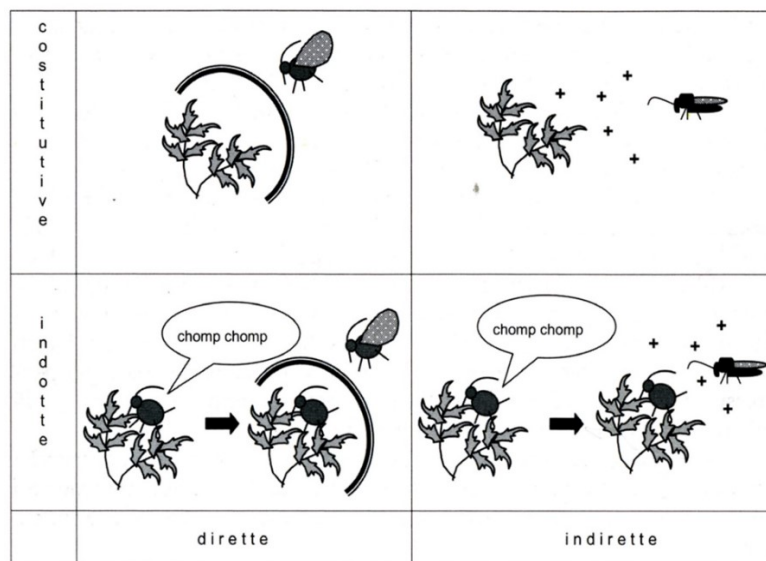


Fig.3 I meccanismi di difesa delle piante dagli insetti fitofagi (Guerrieri *et al.* 2006)

### 1.2.1 Allelochimici

Gli allelochimici sono messaggeri chimici che interagiscono a livello interspecifico.

Si dividono in allomoni, cairomoni e sinomoni.

Gli allomoni sono sostanze chimiche che avvantaggiano solo l'organismo che li emette (Tremblay 1999). Sono allomoni, per esempio, l'acido formico delle formiche o le secrezioni

ghilandolari delle formiche schiaviste obbligate *Polyergus rufescens* (allomoni di propaganda) che inducono una forte confusione tra le formiche operaie parassitate favorendo così la cattura della prole da parte delle schiaviste (Grasso *et al.* 2007)

I cairomoni sono sostanze chimiche il cui effetto implica un beneficio solo per l'organismo che li riceve (Tremblay, 1999). Rientrano in questo gruppo i composti volatili emessi dalle piante e sfruttati dai fitofagi come indizio (*cue*) per raggiungere la pianta, l'odore della melata degli afidi che attira i loro nemici naturali (Hatano *et al.* 2008) o gli odori presenti sulle uova che richiamano i parassitoidi oofagi (Celli e Maini, 1988).

I sinomoni sono segnali di comunicazione interspecifica favorevoli sia all'organismo emittente che al ricevente (Tremblay, 1999). Rientrano in questo gruppo le sostanze volatili emesse dai fiori attrattive per gli insetti pronubi (Celli e Maini, 1988) e le sostanze volatili (ad es. gli HIPVs) rilasciate da piante infestate per attirare i nemici naturali dei fitofagi.

### 1.2.2 HIPVs

Le piante sotto l'attacco dei fitofagi possono emettere delle sostanze volatili che sono usate come *cue* dai predatori e dai parassitoidi degli erbivori per arrivare alla loro localizzazione.

Si tratta di sinomoni perché comportano un vantaggio sia per la pianta emittente che così si libera dei fitofagi, sia per l'organismo ricevente che così individua la sua preda.

Il complesso rilascio di queste sostanze, quando è il frutto di specifici percorsi coevolutivi tra piante/insetti, è anche chiamato "*cry for help*" proprio per sottolineare la sua funzione di richiesta di aiuto indotta dalla presenza di erbivori che stanno danneggiando la pianta (Van Lenteren 2006).

Le sostanze volatili che costituiscono gli HIPVs comprendono principalmente terpenoidi, derivati degli acidi grassi, fenilpropanoidi e benzenoidi (Mumm e Dicke 2009) e possono essere emessi sia dalle aree della pianta danneggiate sia per via sistemica anche da aree non danneggiate (Heil e Ton 2008). La composizione può essere anche molto complessa, arrivando ad annoverare centinaia di composti, alcuni dei quali non sono prodotti dalle piante integre o danneggiate meccanicamente ma vengono prodotti *de novo* in risposta all'attacco degli erbivori (Dicke e Baldwin 2009)

La composizione e quantità degli HIPVs prodotti varia in funzione della tipologia di fitofago. Infatti, erbivori con apparato boccale masticatore indurranno nelle piante una risposta diversa da erbivori con apparato boccale pungente succhiante (Price 1980; Coley *et al.* 1985; Dicke and van Loon 2000; van Loon *et al.* 2000; Ode 2006; Hatano 2008; Dicke 2009).

I derivati degli acidi grassi sono prodotti immediatamente a seguito dell'attacco di fitofagi con apparato boccale masticatore e sono anche chiamati “*green leaf volatiles*”.

I terpenodi vengono sintetizzati dalle piante diverse ore dopo l'attacco e sono presenti anche quando la pianta è infestata da insetti con apparato boccale pungente succhiante (Schoonhoven *et al.* 2005)

Gli HIPVs possono stimolare cambiamenti comportamentali in numerosi organismi appartenenti a taxa anche molto lontani tra loro, dagli artropodi carnivori ai nematodi parassiti fino agli uccelli insettivori ed alle piante conspecifiche che si trovano nelle vicinanze delle piante danneggiate, andando a modificare i rapporti trofici intercorrenti tra gli organismi costituenti la rete trofica.

(Bruinsma *et al.* 2009; Rasmann *et al.* 2005; Mantyla *et al.* 2004; Baldwin *et al.* 2006).

### **1.3 Interazioni piante-formiche**

Le interazioni che coinvolgono le formiche e le piante sono ampiamente diffuse e coprono una vasta parte dei comportamenti riscontrabili in natura, andando dall'antagonismo all'opportunismo, dal mutualismo occasionale fino alla simbiosi obbligata (Rico-Grey e Oliveira 2007; Grasso *et al.* 2015). E' possibile tuttavia riassumere le relazioni formica-pianta in due ampie categorie: le interazioni antagonistiche e le interazioni vantaggiose. Vale la pena notare che questa classificazione può essere di uso pratico, ma è certo una semplificazione eccessiva. In realtà, è ben noto che gli esiti delle interazioni possono essere spesso condizionati o dipendenti dal contesto e si sviluppano lungo un continuum (ad es. da antagonismo a mutualismo) sia dal punto di vista ecologico che evolutivo (Huxley 1991; Rico-Grey e Oliveira 2007; Stadler e Dixon 2008; Douglas 2010).

Interazioni antagonistiche classiche sono quelle che coinvolgono le formiche tagliafoglie (tribù Attini) ed un vasto gruppo di piante: le formiche non si cibano delle piante ma raccolgono una grande quantità di foglie e di altre parti vegetali che usano come substrato per la coltivazione di funghi (basidiomiceti) che sono la loro reale fonte di nutrimento (Hölldobler e Wilson 2009). Le formiche possono comportarsi anche da consumatori primari, sfruttando ad esempio i semi delle piante come fanno diverse specie di formiche mietitrici. E' da sottolineare che in qualche caso le formiche possono fungere da strumento di dispersione dei semi. Questo può accadere accidentalmente oppure in alcuni casi in cui i semi, possedendo parti edibili non coinvolte con

la germinazione, sono strutturati proprio per attirare le formiche, fornendo loro una ricompensa in termini di cibo (Azcárate e Manzano 2011; Warren e Giladi 2014).

La dispersione dei semi rappresenta solo uno dei molteplici esempi di interazioni mutualistiche intercorrenti tra formiche e piante. In questo caso, per definizione, il risultato del rapporto è vantaggioso per entrambe le parti.

Le formiche frequentemente instaurano interazioni mutualistiche con le piante fornendo loro difesa contro gli antagonisti (erbivori e competitori). A loro volta le piante offrono generalmente cibo (trofobiosi) e rifugi occasionali o esclusivi alle formiche. La presenza di nettari extraflorali (EFNs, Extra Floral Nectaries) è piuttosto diffusa tra le piante. Queste strutture producono secrezioni ricche di zuccheri e sembrano essersi evolute per attrarre le formiche ed altri artropodi e ottenere vantaggi dalla loro presenza come la difesa indiretta dai fitofagi (Ness 2010; Heil 2008; Heil 2015; Marazzi *et al.* 2013; Grasso *et al.* 2015)

I casi più eclatanti di associazione tra piante con nettari e le formiche sono rappresentati da alcune piante tropicali cosiddette mirmecofite. Essi sono l'unico esempio conosciuto di simbiosi mutualistica obbligata tra piante e animali. Le mirmecofite posseggono adattamenti strutturali che forniscono riparo (domatia) (Figura 4 a-b) e nutrimento alle formiche, le quali ricambiano garantendo protezione dagli insetti fitofagi, concimando la pianta con i loro escrementi, e in alcuni casi contribuendo alla impollinazione e alla disseminazione (Rico-Grey e Oliveira 2007; Heil 2015; Vittecoq *et al.* 2011).



Fig. 4 a) Formiche *Petalomyrmex phylax* all'ingresso di un domatium della pianta mirmecofita *Leonardoxa Africana*. b) Domatium tagliato longitudinalmente per mostrare le formiche al suo interno (Vittecoq *et al.* 2011)

## 1.4 Interazioni formiche-insetti

### 1.4.1 La trofobiosi

La trofobiosi è una relazione di simbiosi tra due specie, nella quale una specie conferisce nutrimento all'altra in cambio di protezione (Stadler e Dixon 2008; Lach *et al.* 2010).

Varie specie di formiche (appartenenti soprattutto alle sottofamiglie Formicinae, Myrmicinae e Dolichoderinae) instaurano una relazione di trofobiosi con molte specie di Emitteri fitomizi appartenenti principalmente alle famiglie Aphididae (afidi), Coccoidea (cocciniglie) e Membracidae (Membracidi). (Hölldobler e Wilson 1990; Stadler e Dixon 2005; Styrsky e Eubanks 2007; Lach *et al.* 2010).

Gli insetti fitomizi presentano un apparato boccale pungente-succhiante attraverso il quale estraggono la linfa elaborata delle piante che rappresenta la loro fonte di nutrimento (Dixon 1998). La linfa è un liquido ricco di acqua e zuccheri, con una bassa concentrazione di amminoacidi. (Völkl 1999; Izumi Yao e Shin-ichi Akimoto 2001). I fitomizi, pertanto, per avere il giusto apporto di sostanze azotate, traggono dalle piante un surplus di acqua e zuccheri che successivamente espellono nell'ambiente sotto forma di goccioline di melata.

Le formiche sono fortemente attratte dalla melata che rappresenta per loro una risorsa di carboidrati e per questo motivo instaurano un rapporto trofobiotico con i fitomizi, dai quali ricevono la melata fornendo loro in cambio protezione da predatori, parassitoidi e competitori. (Way 1963; Buckley 1987; Hölldobler e Wilson 1990; Stadler e Dixon 2005, 2008; Detrain *et al.* 2010; Nielsen *et al.* 2010).



Fig. 4 Formica intenta a suggere la melata prodotta da un afide mutualista

L'attività di protezione da parte delle formiche ha un grosso impatto sulla struttura delle comunità di artropodi. L'interazione mutualistica tra gli afidi e le formiche può essere quindi considerata una interaction - keystone per la sua estesa influenza sulle biocenosi e sulle dinamiche delle reti trofiche (Way 1963; Skinner e Whittaker 1981; Buckley 1987; Hölldobler e Wilson 1990; Eubanks e Styrsky 2006; Stadler e Dixon, 2008; Kilpeläinen *et al.* 2009).

#### 1.4.2 La predazione

Le formiche giocano spesso un ruolo chiave in molti ecosistemi, sia naturali che agrari, esercitando un controllo top-down degli artropodi, consumando un gran numero di prede e quindi riducendo le popolazioni di insetti erbivori (Punntila *et al.* 2004; Cerdá e Dejean 2011; Choate e Drummond 2011).

Nei climi temperati, il potenziale predatorio delle formiche può essere esemplificato dall'attività trofica delle formiche appartenenti alle specie del gruppo *Formica rufa*.

Si stima che un nido di medie dimensioni di *Formica polyctena* consumi circa otto milioni di artropodi in un anno e che circa 14000 tonnellate di insetti siano uccisi ogni anno dalle formiche del gruppo *F. rufa* su tutto l'arco alpino italiano (Pavan 1959; Way e Khoo 1992).

Le formiche di questo gruppo sono predatrici così efficienti che le aree attorno ai loro nidi sono chiamate "green islands" perché la vegetazione attorno non è danneggiata dai fitofagi (Skinner e Whittaker 1981).



Fig. 5 Operaie di *Formica pratensis* mentre predano una larva di lepidottero

## 1.5 Impatto delle formiche negli agroecosistemi

La capacità delle formiche di controllare le specie di insetti infestanti è stata riconosciuta fin dall'anno 300 d.C. dai coltivatori di agrumi nella Cina meridionale. Essi raccoglievano formiche predatrici della specie *Oecophylla smaragdina* e le introducevano negli agrumeti, favorendone il passaggio da una pianta all'altra collocando delle canne di bamboo le cui estremità poggiavano su due piante contigue (Huang and Yang, 1987). In anni recenti l'impatto che le formiche esercitano negli agroecosistemi ha ricevuto nuovamente attenzione (Chong *et al.* 2010; Philpott *et al.* 2010; Stewart-Jones *et al.* 2008) e la presenza di formiche è considerata vantaggiosa in alcune coltivazioni quali, per esempio, mango, agrumi, cocco, anacardi e cotone Vedi figura 4.

Crop	Ant species	Pest controlled	Highlights	References
Cauliflower	<i>Pheidole</i> sp.	diamondback moth larvae, black cutworm larvae	Decreased leaf damage by black cutworm larvae	Agarwal <i>et al.</i> , 2007
Cashew	<i>Oecophylla smaragdina</i>	tea mosquito bug, fruit-spotting bug, mango tip-borer, leafroller	Pests controlled, higher quality nuts produced	Peng <i>et al.</i> , 1995, 1997 a,b
Citrus	<i>Azteca</i> spp.	<i>Atta cephalotes</i>	Presence prevents defoliation	Jutsum <i>et al.</i> , 1981
Cocoa	<i>Wasmannia auropunctata</i>	cocoa mirids	Noted control of pest	Way and Khoo, 1992
Cocoa	<i>Anoplolepis longipes</i>	<i>Pantorhytes</i> sp., <i>Pseudodoniella laensis</i>	Reduced pest numbers	Smith, 1981; Way and Khoo, 1992
Coconut	<i>Wasmannia auropunctata</i> , <i>Anoplolepis gracilipes</i>	coconut bug	Reduced pest numbers	Brown, 1959; Way and Khoo, 1992
Cotton	<i>Pheidole</i> sp., <i>Solenopsis</i> sp.	cotton leaf worm	Significantly reduced pest numbers	Perfecto and Castiñeiras, 1998
*Cotton	<i>Solenopsis invicta</i>	boll weevil larvae	Reduced pest numbers, prevented economic loss	Sterling, 1978; Jones and Sterling, 1979; McDaniel and Sterling, 1979; Sterling <i>et al.</i> , 1984
*Cowpea, Snap pea, Lima bean, and Peas	<i>Solenopsis invicta</i>	cowpea curculio	Reduced numbers of pupae in the soil	Russell, 1980
Maize	<i>Pheidole radowszkowkii</i> , <i>Solenopsis geminata</i>	fall armyworm, corn leafhopper	Reduced pest numbers, crop damage	Perfecto, 1990; Perfecto, 1991
Mango	<i>Oecophylla longinoda</i>	fruit fly	Better fruit quality	Van Mele <i>et al.</i> , 2007
Milpas	General ant community	<i>Drosophila</i> sp.	Consumed 97%	Risch and Carroll 1982
*Pecan	<i>Solenopsis invicta</i>	pecan weevil larvae	Decreased pest survival by 15%	Dutcher and Sheppard, 1981
Rice	<i>Solenopsis geminata</i>	apple snail	Damaged and consumed egg masses	Yusa, 2001
*Sugarcane	<i>Solenopsis invicta</i>	sugarcane borer	Reduced pest numbers, crop damage	Lofgren, 1986; Reagan <i>et al.</i> , 1972; Adams <i>et al.</i> , 1981

Fig. 4 Effetti positivi della presenza di formiche su alcune colture

Formiche di diverse specie del gruppo *Formica rufa* tra cui *Formica pratensis* sono state osservate predare larve del fitofago *Leptinotarsa decemlineata* in un campo di patate confinante con una zona boschiva in Polonia (Godzinska *et al.* 1990)

Generalmente, nell'agricoltura tradizionale le formiche sono spesso considerate come un elemento negativo in quanto la tendenza che queste hanno nel formare rapporti trofobiotici con insetti fitomizi come gli afidi e le cocciniglie, potrebbe portare ad aumentare il danno che questi ultimi arrecano alle piante parassitate,

Le formiche non si limitano a difendere i fitomizi dai loro predatori, ma sono in grado anche di spostarli sulla pianta o su piante contigue in modo che inizino a colonizzare nuovi germogli estendendo così il danno a porzioni più ampie delle piante.

Se si considera che numerosi Emitters possono fungere da vettori di virus (Harris e Maramorosch 2014), si può pensare che il ruolo delle formiche in questi contesti abbia una valenza prevalentemente negativa. Tuttavia vi è un crescente numero di studi che evidenziano l'impatto positivo delle formiche negli agroecosistemi dal momento che molte specie di formiche pur instaurando trofobiosi con i fitomizi sono anche accanite predatrici di artropodi fitofagi (Stadler e Dixon 2008; Cerdà e Dejean 2011). Inoltre le formiche spesso mostrano un forte comportamento territoriale e la loro mera presenza sulle piante può rappresentare un deterrente per i potenziali erbivori. Queste caratteristiche rendono le formiche delle efficienti "body guards" per le piante contro i loro nemici anche nelle coltivazioni (Beattie 1985; Hölldobler e Wilson 1990).

Styrsky e Eubanks (2007) hanno considerato le conseguenze ecologiche dell'interazione mutualistica tra formiche e fitomizi in termini di costi-benefici per le piante. Essi hanno valutato il beneficio indiretto che le formiche causano predando gli altri erbivori e il costo diretto dovuto all'erbivoria dei fitomizi mutualisti. L'interazione mutualistica è vantaggiosa per la pianta quando l'effetto positivo indiretto dato dalla riduzione del numero di erbivori competitori operato dalle formiche, supera l'effetto negativo diretto della fitofagia operata dai fitomizi sulle piante (fig 5a).

Si deve tenere presente che gli emitters produttori di melata e gli altri erbivori sono in competizione per la stessa risorsa. L'interazione tra loro è di tipo negativo ed indiretto, poiché entrambi riducono la qualità della pianta ospite.

Al contrario, le interazioni tra le formiche e gli afidi possono danneggiare le piante se l'effetto negativo diretto degli Emitteri sulle piante supera l'effetto positivo indiretto della predazione degli altri erbivori, provocato dalle formiche (fig. 5b). A tale riguardo, nella maggior parte dei casi finora analizzati, le interazioni fitomizi-formiche-altri fitofagi hanno effetti netti positivi sulla fitness delle piante (Styrsky e Eubanks 2007, Rosumek *et al.* 2009). In una prospettiva di analisi costi/benefici, ciò significa che la presenza delle formiche in molti agroecosistemi potrebbe avere un effetto positivo agendo sul controllo delle specie fitofaghe non mutualiste.

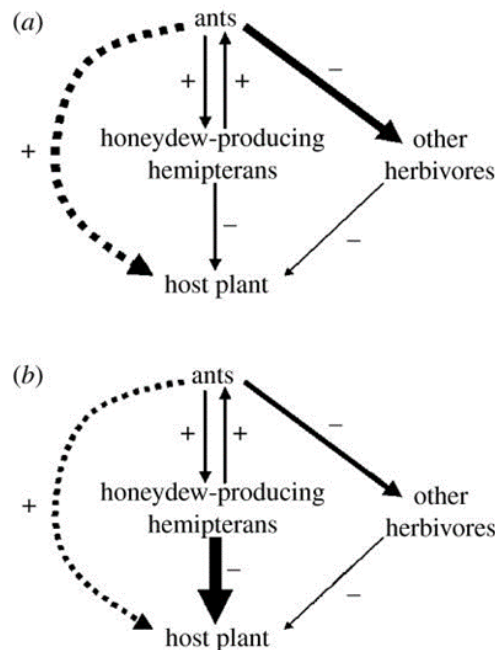


Figura 5a-b Effetti dell'interazione tra formiche e emittori produttori di melata sulle piante. L'ampiezza delle frecce indica la portata degli effetti, che possono essere positivi (+) o negativi (-). Le frecce tratteggiate indicano effetti indiretti (Styrsky e Eubanks 2007).

## 1.6 Le formiche all'interno delle reti trofiche

Il ruolo che le formiche ricoprono all'interno delle reti trofiche, nonostante la loro ubiquità nelle comunità terrestri, ha ricevuto relativamente poca attenzione negli studi ecologici. In particolare ancora poco si conosce sugli effetti di tali interazioni sulle dinamiche delle reti trofiche che includono piante e artropodi. Le relazioni trofiche intercorrenti tra questi esapodi e gli altri artropodi all'interno di una rete trofica possono essere complesse. Tenendo conto dei livelli trofici, le formiche possono porsi al secondo livello

quando sfruttano le risorse dei produttori primari, attuando un comportamento che implica svantaggi diretti per le piante, raccogliendo e consumando parti di esse, come fanno ad esempio le formiche mietitrici o le tagliafoglie. Le formiche potrebbero essere incluse nel secondo livello trofico anche quando sfruttando la melata dei fitomizi, li proteggono da predatori e competitori. In questo caso il danno arrecato alle piante per effetto delle formiche è indiretto e si parla di “ebivoria criptica” (Hölldobler e Wilson 2009).

Occupano invece il terzo livello trofico quando svolgono attività di predazione degli artropodi erbivori. Infine possono occupare livelli trofici superiori quando si nutrono di altri predatori, sia a scopo trofico che di difesa dei fitomizi mutualisti.

Pertanto, le formiche per la loro diversità possono avere ruoli ecologici diversi. Inoltre, nell’ambito della stessa specie, si assiste spesso ad una plasticità comportamentale che le può far collocare simultaneamente in diversi livelli trofici accentuando così il loro impatto nella dinamica di molti ecosistemi terrestri.

## 2 SCOPI DELLA RICERCA

La presente ricerca di Dottorato ha analizzato con un approccio eco-etologico alcuni aspetti delle relazioni multitrofiche che si possono instaurare tra piante, insetti fitofagi e insetti predatori dei fitofagi. In particolare, attraverso una serie di esperimenti operati su un network multitrofico in cui il primo livello trofico era costituito da piante coltivate, si è cercato di verificare se le formiche:

- si mostrano aggressive nei confronti di fitofagi masticatori
- percepiscono la presenza degli afidi mutualisti
- modificano il loro comportamento quando sulle piante sono presenti degli afidi mutualisti
- sono in grado sempre di svolgere la loro funzione a difesa della colonia di afidi in presenza di un predatore afidofago
- reagiscono agli HIPVs rilasciati dalle piante coltivate sottoposte ad attacco da parte di insetti fitofagi
- riescono a percepire a distanza la presenza di afidi mutualisti sulla pianta

Le sostanze volatili prodotte dalle piante attaccate dalle diverse specie di fitofagi sono state analizzate e confrontate con quelle prodotte da piante non infestate, allo scopo di avere una prima informazione su quale sostanza o *blend* di sostanze viene percepito dalle formiche.

Risolvere questi nodi sperimentali ha un'importanza che non è limitata al mero interesse di biologia del comportamento ed alle strategie evolutive che si instaurano tra produttori primari e consumatori agli svariati livelli trofici. Conoscere le relazioni che coinvolgono le formiche esercitanti la loro funzione predatoria, può avere dei risvolti applicativi in modelli di utilizzo di questi esapodi per programmi di controllo biologico delle colture, in un contesto di agricoltura sostenibile volto a ridurre l'utilizzo di pesticidi chimici il cui impatto negativo per la salute umana e per l'entomofauna in generale è sempre più messo in evidenza.

### **3 LINEE GENERALI DELLA TESI**

La tesi è suddivisa in due sezioni che riguardano diversi argomenti e metodologie di analisi facenti capo al ruolo delle formiche nei sistemi multitrofici.

#### Sezione 1 Interazioni formiche-insetti (cap. 4-5-6)

Studio del comportamento delle formiche nei confronti degli altri organismi componenti il sistema multitrofico. In particolare, sono state descritte le interazioni e valutato l'impatto che le formiche hanno nei confronti degli insetti fitofagi e del predatore di afidi.

#### Sezione 2 interazioni piante-formiche (cap 7-8-9)

Studio di alcuni aspetti della chemical ecology delle relazioni che intercorrono tra due piante di interesse agronomico attaccate da insetti fitofagi e le formiche. In particolare si è voluto testare la capacità delle formiche di percepire la presenza di sostanze volatili emesse dalle piante come difesa indiretta, in seguito all'attacco di insetti fitofagi. E' stata poi condotta un'analisi dei composti prodotti dalle piante e potenzialmente coinvolti in questi processi.

Il capitolo 10 di discussione generale dei risultati è comune alle due sezioni.

## **SEZIONE 1**

### **Interazioni Formiche - Insetti**

## 4 MATERIALI E METODI

Gli esperimenti sono stati realizzati nei laboratori di Mirmecologia del Dipartimento di Bioscienze dell'Università di Parma

### 4.1 Le specie del sistema multitrofico sperimentale

#### 4.1.1 La pianta

*Cucumis sativus* L.

Descrizione

*C. sativus* è una pianta annuale d'interesse agronomico, appartenente alla famiglia delle Cucurbitacee. La pianta di cetriolo ha fusti rampicanti provvisti di cirri, che sono foglie modificate con funzione di sostegno. Le foglie sono alterne, palmate e ricoperte da sottili peli, anche detti tricomi, che le rendono ruvide al tatto. I tricomi sono appendici epidermiche con funzione di protezione, soprattutto da un eccesso di radiazioni solari e di evapotraspirazione. I fiori sono monoici con impollinazione entomofila e la fioritura avviene tra giugno e luglio (figura 4.1)(van Steenis and El-Khawass 1995; Pasqua 2008; Xu *et al.* 2014).



Fig.4.1 Pianta (a sinistra), fiore femminile (al centro) e frutti (a destra) di *C. sativus*.

## Motivazione della scelta

Per il primo livello trofico è stata scelta la pianta di cetriolo per i seguenti motivi:

È una specie d'interesse agronomico.

La crescita è abbastanza rapida; erano necessarie tre settimane per far sì che le piantine raggiungessero le dimensioni desiderate.

È suscettibile all'attacco sia di una specie mirmecofila di afidi che di una non mirmecofila.

## Coltivazione

E' stata utilizzata la varietà "Hoffman gigante" che ha la caratteristica di non aver subito selezioni per resistere all'attacco di fitofagi. I semi sono stati innanzitutto riposti in mezzo a dell'ovatta umida, in modo da accelerarne la germinazione. Dopo circa 36 ore, non appena le radichette si erano sviluppate, sono stati riposti in vasi di 10 cm di diametro con terriccio biologico. Le piante sono cresciute in cella termostata ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $50 \pm 20\%$  RH, L16:D8, 10000 lux) (figura 4.2). Le dimensioni ottimali per i fini sperimentali (circa 10 cm di altezza) erano raggiunte in tre settimane.

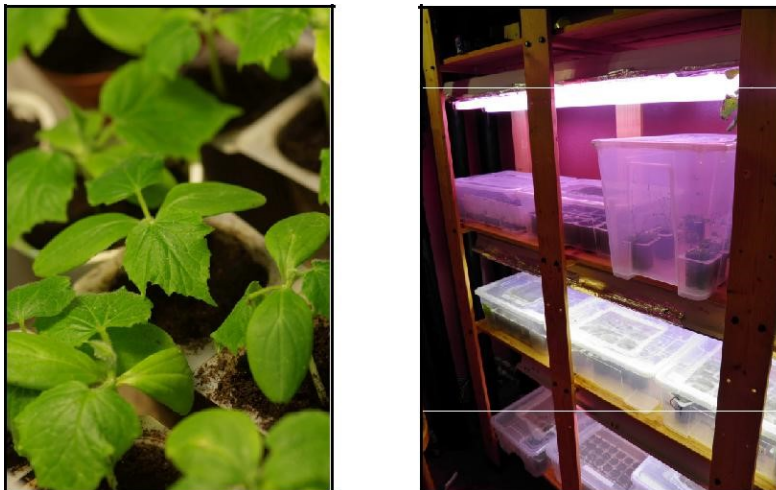


Figura 4.2 Piante di cetriolo nella cella termostata.

## 4.1.2 Gli insetti

### I predatori

#### *Formica pratensis* Retzius

##### Descrizione

*F. pratensis* è una specie europea di formica rossa dei boschi, appartenente al gruppo *Formica rufa*. Questa specie è ampiamente diffusa in Europa. L'ambiente tipico delle formiche del gruppo *rufa* sono le foreste di conifere, dove costruiscono i loro acervi. L'acervo è una struttura ampia e complessa a forma piramidale, che è eretta sopra al nido vero e proprio scavato nel terreno (figura 4.3). Questa struttura è per lo più costituita da aghi di abete e/o di pino e da altro materiale legnoso. L'acervo può avere un volume di 1-2 metri cubi e presenta al suo interno un intricato complesso di camere e di gallerie. La sua funzione è di proteggere il nido dalle precipitazioni, ma anche di regolarne la temperatura. Infatti, la sua ampia superficie aumenta l'esposizione del nido ai raggi solari, permettendo alle operaie di foraggiare già dall'inizio della primavera (Hölldobler e Wilson 1990, 1997; Skinner 1980).



Fig. 4.3 Acervo di *F. pratensis*.

Le operaie di *F. pratensis* hanno il capo e il torace di colore rossastro con alcune zone più scure nella parte superiore, mentre l'addome è di colore marrone scuro. Le loro dimensioni variano da 4.5 mm a 9.5 mm, mentre quelle delle regine variano da 9.5 a 11.5 mm (figura 4.4).



Fig. 4.4 Operaia (a sinistra) e regina (a destra) di *F. pratensis*.

Le formiche del gruppo *rufa* sono note per gli elevati livelli di organizzazione sociale e di aggressività. Esse sono di fatto altamente territoriali ed aggressive, sia nei confronti di altre specie di formiche sia verso l'artropofauna che vive negli stessi ambienti. Le interazioni aggressive avvengono sia attraverso l'azione delle potenti mandibole sia spruzzando acido formico contenuto in un'apposita ghiandola addominale (figure 4.5 e 4.6).

Per quanto riguarda l'organizzazione sociale, le colonie di *F. pratensis* sono poliginiche, cioè un singolo nido può avere più di una regina, infatti dopo il volo nuziale la colonia spesso accoglie nuovamente le proprie regine poiché queste difficilmente riescono da sole a fondare una nuova colonia.



Fig. 4.5 Operaia di formica del gruppo *rufa* in atteggiamento aggressivo



Fig.4.6 Getti di acido formico sulla superficie di un acervo

Talvolta le colonie sono anche polidome, cioè ripartite in diversi nidi a distanze ravvicinate tra i quali non vi è competizione (figura 4.7) (Hölldobler e Wilson 1990). Le formiche del gruppo *rufa* sono predatori generalisti con un notevole impatto selettivo sulla microfauna (Stadler e Dixon 2008). Proprio per questo motivo, in alcuni casi queste formiche sono state utilizzate come agenti di controllo biologico nei boschi di conifere (Pavan 1959). Le formiche rosse dei boschi instaurano una relazione di trofobiosi con gli afidi non appena ne hanno l'occasione. La melata di fatto può costituire il 60-70% della loro dieta. (Rosengren 1977; Skinner 1980; Wright *et al.* 2000; Novgorodova 2005; Novgorodova e Gavrilyuk 2012).



Fig. 4.7 Colonia polidomica

## Motivazione della scelta

Per le formiche la scelta è ricaduta su una specie del gruppo *rufa*, perché avevamo bisogno di formiche aggressive e al contempo afidofile. *F. pratensis* ha una vasta diffusione in Italia ed in Europa e, tra le specie del gruppo *rufa*, è quella meno legata all'ambiente boschivo in quanto frequentemente costruisce i suoi acervi ai margini dei boschi di conifere, dove è presente una maggiore quantità di luce. Da nostre prove preliminari abbiamo visto che è anche in grado di utilizzare materiali diversi dagli aghi di conifere per costruire gli acervi. In laboratorio una colonia è sopravvissuta un anno utilizzando il substrato della lettiera dei conigli, facilmente reperibile in commercio, per arrangiare il nido. Questo la rende una specie adattabile alla stabulazione artificiale. La raccolta di micro-porzioni di colonia in natura era comunque relativamente facile, perché bastava asportare un po' di materiale dalla sommità dell'acervo tra cui si trovavano centinaia di formiche.

## Allevamento

Porzioni di 8 colonie di *F. pratensis* sono state raccolte nell'Appennino tosco-emiliano, sul Passo del Ticchiano (1154 m s.l.m., 44°25'17" nord e 10°06'31" est), nella località di Monchio delle Corti in provincia di Parma (figura 4.8). Per evitare di utilizzare formiche appartenenti a una medesima colonia, sono stati individuati 8 acervi sufficientemente lontani l'uno dall'altro. Da ciascuno di essi sono state asportate porzioni di colonia con il loro substrato e trasferite in appositi contenitori di plastica (42x63x17 cm), con bordi rientranti e unti con un miscuglio di olio e grasso di vaselina per impedire la fuga delle formiche. I contenitori con le colonie sono stati poi stabulati nel laboratorio di Mirmecologia presso il Dipartimento di Bioscienze, (temperatura compresa tra 22 e 27 °C, RH 50%± 20%, luce naturale) (Figura 4.9). All'interno di ciascun contenitore erano riposti alcuni batuffoli di cotone imbevuti d'acqua, per mantenere un adeguato livello di umidità all'interno dell'acervo. Quotidianamente si provvedeva anche a spruzzare un po' d'acqua direttamente sull'acervo. L'accesso all'acqua era quindi sempre garantito (*ad libitum*).

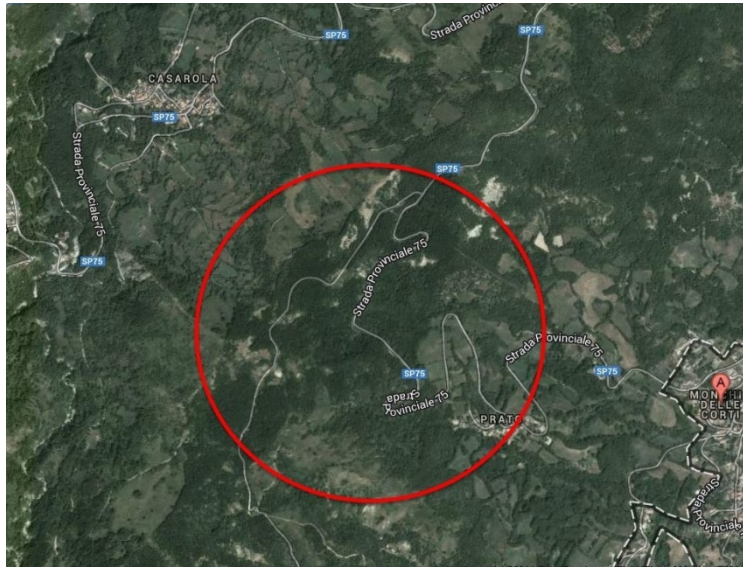


Fig. 4.8 Area di raccolta delle 8 porzioni di nido di *F. pratensis*

La dieta delle formiche consisteva nella somministrazione di larve di *Tenebrio molitor* L. e di miele. Due giorni prima dell'inizio degli esperimenti veniva interrotta l'alimentazione alle formiche così da aumentarne la motivazione al foraggiamento. Ogni 4 settimane le formiche erano riportate alla colonia di appartenenza sull'Appennino e si prelevavano nuove micro-porzioni di colonia. Quest'operazione era indispensabile per evitare che un periodo troppo lungo in laboratorio modificasse il comportamento delle formiche, smorzandone l'aggressività.



Fig. 4.9 Stabulazione delle formiche in laboratorio.

## *Aphidoletes aphidimyza* (Rondani)

### Descrizione

*A. aphidimyza* è un Cecidomide afidofago largamente impiegato (fin dal 1973) nei programmi di controllo biologico, soprattutto nelle serre. Allo stadio larvale questa specie è un vorace predatore di tutte le specie di afidi (Markkula *et al.* 1979; Albajes *et al.* 1999; Frank 2010).

Gli adulti di *A. aphidimyza* (2.5 mm di lunghezza) sono notturni e vivono all'incirca una o due settimane nutrendosi di nettare e di melata.

E' presente dimorfismo sessuale, i maschi sono dotati di lunghe antenne piumose che hanno la funzione di recepire i feromoni sessuali prodotti dalle femmine (Van Lenteren *et al.* 2002) (figura 20)

La riproduzione di questo insetto è molto peculiare, infatti gli accoppiamenti avvengono sulle tele di ragno su cui si appendono senza rimanerne intrappolati (Van Lenteren e Schettino 2003) (figura 20). Le femmine depongono delle uova oblunghe e di colore arancione (0,1x0,3 mm) in prossimità delle colonie di afidi (Lucas e Brodeaur 2001) (figura 4.10). Il numero di uova deposte vari da 6 a 400 in funzione della disponibilità di afidi e della temperatura. (Temp. Ottimale 25°C) (Gilkeson L 1987).



Fig. 4.10 Da sinistra a destra: femmine appese ad una ragnatela, un maschio, uova nei pressi di un afide

Dopo uno o due giorni le uova schiudono e da esse emergono larve di piccole dimensioni (0.3 mm) che sono già delle efficienti predatrici di afidi. La colorazione di queste larve può variare dall'arancione al rosso, in base alla specie di afide predata. Nella figura sottostante, si evidenzia questa variazione di colore. Le larve che si nutrite di afidi delle specie *Myzus persicae*, *Aphis gossypii* e *Acyrtosiphon pisum*

sono di color arancione. Al contrario, quelle che si nutrite degli afidi della specie *Aphis craccivora* assumono una colorazione rosso scura, tendente al marrone (figura 4.11). Le larve presentano tre stadi di sviluppo, durante i quali riescono a predare più di 80 afidi. Per portare a termine il loro sviluppo comunque è sufficiente che si nutrano di almeno 7 afidi (Markkula *et. al* 1979). Le larve completano lo sviluppo in circa 5 giorni e poi scendono alla base della pianta per impuparsi negli strati superficiali del suolo (fino a 2 cm). Dopo circa una settimana, nelle ore notturne, dalle pupe emergono gli adulti.



Fig. 4.11 Larve di *A. aphidimyza*, di colore scuro che si nutre di *A. craccivora* (sinistra) e arancione che si nutre di *A. gossypii* (destra).

#### Motivazione della scelta

E' stato scelto *A. aphidimyza* perché è un agente di controllo biologico di notevole interesse e perché le femmine di quest'insetto non cambiano il comportamento di deposizione delle uova in colonie di afidi pattugliate dalle formiche (Sentis *et al.* 2012). In altri predatori afidofagi la presenza di formiche è un deterrente per l'ovideposizione (Oliver *et al.* 2008), cosa che non succede in questo insetto. Si potrebbe plausibilmente pensare che *A. aphidimyza* possa aver evoluto delle strategie per non essere predato dalle formiche.

Da osservazioni preliminari abbiamo constatato che le formiche tendono ad ignorare le larve presenti tra gli afidi. Questo ci ha fatto supporre che le larve del predatore possedessero una capacità di camuffamento che abbiamo ipotizzato essere di tipo chimico. Le formiche hanno un olfatto molto sviluppato, possedendo numerosissimi recettori olfattivi lungo le antenne. La nostra idea è che le larve di *A. aphidimyza* siano in grado di acquisire gli odori degli afidi di cui si nutrono, rendendosi indistinguibili, alle antenne delle formiche, dagli insetti produttori di melata.

## Allevamento

Per avviare l'allevamento di *A. aphidimyza* è stata ordinata una bottiglietta di Aphidend (figura 4.12) all'azienda olandese Koppert Biological Systems, contenente 1.000 pupe di *A. aphidimyza*. Preventivamente due individui di ragno ballerino (*Pholcus phalangioides* Fuesslin) sono stati riposti in un recipiente cilindrico a maglia fine (50 cm di altezza x 44 cm di diametro). Una volta che questi avevano tessuto la tela, sono stati rimossi e la bottiglietta è stata collocata nel recipiente assieme ad alcune piante infestate da afidi, per la deposizione delle uova.

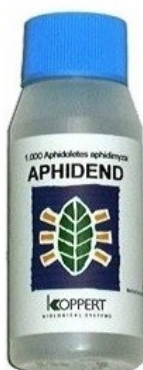


Fig. 4.12 Contenitore con 1000 pupe di *A. aphidimyza*

Dopo lo sfarfallamento degli adulti le piante infestate dagli afidi sono state sostituite ogni due giorni, per favorire una deposizione continua da parte delle femmine. Dopo la schiusa delle uova le larve erano nutrite con *M. persicae* o *A. gossypii*, in base al trattamento che s'intendeva condurre. L'allevamento è stato condotto in laboratorio con temperatura compresa tra 22 e 27°C e RH 50-70%, luce naturale.

## I fitomizi

*Aphis gossypii* (Glover)

### Descrizione

Comunemente chiamato afide del cotone o delle cucurbitacee è altamente polifago, arrivando a nutrirsi di 700 specie di piante distribuite soprattutto tra le famiglie Cucurbitaceae, Rutaceae e Malvaceae (Schirmer *et al.* 2008). È una specie mirmecofila il cui luogo di origine è sconosciuto, essendo ormai diffusa nelle regioni tropicali e temperate di tutto il mondo, Europa compresa. In Europa si riproduce

quasi esclusivamente per partenogenesi e può produrre fino a 50 generazioni all'anno (Fuller *et al.* 1999). La temperatura ottimale per la riproduzione è tra i 21 e 27° C. Le femmine vivipare possono produrre fino a 70-80 neanidi ad un tasso di 4,3 al giorno. Il periodo di sviluppo delle neanidi varia da 20,7 giorni a 10° C a 3,8 giorni alla temperatura di 30° C (Eastop 1977; Fuller *et al.* 1999). Sia le neanidi che gli adulti si nutrono preferenzialmente sulla pagina inferiore delle foglie o sulle parti della pianta più giovani in crescita, succhiando i nutrienti. Il fogliame può presentare clorosi e morire quando severamente infestato; inoltre la loro infestazione può causare un elevato livello di distorsione e curvamento delle foglie, compromettendo la capacità fotosintetica della pianta. I danni indiretti che questo afide arreca alla pianta sono soprattutto la trasmissione di virus (Martin *et al.* 2003) e il favorire l'attacco da parte di muffe, a causa della grande quantità di melata che quest'afide produce e che rimane attaccato a tutte le parti della pianta. *A. gossypii* è una specie morfologicamente variabile, che presenta plasticità fenotipica. Questi afidi possono assumere tre differenti colorazioni: verde chiaro, giallo e verde scuro (figura 4.13). (Eastop, 1977; van Steenis e El-Khawass 1995; Watt e Hales 1996; Dixon 1998; Satar *et al.* 2005)

#### Motivazione della scelta

*A. gossypii* è il principale infestante le cucurbitacee, cetriolo incluso e può provocare ingenti danni alle colture. E' una specie mirmecofila e di facile allevamento.

#### Allevamento

L'allevamento di *A. gossypii* è stato condotto sulle piante di *Hibiscus sp.* Le piante infestate erano mantenute all'interno di una cella termostata 23 ± 2°C, RH 60% - 20% L-D 16:8 6000 lux (figura 4.14).



Fig. 4.13 Variazioni fenotipiche di *A. gossypii*.

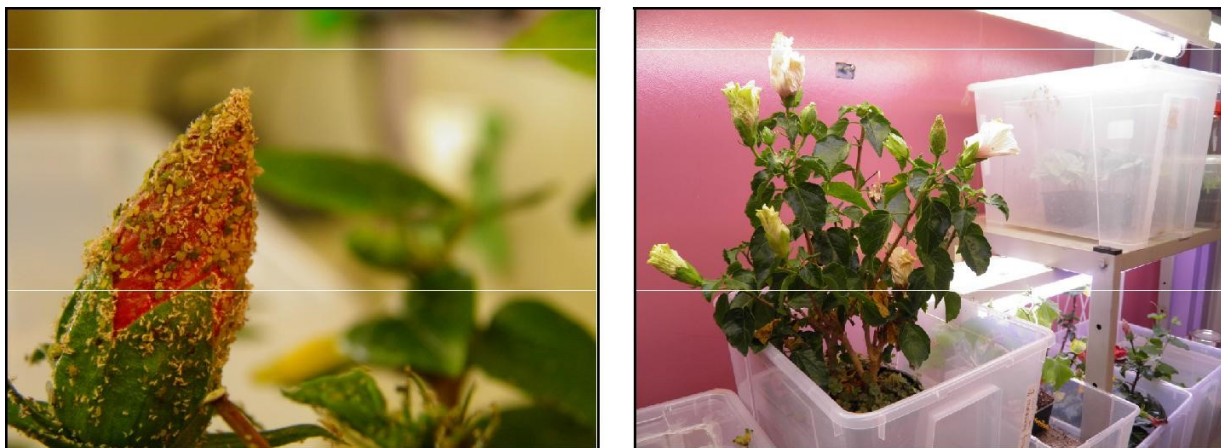


Fig. 4.14 A sinistra bocciolo di fiore d'ibisco infestato da *A. gossypii*, a destra ibisco nella cella termostata.

### *Myzus persicae* (Sulzer)

#### Descrizione

*M. persicae* è una specie altamente polifaga e cosmopolita, che danneggia una moltitudine di colture di interesse agrario. Anche in questo caso i danni provocati alle colture sono di tipo diretto ed indiretto, essendo vettore di agenti virali. Le principali famiglie infestate da quest'afide sono le Rosaceae, le Brassicaceae, le Fabaceae, le Solanaceae e le Cucurbitaceae. *M. persicae* ha come ospite primario il *Prunus persica*, per cui è comunemente chiamato afide verde del pesco. Gli adulti atteri sono di dimensioni medio-piccole (1.2-2.3 mm) e presentano una colorazione che varia dal giallo-verde chiaro al verde (figura 4.15). La temperatura ottimale di sviluppo è di 25°C, ma basta una temperatura superiore ai 15°C perché questa specie incrementi rapidamente il numero di individui (Barlow 1962). Dalla letteratura emerge che *M. persicae* è una specie non mirmecofila, quindi non instaura una relazione di trofobiosi con le formiche (Dixon 1998; Blackman e Eastop 2000).



Figura 4.15 Adulto di *M. persicae* con neanidi.

## Motivazione della scelta

Come specie non mutualista si è scelto di utilizzare *M. persicae*, poiché è una specie il cui allevamento è relativamente semplice ed essendo altamente polifaga attacca anche il cetriolo.

## Allevamento

L'allevamento è stato condotto sui germogli di pisello verde (*Pisum sativum* L.). Questi erano riposti in recipienti riempiti di perlite e muniti di un tappo con una retina di tulle, che lasciava passare l'aria ma non gli afidi. L'allevamento avveniva all'interno di una cella termostata ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $50 \pm 20\%$  R.H., L16:D8, 10000 lux). Sono stati utilizzati i germogli di pisello perché la germinazione è rapida (3-4 giorni), la gestione è piuttosto semplice e perché fornivano un adeguato sostentamento per la crescita delle colonie di *M. persicae*. Una volta a settimana si sostituivano i germogli, poiché raggiunta una certa dimensione erano meno appetibili per gli afidi.

## **Il fitofago masticatore**

### *Mamestra brassicae* L.

#### Descrizione

*M. brassicae* è un Nottuide che può raggiungere i 45 mm di apertura alare; la livrea delle ali anteriori è di colore grigio-brunastro, con marmoreggiature e disegni bianchi e neri, mentre quella delle ali posteriori è uniforme grigiastrea (figura 4.16). I bruchi che misurano circa 40-45 mm di lunghezza sono di colore verdognolo (larva giovane) o di colore grigio verdastro (larva matura); inoltre la livrea è completata da fasce scure longitudinali e dalla zona ventrale giallognola. Sono riconoscibili sei stadi di sviluppo dei bruchi. Il danno si manifesta sulle foglie, sia interne che esterne, e sul fusto ed è determinato dai bruchi. Queste, che hanno abitudini notturne, rodono voracemente le foglie e scavano delle gallerie nei fusti, provocando anche la morte della pianta.



Fig. 4.16 Farfalla di *M. brassicae*

La *M. brassicae* sverna come crisalide. Gli adulti, notturni, compaiono in aprile-maggio e depongono le uova sulla pagina inferiore delle foglie, le ovature contengono generalmente alcune decine di uova. Le larve, che fuoriescono dal mese di giugno, iniziano immediatamente a nutrirsi, durante le ore notturne; nelle ore diurne si nascondono nel terreno. Dopo circa 1-2 mesi, a seconda delle temperature ambientali, le larve raggiungono la maturità e si incrisalidano nel terreno, a pochi centimetri di profondità. Generalmente, nel mese di luglio, si ha lo sfarfallamento dei nuovi adulti (prima generazione); questi originano la seconda generazione le cui larve compaiono dal mese di agosto. Queste larve si incrisalidano e svernano. Questo insetto compie, pertanto, due generazioni all'anno; nelle regioni più fredde compie una sola generazione all'anno (tratto da Agraria.org).

#### Motivazione della scelta

*M. brassicae* è un insetto i cui bruchi sono estremamente polifagi. Da prove preliminari effettuate abbiamo constatato che si nutre volentieri anche delle piante di cetriolo. Viene allevato nel laboratorio di Entomologia di Wageningen in grandi quantità tutto l'anno. A cadenze settimanali il laboratorio provvedeva ad inviarci un centinaio di uova per i nostri esperimenti. Questo rendeva semplice l'approvvigionamento che non doveva essere effettuato in natura e non era neanche necessario aspettare che l'insetto effettuasse il ciclo di sviluppo completo. Per i nostri scopi sperimentali abbiamo utilizzato larve di seconda e terza età che erano pronte circa 12 giorni dopo la schiusa delle uova (figura 4.16). A questo stadio di sviluppo una singola formica poteva, nel caso, sollevare e trasportare il bruco.



## 4.2 Il sistema sperimentale

Abbiamo realizzato due tipologie di esperimenti per ognuna delle 8 colonie di formiche da noi tenute in laboratorio:

- Esperimenti sul network: questa tipologia di esperimenti è stata realizzata per poter osservare il comportamento delle formiche all'interno del sistema multitrofico.
- Esperimenti con le fighting box: che ci ha permesso di esaminare in maniera più approfondita il comportamento delle formiche verso *M. brassicae* in un contesto neutrale estrapolato dal network.

### 4.2.1 Esperimenti sul network multitrofico

Per lo svolgimento di questa tipologia di esperimento abbiamo utilizzato l'apparato sperimentale visibile in Figura 4.18.

La struttura completa è composta dalle seguenti quattro parti tra loro in comunicazione:

- Una piccola colonia di 200 formiche e di parte dei materiali del nido d'origine, prelevati dalla colonia-serbatoio di riferimento per ognuno degli 8 nidi e alloggiate in una scatola rettangolare (20x13x10,5 cm) con coperchio dotato di aperture per il passaggio d'aria;
- Un'arena di foraggiamento del diametro di 19,5 cm, a cui le formiche avevano libero accesso prima, durante e dopo lo svolgimento dell'esperimento;
- Un'arena di controllo (diametro 19,5 cm), nella quale abbiamo svolto gli esperimenti di controllo e a cui le formiche non avevano mai accesso in quanto il piccolo tunnel di plastica di comunicazione tra questa arena e quella di foraggiamento veniva preventivamente ostruito con un batuffolo di cotone idrofilo;
- Un'arena test (diametro 19,5 cm), a cui le formiche avevano accesso solo durante l'esperimento, dal momento in cui veniva tolto il batuffolo di cotone d'ostruzione.

La parte superiore dei lati di tutte le strutture sopracitate venivano ricoperte con un impasto antifuga ottenuto mescolando olio e grasso di vaselina prima del trasferimento delle formiche nella struttura. Il trasferimento delle formiche dalle colonie-serbatoio alla nuova sistemazione all'interno dell'apparato sperimentale avveniva un giorno prima dell'inizio dell'esperimento per poter permettere alle formiche di abituarsi alla nuova condizione, di esplorare l'arena di foraggiamento e di manipolare parzialmente il nido.



Figura 4.18 Apparato sperimentale utilizzato per gli esperimenti sul network

Ogni esperimento è stato svolto seguendo un protocollo sperimentale strutturato in tre fasi:

1. Familiarizzazione: in ognuna delle due arene laterali veniva sistemata una pianta, di *Cucumis sativus*, dopodiché veniva dato l'accesso alle formiche all'arena test, per far sì che queste familiarizzassero con la pianta per le seguenti 24 ore. Per gli esperimenti che prevedevano la presenza di afidi, questi erano già presenti sulle piante, in modo che le formiche potessero entrare già da subito in contatto con questi e avessero il tempo di stabilire una eventuale trofobiosi; le altre specie del network venivano aggiunte nella seconda fase dell'esperimento;
2. Allestimento del network: terminate le 24 ore della fase di familiarizzazione, l'accesso all'arena test veniva interrotto e le formiche presenti in quest'area dell'apparato sperimentale venivano rimesse all'interno della piccola colonia. Una volta tolte tutte le formiche, su entrambe le piante (test e controllo) venivano aggiunte tutte le specie previste per quel determinato trattamento. L'interruzione dell'accesso all'arena test durava 30 minuti, per poter posizionare le altre specie

sulle piante e per lasciar passare un tempo sufficiente affinché le formiche si calmassero dopo l'azione di disturbo;

3. Osservazioni: la raccolta dei dati cominciava non appena veniva ridato alle formiche l'accesso all'arena test e come prima cosa veniva calcolato il tempo di latenza del primo contatto con le altre specie animali del network (*M. brassicae* o *A. aphidimyza*, gli afidi non venivano considerati in quanto il contatto era già avvenuto durante la familiarizzazione), ovvero quanto tempo impiegano le formiche per trovare il primo individuo appartenente al network. Una volta avvenuto il contatto, si sono eseguite le osservazioni comportamentali utilizzando la tecnica del continuous sampling (osservazione continuata) per i primi 15 minuti dell'esperimento e in seguito utilizzando la tecnica dello scanning sampling (osservazione puntuale) per una serie di 7 osservazioni separate da periodi di tempo sempre maggiori:

- I primi 3 scanning samplings dopo 10 minuti ciascuno;
- Il quarto e il quinto dopo mezz'ora ciascuno;
- Il sesto dopo un'ora;
- Il settimo dopo 24 ore dall'ultima osservazione di scanning sampling.

Il tempo totale per ogni esperimento, dalle prime fasi della familiarizzazione all'ultimo scanning sampling (senza conteggiare il tempo di latenza, che può andare da una decina di secondi a decine di minuti), è stato di 2 giorni, 3 ore e 15 minuti.

Per rispondere agli scopi della ricerca, abbiamo effettuato i seguenti trattamenti, ciascuno rappresentato da un network multitrofico:

- 1) *C. sativus* + *M. brassicae* (4 bruchi al secondo e terzo stadio di sviluppo),
- 2) *C. sativus* + *M. brassicae* (4 bruchi al secondo e terzo stadio di sviluppo) + *A. gossypii* (adulti e ninfe)
- 3) *C. sativus* + *A. gossypii* (adulti e ninfe) + *A. aphidimyza* (4 larve mature)
- 4) *C. sativus* + *M. persicae* (adulti e ninfe) + *A. aphidimyza* (4 larve mature)
- 5) *C. sativus* + *A. gossypii* + *A. aphidimyza* – INCROCIATO (4 larve mature nutrite su *M. persicae* e poi collocate su *A. gossypii* durante l'allestimento del network)
- 6) *C. sativus* + *M. persicae* + *A. aphidimyza* – INCROCIATO (4 larve mature nutrite su *A. gossypii* e poi collocate su *M. persicae* durante l'allestimento del network)

Ogni trattamento era composto da 8 esperimenti (uno per ogni colonia di formiche)

Per ogni esperimento sono stati raccolti i seguenti dati:

- Numero e posizione delle formiche;
- Numero e posizione dei bruchi;
- Numero e posizione degli *A. aphidimyza*;
- Moduli comportamentali delle formiche.
- Moduli comportamentali di *A. aphidimyza*.

Per quanto riguarda le osservazioni comportamentali, l'oggetto delle osservazioni erano tutte le formiche che in quel determinato "sampling" mostravano un'interazione con gli altri componenti del network. Ad ogni osservazione veniva conteggiato il numero di formiche che effettuavano una delle sei categorie comportamentali elencate in tabella 4.1 e, nel caso del continuous sampling, la durata dell'intervallo durante il quale questo comportamento veniva mostrato.

Durante gli esperimenti che prevedevano la presenza di *A. aphidimyza*, venivano osservati ed annotati i comportamenti del predatore. Per questo dittero cecidiomide sono stati individuati i moduli comportamentali riassunti in tabella 4.2

Durante il continuous sampling di 15 minuti è stato utilizzato un registratore vocale con cronometro, il quale ha permesso, alla fine di ogni esperimento, di trascrivere all'interno di una tabella il secondo esatto in cui ogni comportamento veniva mostrato (Tabella 4.3).

Oltre a questi dati e ad eventuali note, sono stati registrati i seguenti dati: data, ora, latenza contatto pianta (tempo trascorso tra l'apertura dell'accesso all'arena test e l'arrivo della prima formica sulla pianta), latenza contatto afidi (tempo trascorso tra l'apertura dell'accesso all'arena test e il contatto tra la prima formica e un afide), numero di formiche sulle piante.

Gli esperimenti avevano inizio nella fascia oraria dalle 9 alle 15, in quanto le formiche dimostravano livelli più elevati di attività, soprattutto di foraggiamento. La scelta del nido avveniva in modo casuale, in modo da evitare qualunque forma di condizionamento.

<b>Sigla</b>	<b>Modulo comportamentale</b>	<b>Significato</b>
A	Antennamento	movimento delle antenne sull'oggetto d'interesse per analizzarlo
L	Leccamento	stazionamento sull'oggetto d'interesse con estroflessione del <i>labium</i>
S	Schiocco	chiusura repentina delle mandibole come nell'atto di mordere (morsi a vuoto)
M	Morso	chiusura delle mandibole sull'oggetto
G	Gaster flexing	flessione in avanti del gaster tra le zampe posteriori come nell'atto di spruzzare (a volte accompagnato dall'emissione di acido formico)
T	Trascinamento	inteso sia come sollevamento dell'oggetto d'interesse da terra (trasporto) sia come spostamento di questo a livello del suolo

Tab. 4.1 Etogramma di *F. pratensis*

<b>Sigla</b>	<b>Modulo comportamentale</b>	<b>Significato</b>
A	Fermo	Inattività
B	Si muove (alla ricerca di afidi)	Attività
C	Si nutre	Foraggiamento
D	Parzialmente nascosto (da uno/più afidi)	Occultamento
E	Si nutre ed è parzialmente nascosto (da uno/più afidi)	Occultamento

Tabella 4.2 Etogramma di *A. aphidimyza*.

tempo	modulo	N formiche	note
00:00	contatto	1	Bruco focale grande in cima allo stelo/stecco; bruchi piccoli su due foglie dello stelo principale
00:01	M	1	
00:03	M	1	
00:06	Mcont,G	1	
00:13	Mcont,Gcont	1	
00:20	T	1	La formica cerca di trascinarlo verso il basso
00:23	M,G	1	
00:28	Mcont	1	Stanno cadendo e la formica lo tiene appeso tenendosi allo stecco con le zampe posteriori
00:36	Mcont,T	1	Cerca di trascinarlo verso l'alto
00:39	Mcont+M	2	Formica 2 morde il bruco sulla testa

Tabella 4.3 Esempio di registrazione dei moduli comportamentali osservati durante il continuous sampling (M= morso, G= gaster flexing, T= trasporto)

#### 4.2.2 Calcolo dell'Indice di Aggressività IA

Prima di passare all'elaborazione dei dati, si è reso necessario ottenere un valore che fosse rappresentativo del livello di aggressività mostrato dalle formiche appartenenti a ciascuna colonia nei confronti di ciascun trattamento. Abbiamo assegnato a ciascuna delle sei categorie comportamentali della tabella 1 un coefficiente di aggressività che poteva assumere valori interi da 1 a 4. Antennamento e leccamento che sono comportamenti rispettivamente esplorativi e trofici hanno un coefficiente di aggressività più basso rispetto allo schiocco che è un atteggiamento di minaccia. Morso e gaster flexing sono comportamenti di attacco conclamati ed hanno coefficiente maggiore, infine trascinarsi ha il significato di trasportare la preda verso il nido ed è quindi il comportamento con il maggior coefficiente di aggressività.

- Coefficiente = 1: antennamento, leccamento;
- Coefficiente = 2: schiocco;
- Coefficiente = 3: morso, gaster flexing;
- Coefficiente = 4: trascinarsi.

Per ognuno dei sampling effettuati è stato quindi calcolato un Indice di Aggressività (IA) che è stato poi usato per confrontare il comportamento delle formiche ad ogni intervallo di tempo tra i vari trattamenti (Figura 4.19)

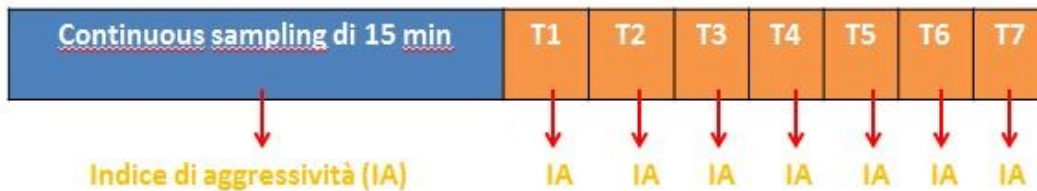


Figura 4.19 Distinzione degli indici di aggressività nel continuous e negli scanning sampling

L'Indice di Aggressività è stato calcolato in maniera diversa per le due parti dell'esperimento:

- per il continuous sampling, l'Indice di Aggressività è basato sul tempo in secondi in cui un comportamento è stato manifestato e misura dunque l'aggressività media durante i 15 minuti di osservazione, ovvero è stata calcolata la sommatoria di tutti i prodotti tra il tempo in secondi in cui un comportamento è stato esibito e il corrispondente coefficiente di aggressività ed in seguito il totale è stato diviso per il numero di secondi dell'intera osservazione (15 minuti = 900 secondi); matematicamente questo calcolo può essere espresso dalla formula:

$$IA = \frac{\Sigma(T \text{ del comp. in sec} * \text{coeff. del comp.})}{900 \text{ sec}}$$

- per gli scanning samplings invece l'Indice di Aggressività è basato sul numero di formiche e misura dunque l'aggressività media per ogni formica in azione, ovvero è stata calcolata la sommatoria di tutti i prodotti tra il numero di formiche che attuano ciascuno dei comportamenti osservati e il corrispondente coefficiente di aggressività ed in seguito il totale è stato diviso per il numero complessivo di formiche in azione osservate in quell'istante; matematicamente questo calcolo può essere espresso dalla seguente formula:

$$IA = \frac{\Sigma(\# \text{ formiche} * \text{coeff. del comp.})}{\text{Tot. formiche in azione}}$$

### **4.2.3 Significato degli esperimenti sul network multitrofico**

Gli esperimenti con i bruchi di *M. brassicae* avevano lo scopo di verificare l'esistenza di interazioni aggressive nei loro confronti da parte delle formiche. In particolare l'esperimento 2) con la presenza anche degli afidi mutualisti mirava a valutare se il livello di aggressività eventualmente presente nei confronti dei bruchi, variava quando vi era la presenza di una relazione trofobiotica tra formiche ed afidi.

Gli esperimenti con gli *A. aphidimyza* avevano il duplice scopo di verificare l'esistenza di interazioni aggressive da parte delle formiche e, in caso di un basso livello di aggressività, di valutare l'esistenza di un camuffamento chimico da parte del predatore afidofago (Lohman 2006; Lang e Menzel 2011; Endo e Itino 2013).

Gli esperimenti 5) e 6) sono stati progettati per quest'ultimo scopo. Abbiamo infatti ipotizzato che le larve, nutrendosi di una particolare specie di afidi, ne assumerebbero gli odori cuticolari come forma di camuffamento. Alla fine del loro sviluppo larvale, venendo spostati per il breve periodo dell'esperimento in una colonia di afidi di specie diversa, dovrebbero risultare maggiormente riconoscibili dalle formiche in quanto possiederebbero un odore diverso dalle specie di afidi presente sul network sperimentale.

### **4.2.4 Esperimenti con le fighting box**

Al contrario che negli esperimenti sul network, dove si valutava l'aggressività di un certo numero di formiche (potenzialmente le 200 formiche del nido), nelle fighting box veniva osservato il comportamento di una singola formica nei confronti di un singolo bruco.

La struttura era composta da una semplice scatola quadrata con lato di 8,5 cm, separata lungo la diagonale da una paratia rimovibile (figura 4.20); la scatola era chiusa nella sua parte superiore da due triangoli di plastica trasparenti trattenuti con un elastico applicato alla struttura, il quale, al momento della rimozione della paratia, faceva scattare i triangoli in avanti facendoli serrare tra di loro, mantenendo in questo modo chiusa la struttura durante l'esperimento.

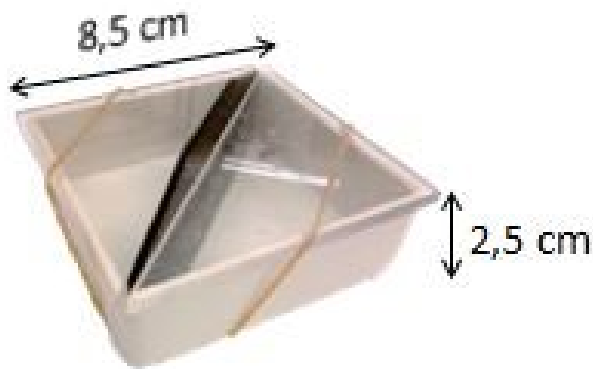


Fig. 4.20 Fighting box

Gli animali da testare sono stati inseriti ognuno in una metà della scatola, dopodiché si attendeva per circa 3 minuti affinché la formica avesse il tempo di ambientarsi e di calmarsi dopo l'azione di disturbo. Ogni singolo esperimento cominciava al momento della rimozione della paratia e aveva una durata massima di 10 minuti così suddivisi: massimo 5 minuti di latenza, ovvero il tempo massimo che la formica può impiegare per avere un primo contatto, accidentale o volontario, con il bruco, a cui seguivano, appena avvenuto il contatto, 5 minuti di continuous sampling, in cui venivano registrati gli stessi moduli comportamentali illustrati precedentemente (crf paragrafo 4.2.1). Nel caso non fosse avvenuto alcun contatto durante i 5 minuti di latenza a causa dell'immobilità della formica, l'esperimento veniva invalidato e ripetuto; nei casi in cui la formica, pur muovendosi all'interno della scatola, non entrava in contatto con il bruco, l'esperimento veniva considerato valido e il livello di aggressività era considerato pari a zero.

Nell'ambito di questa tipologia di esperimenti sono stati testati 3 trattamenti, utilizzando 4 formiche prese da 5 delle 8 colonie a disposizione, per un totale di 60 esperimenti. I trattamenti applicati sono stati:

- Una formica vs un bruco;
- Una formica che per 30 minuti precedenti l'esperimento è stata a contatto con la pianta di *C. sativus* parassitata dagli afidi mutualisti *A gossypii* e che è stata osservata suggerne la melata.
- Una formica a cui è stato somministrato del miele millefiori prima dell'esperimento.

Nel secondo e terzo trattamento, gli esperimenti si effettuavano 15 minuti dopo l'assunzione di nutrimento.

#### 4.2.5 Significato degli esperimenti con le fighting box

Gli esperimenti nelle fighting box sono stati effettuati per valutare il livello di aggressività delle formiche verso *M. brassicae* in un ambiente neutrale, isolato dagli altri fattori ambientali, come la presenza della pianta, degli afidi o delle altre formiche che potevano in qualche modo interferire sul comportamento delle singole formiche. I trattamenti avevano anche lo scopo di verificare eventuali effetti del tipo di dieta sul comportamento che la formica esprime verso i bruchi. Nel primo trattamento le formiche potrebbero attaccare il bruco considerandolo una preda. Nel secondo esperimento la formica potrebbe mostrare atteggiamenti aggressivi nei confronti del bruco anche per difendere gli afidi, con i quali è stata a contatto, da un competitore (il bruco) per la stessa risorsa (la pianta) oppure potrebbe diminuire la sua aggressività perché si è già nutrita di melata. Il terzo trattamento aveva lo scopo di evidenziare se l'eventuale diminuzione dei livelli di aggressività del secondo trattamento fosse dovuta al semplice fatto che le formiche testate erano sazie.

### 4.3 Analisi dei dati

I dati sperimentali sono stati divisi in tre gruppi, trattati separatamente, riguardanti:

1. Il comportamento di *F. pratensis* verso *M. brassicae*
2. Il comportamento di *F. pratensis* verso *A. aphidimyza*
3. Il comportamento di *A. aphidimyza* in presenza di *F. pratensis*

Per il comportamento delle formiche è stato analizzato il livello di predazione e gli Indici di Aggressività manifestati nei confronti delle due specie target, effettuando i seguenti confronti:

- Livello di predazione
  - Confronto tra test e controllo
  - Confronto tra trattamenti

- Indici di Aggressività
  - Confronto tra trattamenti per il continuous sampling
  - Confronto tra trattamenti per gli scanning sampling

#### **4.3.1 Livello di predazione**

Per valutare il livello di predazione delle formiche sui bruchi di *M. brassicae* e sulle larve di *A. aphidimyza*, durante tutta la durata dell'esperimento è stato registrato il numero di individui di queste specie inseriti nel trattamento che erano ancora vivi nel momento dell'osservazione considerata e la loro posizione all'interno dell'apparato sperimentale. Lo scopo di queste osservazioni era valutare quanto velocemente queste specie venissero aggredite e uccise dalle formiche e dunque, attraverso il loro tasso di mortalità, avere un'ulteriore informazione sull'attività e l'aggressività delle formiche espressa nei loro confronti.

Come prima cosa abbiamo voluto verificare che ci fosse una differenza statisticamente significativa tra test e controllo (presenza/assenza formiche), ovvero se all'interno dell'esperimento la presenza delle formiche incideva in qualche modo sulla mortalità dei bruchi di *M. brassicae* e delle larve di *A. aphidimyza*. Una volta appurata l'esistenza di una differenza significativa tra test e controllo, è stato eseguito un confronto tra i diversi trattamenti per valutare se i tempi di scomparsa fossero in qualche modo influenzati dal numero e tipo di specie che compongono il trattamento.

Per l'analisi è stata utilizzata l'ANOVA univariata ad un criterio di classificazione. La variabile dipendente oggetto dei test è stato il numero medio di individui vivi, mentre i criteri di classificazione presi in esame sono stati il fattore presenza/assenza formiche (nel confronto tra test e controllo) e il fattore trattamento (nel confronto tra trattamenti).

#### **4.3.2 Indici di Aggressività**

L'analisi degli Indici di Aggressività è stata divisa in 2 parti per ogni esperimento: un continuous sampling di 15 minuti realizzato all'inizio di ogni esperimento e 7 scanning samplings successivi. I due

indici ricavati con le formule descritte nel paragrafo 4.2.2 sono stati considerati separatamente, poiché non sono tra loro confrontabili.

Per i dati relativi agli scanning sampling sono state eseguite delle Analisi della Varianza, ANOVA univariata, seguite eventualmente dal test post hoc di Tukey. I valori degli indici comportamentali costituivano la variabile indipendente, mentre la tipologia di trattamento rappresentava quella dipendente. Ciascuna analisi si focalizzava in modo distinto sul comportamento di *F. pratensis* nei confronti dei bruchi di *M. brassicae* o delle larve di *A. aphidimyza* e aveva lo scopo di verificare se vi era differenza tra i trattamenti.

Per i dati concernenti il continuous sampling, negli esperimenti riguardanti i bruchi è stata eseguita un'analisi della varianza, ANOVA univariata, mentre per quelli riguardanti *A. aphidimyza* è stata effettuata un'Analisi della Devianza con il test del Chi-quadrato.

Infine per gli Indici di Aggressività delle formiche rispetto ai bruchi utilizzando le fighting box è stata fatta un'analisi della varianza, ANOVA univariata, comparando i 3 trattamenti diversi tra loro.

Queste analisi erano eventualmente seguite dal test post hoc di Tukey. I valori degli indici comportamentali costituivano la variabile indipendente, mentre la tipologia di trattamento rappresentava quella dipendente.

#### **4.3.3 Comportamento di *A. aphidimyza* in presenza di formiche**

Anche il comportamento delle larve di *A. aphidimyza* è stato osservato sia nel continuous che negli scanning sampling, in presenza di formiche. Durante le osservazioni si faceva sempre riferimento all'etogramma di tabella 4.2. Una volta individuati i comportamenti più frequenti, attuati da queste larve nei vari trattamenti, è stata effettuata un'Analisi della Devianza con il test del Chi-quadrato su questi, seguita dal test post hoc di Tukey.

## 5 RISULTATI

### 5.1 comportamento di *F. pratensis* verso *M. brassicae*

#### 5.1.1 Predazione su *M brassicae*

##### 5.1.1.1 Confronto tra presenza e assenza di formiche

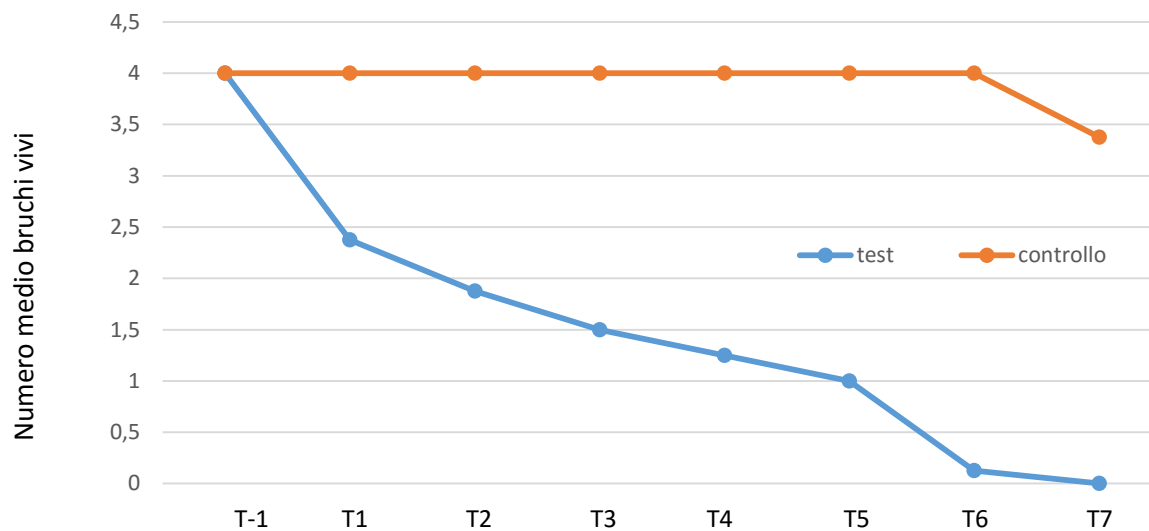
Il numero di bruchi di *M. brassicae* presenti sulle piante, in relazione alla presenza e assenza di formiche nei diversi trattamenti, è rappresentato nei grafici 5.1 e 5.2. Sulle ordinate vi è il numero medio di bruchi osservati ancora vivi ai vari intervalli temporali, indicati sulle ascisse (scanning sampling). I risultati dell'ANOVA univariata evidenziano che le differenze tra i tempi di scomparsa dei bruchi negli esperimenti test, in cui le formiche avevano accesso alla pianta e in quelli di controllo, senza formiche, sono statisticamente significative per tutti gli intervalli di tempo considerati negli scanning sampling (T1-T7), sia nel trattamento 1) con i soli bruchi, sia nel 2) con i bruchi e gli afidi mutualisti. La presenza delle formiche, quindi, è risultata avere un forte impatto sul tasso di sopravvivenza dei bruchi (tabella 5.1 e 5.2).

##### 5.1.1.2 Confronto tra i trattamenti

Appurata l'esistenza di una differenza statisticamente significativa tra esperimenti test ed esperimenti controllo, è stato eseguito un ulteriore confronto tra i trattamenti comprendenti i bruchi di *M. brassicae* per verificare eventuali differenze. In Figura 5.3 è rappresentato l'andamento del tasso di sopravvivenza dei bruchi negli intervalli di tempo considerati negli scanning sampling per i trattamenti 1) solo bruchi e 2) bruchi e afidi mutualisti.

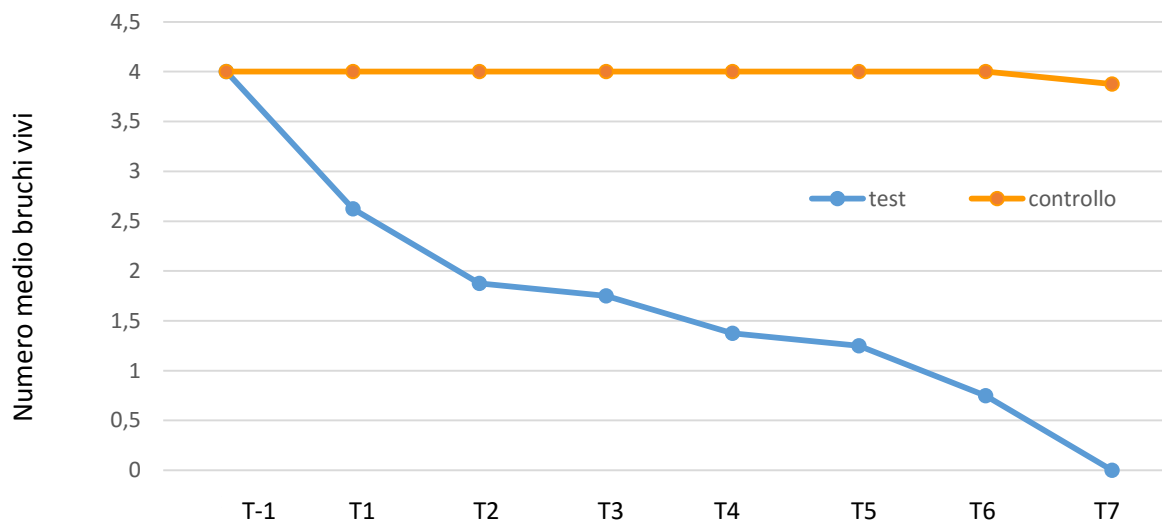
In questo caso il tasso di predazione delle formiche nei confronti dei bruchi risulta simile nei due trattamenti e non vi sono differenze statisticamente significative in nessuno degli intervalli di tempo considerati (tabella 5.3).

### TRATTAMENTO 1) CON SOLO I BRUCHI



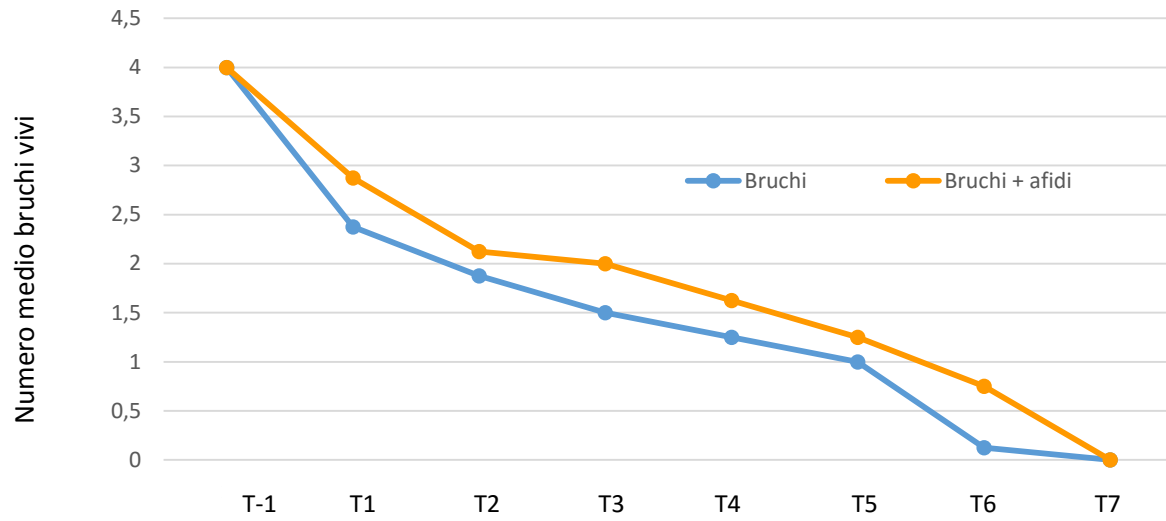
Graf. 5.1 Numero medio di bruchi vivi nei successivi scanning sampling. Differenza tra test (presenza formiche) e controllo (assenza formiche). Il tempo T-1 equivale al momento in cui vengono posti i bruchi sulle piante.

### TRATTAMENTO 2) CON BRUCHI E AFIDI MUTUALISTI



Graf. 5.2 Numero medio di bruchi vivi nei successivi scanning sampling. Differenza tra test (presenza formiche) e controllo (assenza formiche). Il tempo T-1 equivale al momento in cui vengono posti i bruchi sulle piante.

### CONFRONTO TRA TRATTAMENTO 1) E 2)



Graf. 5.3 Numero medio di bruchi vivi nei successivi scanning sampling. Differenza tra trattamento 1) (solo bruchi) e trattamento 2) (bruchi + afidi). Il tempo T-1 equivale al momento in cui vengono posti i bruchi sulle piante.

## ANOVA univariata

Variabile dipendente: MEDIA DEI BRUCHI VIVI

TRATTAMENTO 1) CON SOLO I BRUCHI		Somma dei quadrati	df	Media dei quadrati	F	Sig.
NBRUCHIT1	Fra gruppi	10,563	1	10,563	8,273	,012
	Entro gruppi	17,875	14	1,277		
	Totale	28,438	15			
NBRUCHIT2	Fra gruppi	18,063	1	18,063	13,397	,003
	Entro gruppi	18,875	14	1,348		
	Totale	36,938	15			
NBRUCHIT3	Fra gruppi	25,000	1	25,000	25,000	,000
	Entro gruppi	14,000	14	1,000		
	Totale	39,000	15			
NBRUCHIT4	Fra gruppi	30,250	1	30,250	36,826	,000
	Entro gruppi	11,500	14	,821		
	Totale	41,750	15			
NBRUCHIT5	Fra gruppi	36,000	1	36,000	50,400	,000
	Entro gruppi	10,000	14	,714		
	Totale	46,000	15			
NBRUCHIT6	Fra gruppi	60,063	1	60,063	961,000	,000
	Entro gruppi	,875	14	,063		
	Totale	60,938	15			
NBRUCHIT7	Fra gruppi	45,563	1	45,563	340,200	,000
	Entro gruppi	1,875	14	,134		
	Totale	47,438	15			

Tab. 5.1 ANOVA univariata. I valori sono significativi per ogni intervallo di tempo degli scanning sampling

## ANOVA univariata

Variabile dipendente: MEDIA DEI BRUCHI VIVI

TRATTAMENTO 2) CON BRUCHI E AFIDI		Somma dei quadrati	df	Media dei quadrati	F	Sig.
	Fra gruppi	7,563	1	7,563	5,923	,029
NBRUCHIT1	Entro gruppi	17,875	14	1,277		
	Totale	25,438	15			
	Fra gruppi	18,063	1	18,063	10,166	,007
NBRUCHIT2	Entro gruppi	24,875	14	1,777		
	Totale	42,938	15			
	Fra gruppi	20,250	1	20,250	11,118	,005
NBRUCHIT3	Entro gruppi	25,500	14	1,821		
	Totale	45,750	15			
	Fra gruppi	27,563	1	27,563	14,913	,002
NBRUCHIT4	Entro gruppi	25,875	14	1,848		
	Totale	53,438	15			
	Fra gruppi	30,250	1	30,250	19,698	,001
NBRUCHIT5	Entro gruppi	21,500	14	1,536		
	Totale	51,750	15			
	Fra gruppi	42,250	1	42,250	38,161	,000
NBRUCHIT6	Entro gruppi	15,500	14	1,107		
	Totale	57,750	15			
	Fra gruppi	60,063	1	60,063	961,000	,000
NBRUCHIT7	Entro gruppi	,875	14	,063		
	Totale	60,938	15			

Tab. 5.2 ANOVA univariata. I valori sono significativi per ogni intervallo di tempo degli scanning sampling

## ANOVA univariata

Variabile dipendente: MEDIA DEI BRUCHI VIVI

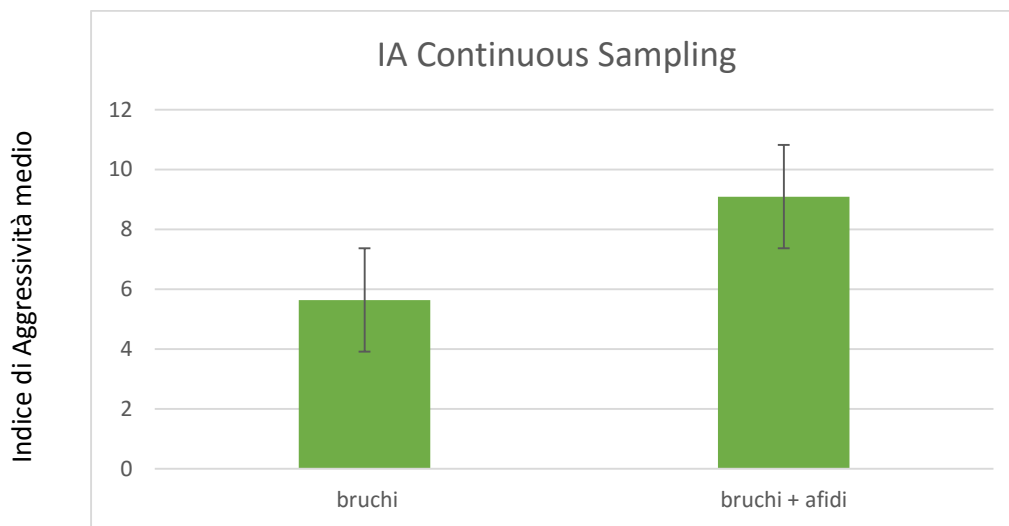
CONFRONTO FRA TRATTAMENTI		Somma dei quadrati	df	Media dei quadrati	F	Sig.
NBRUCHIT1	Fra gruppi	1,000	1	1,000	,427	,524
	Entro gruppi	32,750	14	2,339		
	Totale	33,750	15			
NBRUCHIT2	Fra gruppi	,250	1	,250	,080	,781
	Entro gruppi	43,750	14	3,125		
	Totale	44,000	15			
NBRUCHIT3	Fra gruppi	1,000	1	1,000	,350	,564
	Entro gruppi	40,000	14	2,857		
	Totale	41,000	15			
NBRUCHIT4	Fra gruppi	,563	1	,563	,223	,644
	Entro gruppi	35,375	14	2,527		
	Totale	35,938	15			
NBRUCHIT5	Fra gruppi	,250	1	,250	,111	,744
	Entro gruppi	31,500	14	2,250		
	Totale	31,750	15			
NBRUCHIT6	Fra gruppi	1,563	1	1,563	1,336	,267
	Entro gruppi	16,375	14	1,170		
	Totale	17,938	15			
NBRUCHIT7	Fra gruppi	,000	1	,000	.	.
	Entro gruppi	,000	14	,000		
	Totale	,000	15			

Tab. 5.3 ANOVA univariata. Non vi sono valori significativi in nessun intervallo di tempo degli scanning sampling

## 5.1.2 Indici di aggressività

### 5.1.2.1 Continuous sampling

Il valore dell'Indice di Aggressività (IA) delle formiche nei confronti di *M. brassicae* è risultato più elevato nel trattamento con la presenza degli afidi mutualisti (IA= 9,09) rispetto al trattamento con i soli bruchi (IA= 5,64) sebbene tale differenza non risulti statisticamente significativa, come mostra l'ANOVA univariata in tabella 5.4. Il grafico 5.4 mostra il valore medio dell'IA calcolato sugli 8 nidi per ciascun esperimento.



Graf. 5.4 Media degli indici di aggressività nel continuous sampling nei confronti dei bruchi di *M. brassicae*.

### ANOVA univariata

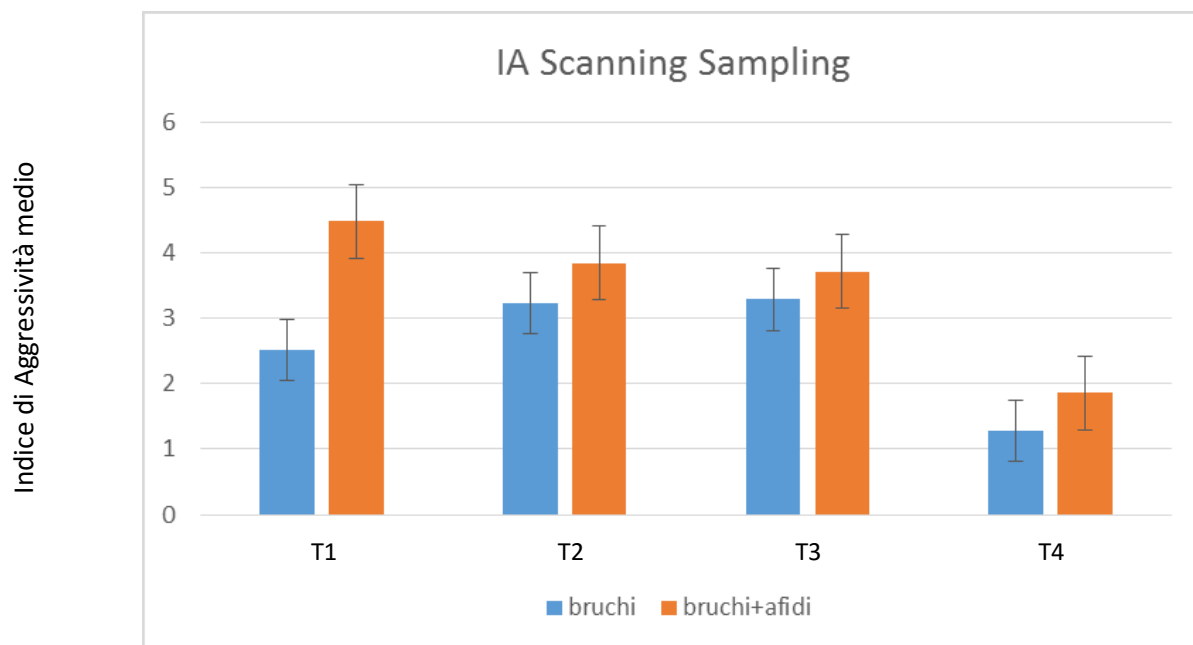
#### IA continuous

CONFRONTO TRA TRATTAMENTI	Somma dei quadrati	df	Media dei quadrati	F	Sig.
Fra gruppi	40,966	1	40,966	1,842	,200
Entro gruppi	266,883	12	22,240		
Totale	307,850	13			

Tab. 5.4 ANOVA univariata. Valore non significativo nel confronto fra gli IA del trattamento bruchi e bruchi+afidi

### 5.1.2.2 Scanning sampling

L'andamento dell'IA negli scanning sampling mostra un'aggressività mediamente maggiore quando sulla pianta sono presenti gli afidi mutualisti ma questa differenza non è statisticamente significativa (tabella 5.5). Dal tempo t5 al t7 il numero medio dei bruchi sopravvissuti alla predazione era talmente esiguo (trattamento afidi: T5 n=1, T6 n= 0,12, T7 n=0; trattamento afidi+bruchi: T5 n= 1,25; T6 n= 0,75, T7 n=0. Vedi graf. 5.3) che le interazioni aggressive verso i bruchi erano uguali a 0 in molti nidi. Questi scanning non sono stati quindi presi in considerazione nel trattamento statistico.



Graf. 5.5 Media dell'IA negli scanning sampling (T1-T4) verso i bruchi di *M. brassicae*. Confronto tra i trattamenti

## ANOVA univariata

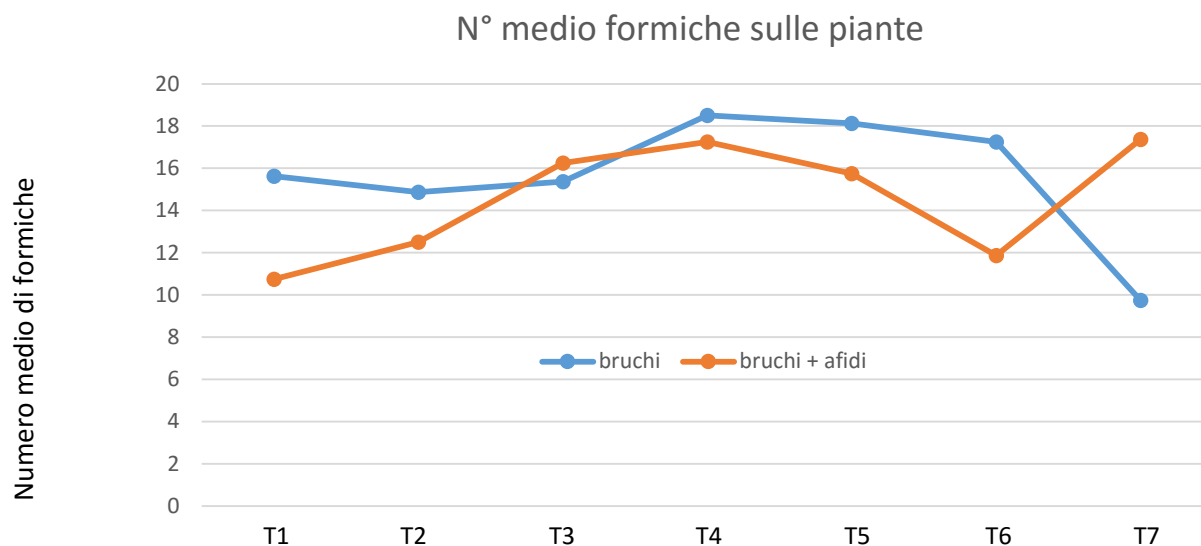
### IA Scanning

CONFRONTO TRA TRATTAMENTI		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
IA T1	Between Groups	14,000	1	14,000	4,055	,067
	Within Groups	41,429	12	3,452		
	Total	55,429	13			
IA T2	Between Groups	1,143	1	1,143	,324	,580
	Within Groups	42,286	12	3,524		
	Total	43,429	13			
IA T3	Between Groups	,643	1	,643	,141	,714
	Within Groups	54,857	12	4,571		
	Total	55,500	13			
IA T4	Between Groups	,886	1	,886	,162	,695
	Within Groups	60,190	11	5,472		
	Total	61,077	12			

Tab. 5.5 ANOVA univariata. Valore non significativo nel confronto fra gli IA del trattamento bruchi e bruchi+afidi

Durante gli scanning sampling è stato registrato anche il numero di formiche presenti sulle piante, nei due trattamenti.

Dall'analisi con l'ANOVA univariata del numero di formiche presenti sulla pianta nei due trattamenti ai vari tempi degli scanning sampling, risulta una differenza significativa per il tempo T7, 24 ore dopo l'inizio degli esperimenti (grafico 5.6; tabella 5.6).



Graf. 5.6 Numero medio di formiche presenti sulle piante di *C. sativus* ai vari scanning sampling

Durante le osservazioni comportamentali nel trattamento con la presenza degli afidi abbiamo notato che la maggior parte delle formiche che raggiungevano la pianta iniziavano subito a interessarsi alla melata, suggendola direttamente dagli afidi o leccando quella presente sulla superficie delle foglie (figura 5.1). Questo comportamento e quello conseguente di trofallassi tra formiche (figura 5.2), rallentava l'attività di esplorazione della pianta. Le interazioni aggressive verso i bruchi venivano esercitate da altre formiche, non impegnate nel raccogliere la melata. Si è verificata in sostanza una divisione in due gruppi distinti di formiche: le "milkers" e le "guards" (Novgorodova 2006)

Al tempo T7, 24 ore dopo l'inizio degli esperimenti, il numero di formiche è significativamente maggiore nel trattamento con gli afidi perché è presente ancora una fonte trofica da gestire. Nell'esperimento con i soli bruchi invece al tempo T7 tutti i bruchi sono stati predati e la pianta, perdendo di interesse, veniva poco presidiata dalle formiche.



Fig. 5.1 Formica intenta a leccare la superficie di una foglia di cetriolo coperta di melata



Fig. 5.1 Una formica passa per trofallarsi ad un'altra parte della melata che ha raccolto in precedenza

## ANOVA univariata

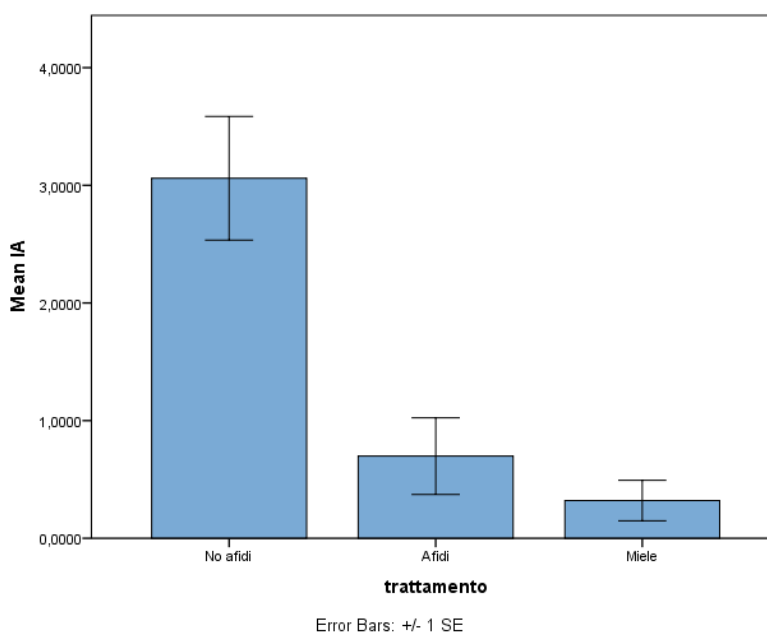
Variabile dipendente: MEDIA NUMERO FORMICHE SULLE PIANTE

CONFRONTO TRA TRATTAMENTI		Somma dei quadrati	df	Media dei quadrati	F	Sig.
	Fra gruppi	95,063	1	95,063	,994	,336
NFORMICHET1	Entro gruppi	1339,375	14	95,670		
	Totale	1434,437	15			
	Fra gruppi	22,563	1	22,563	,243	,630
NFORMICHET2	Entro gruppi	1298,875	14	92,777		
	Totale	1321,438	15			
	Fra gruppi	3,063	1	3,063	,023	,883
NFORMICHET3	Entro gruppi	1897,375	14	135,527		
	Totale	1900,438	15			
	Fra gruppi	6,250	1	6,250	,042	,840
NFORMICHET4	Entro gruppi	2059,500	14	147,107		
	Totale	2065,750	15			
	Fra gruppi	22,563	1	22,563	,149	,705
NFORMICHET5	Entro gruppi	2118,375	14	151,313		
	Totale	2140,938	15			
	Fra gruppi	115,563	1	115,563	,994	,336
NFORMICHET6	Entro gruppi	1628,375	14	116,313		
	Totale	1743,937	15			
	Fra gruppi	232,563	1	232,563	8,537	,011
NFORMICHET7	Entro gruppi	381,375	14	27,241		
	Totale	613,938	15			

Tab. 5.6 ANOVA univariata. E' presente un valore significativo al tempo T7

### 5.1.2.3 Fighting box

I trattamenti con le fighting box hanno messo in luce che le formiche che si sono nutrite di melata hanno interazioni aggressive significativamente più basse rispetto alle formiche che non hanno avuto contatti con gli afidi (grafico 5.7); paragonabili alle interazioni che esercitano le formiche nutrite preventivamente con del miele (ANOVA univariata, tabella 5.7). Dal test post hoc di Tukey (tabella 5.8) è emerso che è il trattamento “No afidi”, cioè quello in cui le formiche non sono mai entrate in contatto con gli afidi mutualisti e non si sono nutrite di miele, che è differente rispetto ai trattamenti “afidi” e “miele”.



Graf. 5.7 Confronto fra IA medio tra formiche che non hanno avuto contatto con gli afidi e formiche che ne hanno assunto la melata in precedenza

### ANOVA

#### IA Fighting box

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	88,164	2	44,082	16,076	,000
Within Groups	156,303	57	2,742		
Total	244,467	59			

Tab. 5.7 ANOVA univariata. Il confronto è significativo

test di Tukey: comparazioni multiple delle medie

Variabile dipendente: IA

(I) trattamento	(J) trattamento	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval
					Lower Bound
No afidi	Afidi	2,3620000*	,5236569	,000	1,101863
	Miele	2,7392000*	,5236569	,000	1,479063
Afidi	No afidi	-2,3620000*	,5236569	,000	-3,622137
	Miele	,3772000	,5236569	,753	-,882937
Miele	No afidi	-2,7392000*	,5236569	,000	-3,999337
	Afidi	-,3772000	,5236569	,753	-1,637337

Tab. 5.8 Test di Tukey. Il trattamento No afidi differisce dagli altri due.

## 5.2 comportamento di *F. pratensis* verso *A. aphidimyza*

### 5.2.1 Predazione su *A. aphidimyza*

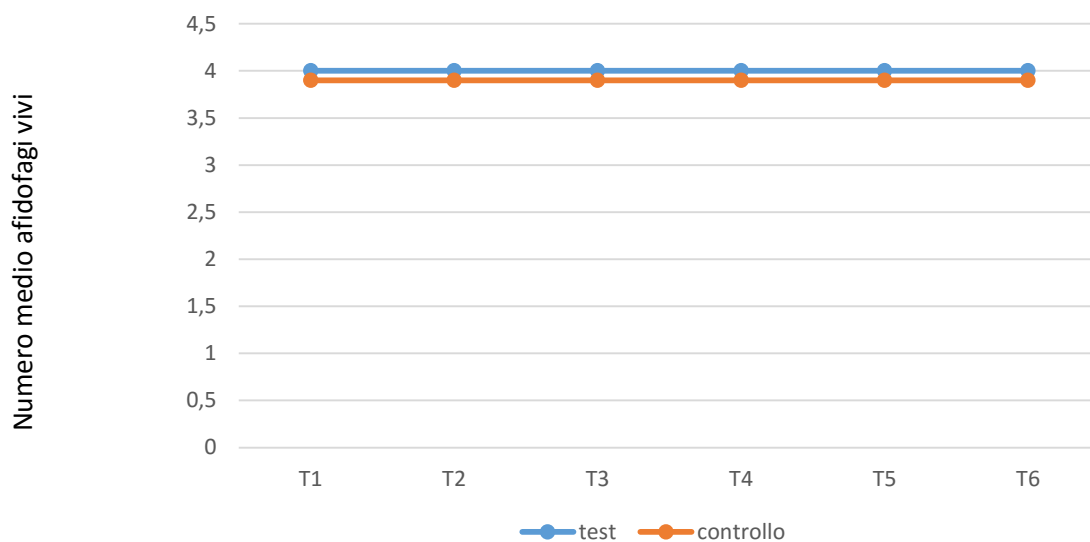
#### 5.2.1.1 Confronto tra presenza e assenza di formiche

Il numero di *A. aphidimyza* presenti sulle piante, in relazione alla presenza e assenza di formiche nei diversi trattamenti è rappresentato nei grafici 5.8; 5.9; 5.10 e 5.11. Sulle ordinate vi è il numero medio di *A. aphidimyza* osservati ancora vivi ai vari intervalli temporali, indicati sulle ascisse (scan samplings). I primi due grafici riguardano i trattamenti non incrociati, mentre gli altri due quelli in cui gli afidofagi son cresciuti nutrendosi di una specie di afide e poi, per il tempo dell'esperimento, sono stati posti in mezzo agli afidi dell'altra specie (incrociati).

Nell'analisi statistica (ANOVA univariata) non è stato preso in considerazione il tempo T7 in quanto nell'intervallo di tempo di 24 ore diversi esemplari di *A. aphidimyza* si sono impupati nel terreno e non è stato possibile ritrovarli tutti. Questo avrebbe comportato una complicazione nel trattamento dei dati. I risultati statistici indicano che non vi è differenza significativa tra test (presenza di formiche) e controllo (assenza di formiche) nei trattamenti non incrociati. Nei trattamenti incrociati risulta una differenza significativa ad ogni tempo degli scanning sampling considerati quando l'afidofago si è nutrito con l'afide mutualista *A. gossypii* e quindi è stato spostato sulle piante ospitanti *M. persicae* mentre la situazione opposta non determina un livello di predazione da parte delle formiche significativo rispetto al controllo.

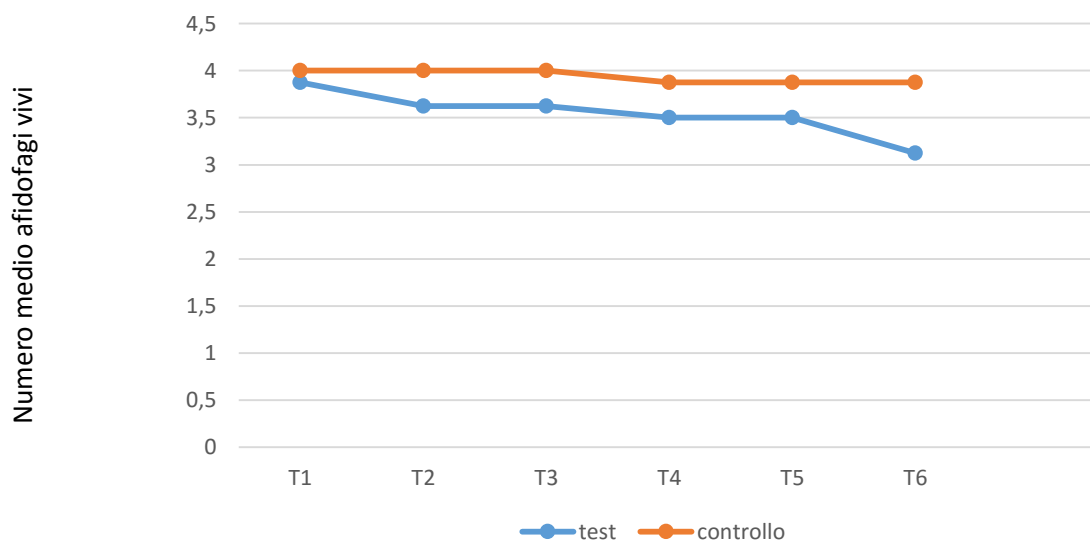
Nel grafico 5.8 (trattamento 3 con afidi mutualisti) si può vedere come il numero medio di *A. aphidimyza* sia uguale in presenza ed assenza di formiche e rimanga costante nel tempo. In questo trattamento quindi, le formiche non hanno avuto alcun effetto su questo predatore degli afidi. Nel grafico 5.9 (trattamento 4 con afidi non mutualisti) si nota come il numero medio di *A. aphidimyza* in presenza di formiche diminuisca leggermente nel tempo (non significativamente). Il grafico 5.10 mostra l'esperimento incrociato in cui gli afidofagi si sono nutriti a spese di *M. persicae* e poi sono stati spostati tra gli afidi mutualisti *A. gossypii* (trattamento 5). Anche in questo caso si può notare che le formiche non hanno nessuna influenza sulla mortalità delle larve. L'unico trattamento in cui le formiche impattano in modo rilevante sulla sopravvivenza di *A. aphidimyza* è quello incrociato in cui le larve si nutrono di *A. gossypii* per poi essere messe sulle piante infestate da *M. persicae* (trattamento 6) (grafico 5.11 e tabella 5.8).

### TRATTAMENTO 3) *A. APHIDIMYA* E AFIDI MUTUALISTI



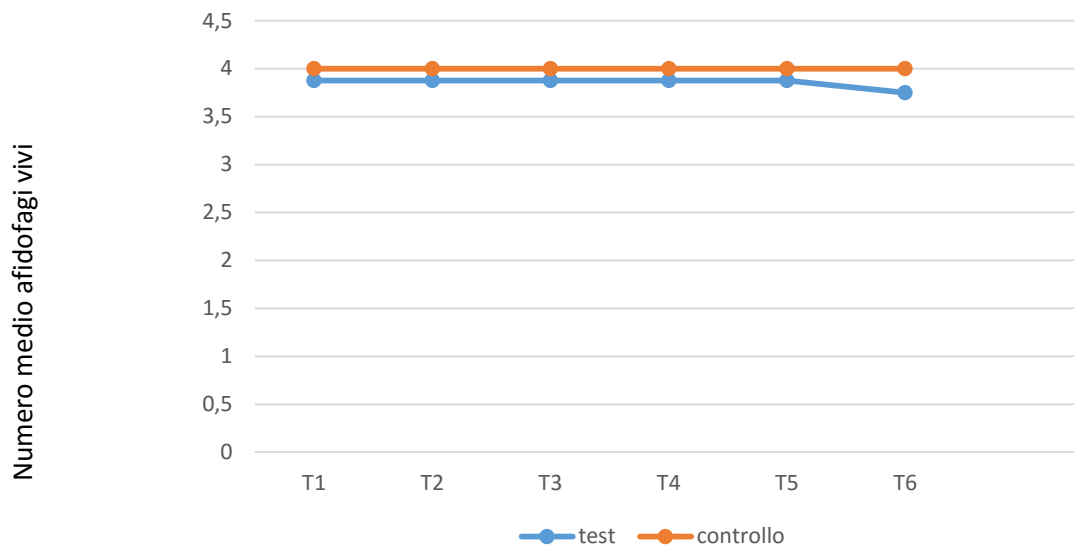
Graf. 5.8 Numero medio di afidofagi vivi nei successivi scanning sampling. Differenza tra test (presenza formiche) e controllo (assenza formiche).

### TRATTAMENTO 4) *A. APHIDIMYA* E AFIDI NON MUTUALISTI



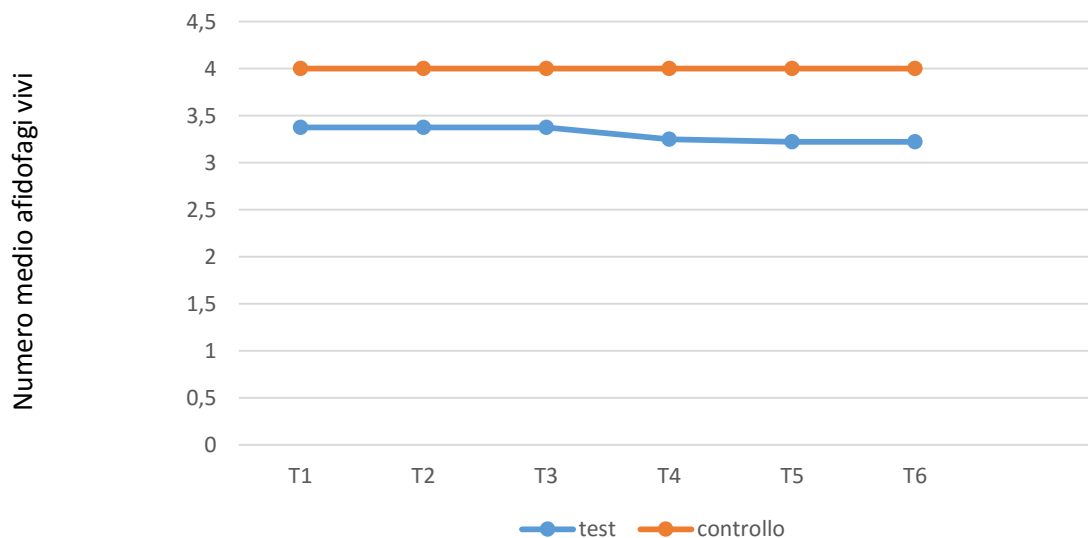
Graf. 5.9 Numero medio di afidofagi vivi nei successivi scanning sampling. Differenza tra test (presenza formiche) e controllo (assenza formiche).

### TRATTAMENTO 5) *A. APHIDIMYA* E AFIDI MUTUALISTI INCROCIATO



Graf. 5.10 Numero medio di afidofagi vivi nei successivi scanning sampling. Differenza tra test (presenza formiche) e controllo (assenza formiche).

### TRATTAMENTO 6) *A. APHIDIMYA* E AFIDI NON MUTUALISTI INCROCIATO



Graf. 5.11 Numero medio di afidofagi vivi nei successivi scanning sampling. Differenza tra test (presenza formiche) e controllo (assenza formiche). In questo trattamento alcune larve sulle piante test erano state predate durante il continuous sampling che precedeva gli scanning.

### ANOVA univariata

Variabile dipendente: MEDIA DEGLI *A. APHIDIMYZA* VIVI

TRATTAMENTO 6) INCROCIATO		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
t1	Between Groups	1,563	1	1,563	11,667	,004
	Within Groups	1,875	14	,134		
	Total	3,438	15			
t2	Between Groups	1,563	1	1,563	11,667	,004
	Within Groups	1,875	14	,134		
	Total	3,438	15			
t3	Between Groups	1,563	1	1,563	11,667	,004
	Within Groups	1,875	14	,134		
	Total	3,438	15			
t4	Between Groups	2,250	1	2,250	21,000	,000
	Within Groups	1,500	14	,107		
	Total	3,750	15			
t5	Between Groups	3,063	1	3,063	14,913	,002
	Within Groups	2,875	14	,205		
	Total	5,938	15			
t6	Between Groups	3,063	1	3,063	14,913	,002
	Within Groups	2,875	14	,205		
	Total	5,938	15			

Tab. 5.8 ANOVA univariata. I valori sono significativi per ogni intervallo di tempo degli scanning sampling

## 5.2.2 Indici di aggressività

### 5.2.2.1 Continuous sampling

Per quanto riguarda i valori dell'Indice di Aggressività di *F. pratensis* verso *A. aphidimyza* è stata effettuata un'Analisi della Devianza. Questa ha evidenziato che vi è una differenza significativa tra i trattamenti (test Chi-quadrato, 3 gradi di libertà,  $p < 0.05$  \*).

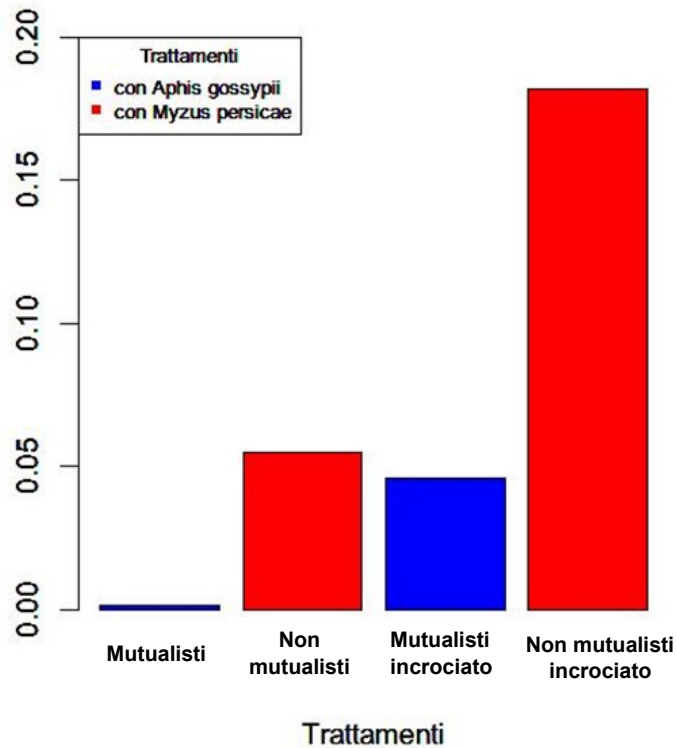
Tabella dell'Analisi della Devianza, con test del Chi-quadrato

Fattore	Df	Deviance Residual	Df Residual	Deviance	p-value
Trattamenti	3	2.2477	28	5.6842	0.02577 *
Residui			31	7.9319	

Tabella 5.9 Output dell'Analisi della Devianza sull'Indice di Aggressività (formiche vs *A. aphidimyza*).

Nel grafico 5.12 è riportato il valore medio di Aggressività nei vari trattamenti. Si può notare che le formiche hanno interazioni aggressive nei confronti di *A. aphidimyza* più frequentemente nel trattamento incrociato in cui le larve inizialmente si nutrono degli afidi mutualisti *A. gossypii* e poi vengono poste tra gli afidi non mutualisti *M. persicae* (trattamento 6). Nel trattamento non incrociato con gli afidi mutualisti (trattamento 3), i livelli di aggressività sono, invece, rasenti allo zero. Le formiche non riescono, quindi, ad individuare questo predatore tra gli afidi mutualisti.

## IA Continuous Sampling



Graf. 5.12 Media degli indici di aggressività nel continuous sampling nei confronti di *A. aphidimyza* nei 4 trattamenti.

### 5.2.2.2 Scanning sampling

Per quanto riguarda i valori dell'Indice di Aggressività di *F. pratensis* verso *A. aphidimyza* è stata eseguita un'Analisi della Varianza che ha evidenziato una differenza significativa tra i trattamenti (test di Fisher, 3 gradi di libertà,  $p < 0.05$  \*) nelle interazioni aggressive che le formiche hanno verso le larve dell'afidofago.

Tabella dell'Analisi della Varianza, con test di Fisher

	Df	Somma Sq	Media Sq	F value	p-value
Trattamenti	3	1.871	0.62382	3.1536	0.02609
Residui	188	37.189	0.19781		

Tabella 5.10 Output dell'Analisi della Varianza (Sq sta per scarti quadratici).

Il test post hoc di Tukey ha dimostrato che questa differenza tra i trattamenti è da attribuire soprattutto alla coppia [trattamento incrociato 6-trattamento afidi mutualisti 3] (Wald test,  $p < 0.05$  \*). Il trattamento incrociato 6 con gli afidofagi posti tra gli afidi non mutualisti dopo che si sono nutriti di afidi mutualisti, è quindi significativamente differente dal trattamento non incrociato con gli afidi mutualisti.

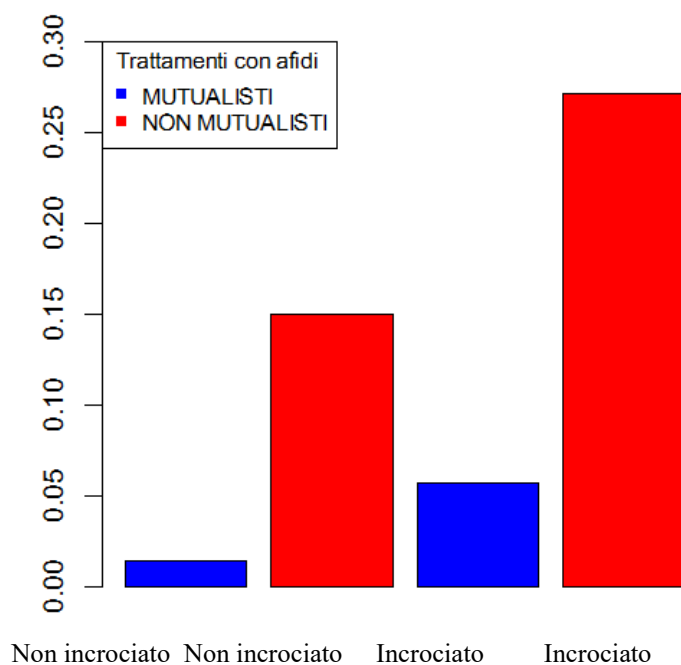
test di Tukey: comparazioni multiple delle medie

Coppie	Differenze tra le medie	Standar Error	z value	p-value
4)-3)	0.13621032	-0.09912325	0.3715439	0.4393381
5)-3)	0.04361907	-0.19171449	0.2789526	0.9633410
<b>6)-3)</b>	0.25763889	0.02230532	0.4929725	<b>0.0257353</b>
5)-4)	-0.09259125	-0.32792481	0.1427423	0.7380210
6)-4)	0.12142857	-0.11390499	0.3567621	0.5402594
6)-5)	0.21401982	-0.02131375	0.4493534	0.0890717

Tabella 5.11 Output del test post hoc di Tukey (formiche vs *A. aphidimyza*).

Il grafico 5.13 riporta i valori medi dell'Indice di Aggressività delle formiche verso *A. aphidimyza*, per ciascun trattamento. Il valore medio di IA nel trattamento incrociato 6 è maggiore rispetto a quelli dei trattamenti non incrociati (3 e 4). In questo grafico si può anche notare che le formiche hanno reazioni aggressive verso il dittero afidofago con maggiore frequenza nei due trattamenti con gli afidi non mutualisti (colonne rosse), rispetto a quelli con gli afidi mutualisti (colonne blu). Le formiche, quindi, manifestano comportamenti antagonisti, verso le larve di *A. aphidimyza*, in presenza degli afidi non mutualisti. Nel trattamento non incrociato con gli afidi mutualisti (3), i livelli di aggressività sono, invece, rasenti allo zero. Questi risultati sembrano contraddire il paradigma della trofobiosi, in cui un simbionte fornisce nutrimento all'altro in cambio di protezione. In questo caso, l'equilibrio di questa relazione mutualistica viene meno, poiché le formiche non riescono a difendere gli afidi che da questo dittero afidofago.

## IA MEDIA SCANNING SAMPLING PER I 4 TRATTAMENTI



Graf. 5.13 Valori medi dell'Indice di Aggressività delle formiche verso *A. aphidimyza*, per ciascun trattamento

### 5.3 comportamento di *A. aphidimyza*

Tenendo presente l'etogramma dei comportamenti di *A. aphidimyza* (tabella 5.12 cfr. par.4.2.1), sono stati osservati i comportamenti di questo cecidiomide negli scanning sampling, sulle piante dei test (presenza di formiche).

Sigla	Modulo comportamentale	Significato
A	Fermo	Inattività
B	Si muove (alla ricerca di afidi)	Attività
C	Si nutre	Foraggiamento
D	Parzialmente nascosto (da uno/più afidi)	Occultamento
E	Si nutre ed è parzialmente nascosto (da uno/più afidi)	Occultamento

Tabella 5.12 Etogramma di *A. aphidimyza*.

Con la formula  $n^{\circ} \text{ osservazioni di un comportamento} / n^{\circ} \text{ osservazioni totali}$  abbiamo ricavato la frequenza media di ogni comportamento dell'etogramma (tabella 5.13)

Comportamenti	Frequenza
A	0.21813301
B	0.07898415
C	0.55343349
D	0.10842236
E	0.04102698

Tabella 5.13 Frequenze relative medie dei comportamenti di *A. aphidimyza*.

Per le successive analisi sono stati selezionati solamente i comportamenti di *A. aphidimyza* mediamente più frequenti, cioè il foraggiamento (C) e l'inattività (A).

Per il comportamento di foraggiamento di *A. aphidimyza* in presenza di formiche, l'Analisi della Devianza ha evidenziato che vi è una significativa differenza tra i trattamenti (test Chi-quadrato, 3 gradi di libertà,  $p < 0.01$  \*\*).

Tabella dell'Analisi della Devianza, con test del Chi-quadrato

Fattori	Df	Deviance Residual	Df Residual	Deviance	p-value
Trattamenti	3	33.829	28	86.204	0.008636
Residui			31	120.033	

Tab. 5.14 Output dell'Analisi della Devianza sulla frequenza di foraggiamento di *A. aphidimyza*.

Il test post hoc di Tukey, ha messo in luce che questa differenza è da attribuire soprattutto alle seguenti coppie di trattamenti (Wald test,  $p < 0.05$  \*):

[incrociato da mutualista a non mutualista (6)-mutualista (3)]

[incrociato da non mutualista a mutualista (5)-mutualista (3)]

Il trattamento non incrociato con gli afidi mutualisti (3) differisce quindi da entrambi i trattamenti incrociati (5-6)

test di Tukey: comparazioni multiple delle medie

Coppie	Estimate	Standar Error	z value	p-value
4-3	-0.93489	0.39127	-2.389	0.0786
5-3	-1.05686	0.36588	-2.889	0.0203
6-3	-1.02174	0.39573	-2.582	0.0483
5-4	-0.12196	0.39844	-0.306	0.9900
6-4	-0.08685	0.42602	-0.204	0.9970
6-5	0.03512	0.40283	0.087	0.9998

Tabella 5.15 Output del test post hoc di Tukey (foraggiamento *A. aphidimyza*).

La frequenza di foraggiamento nel trattamento con l'afide mutualista (3) è maggiore rispetto a quella dei trattamenti incrociati (5-6). Questo risultato dimostra che c'è un effetto delle formiche sulla capacità di foraggiare delle larve di *A. aphidimyza*, se si trovano tra afidi diversi rispetto a quelli di cui si sono nutriti in fase pre-esperimento

L'Analisi della Devianza sulla frequenza di inattività di *A. aphidimyza*, in presenza di formiche, ha evidenziato che vi è una differenza altamente significativa tra i trattamenti (test Chi-quadrato, 3 gradi di libertà,  $p < 0.0001$  \*\*\*)

Tabella dell'Analisi della Devianza, con test del Chi-quadrato

Fattori	Df	Deviance Residual	Df Residual	Deviance	p-value
Trattamenti	3	38,517	28	55,577	4,484e-05
Residui			31	94,094	

Tab. 5.16 Output dell'Analisi della Devianza sulla frequenza di inattività di *A. aphidimyza*.

Il test post hoc di Tukey, ha evidenziato che vi è una significativa differenza tra il trattamento incrociato con gli afidi non mutualisti (6) e ciascuno degli altri trattamenti.

test di Tukey: comparazioni multiple delle medie

Coppie	Estimate	Standar Error	z value	p-value
4-3	0,07222	0,38956	0,185	0,99773
5-3	0,49357	0,34056	1,449	0,46713
6-3	1,44712	0,33935	4,264	0,001
5-4	0,42136	0,37644	1,119	0,67641
6-4	1,37491	0,37534	3,663	0,00139
6-5	0,95355	0,32420	2,941	0,01688

Tabella 5.17 Output del test post hoc di Tukey (inattività *A. aphidimyza*).

In presenza delle formiche, le larve di *A. aphidimyza* del trattamento incrociato (6) sono meno attive. Le formiche disturbano, quindi, l'attività di foraggiamento di queste larve, fondamentale per il loro sviluppo.

## 6 DISCUSSIONE

Nel presente lavoro ci siamo concentrati sul ruolo che *Formica pratensis* ricopre nel sistema multitrofico basato sulla pianta *Cucumis sativus* e sulle relazioni tra le formiche, gli afidi *Myzus persicae* e *Aphis gossypii*, il fitofago masticatorio *Mamestra brassicae* e il predatore afidofago *Aphidoletes aphidimyza*. In particolare gli esperimenti da noi effettuati miravano a comprendere se l'impatto delle formiche nei confronti delle specie del sistema multitrofico potesse essere condizionato dal tipo di composizione del network nel quale tali specie si trovavano ad interagire e, all'interno di queste relazioni, quanto fosse influente la risorsa rappresentata dagli afidi sul comportamento delle formiche.

Dagli esperimenti sulla predazione verso i bruchi di *M. brassicae* è risultato che le formiche manifestano un elevato potenziale predatorio, eradicando completamente la presenza dei bruchi sulle piante. Tuttavia l'efficacia predatoria non differisce significativamente tra gli esperimenti con la sola presenza dei bruchi sulle piante e quelli con la presenza dei bruchi e degli afidi mutualisti. Anche gli Indici di Aggressività calcolati sul network, sia nei continuous che negli scanning sampling, non hanno rilevato differenze statisticamente significative; il livello di aggressività quindi non cresce con la presenza degli afidi mutualisti che dovrebbero essere difesi dai competitori (gli emitters produttori di melata e gli altri erbivori sono in competizione per la stessa risorsa, cioè la pianta).

Una differenza significativa che potrebbe portare a dei risvolti di tipo applicativo è data dal numero di formiche che presidiano le piante nell'ultimo scanning sampling, ventiquattro ore dopo il primo. Si è visto che nel trattamento con solo i bruchi il numero di formiche rimasto sulle piante era significativamente minore che nel trattamento con i bruchi e gli afidi mutualisti. Le formiche in questo trattamento tendono a rimanere sulle piante per sfruttare la risorsa trofica data dalla melata degli afidi, mentre in presenza dei soli bruchi, a ventiquattro ore di distanza dall'inizio del trattamento, non vi erano più prede vive e quindi la pianta non era più pattugliata dalle formiche. In un'ottica di utilizzo delle formiche in programmi di lotta biologica, la presenza continua di formiche potrebbe essere un vantaggio per la pianta, che sopporterebbe il costo della presenza di afidi ma eviterebbe l'attacco dei fitofagi masticatori.

I risultati degli esperimenti di aggressività con le fighting box hanno messo in luce che le formiche che si sono nutrite di melata hanno interazioni aggressive significativamente più basse nei confronti dei bruchi rispetto alle formiche che non hanno avuto contatti con gli afidi. Il livello di aggressione è paragonabile a quello espresso dalle formiche nutrite preventivamente con miele. E' probabile che l'assunzione di cibo attenui le manifestazioni aggressive delle formiche nei confronti dei bruchi e che quindi queste ultime siano dovute ad un comportamento predatorio e non di difesa della risorsa trofobiotica. Il tasso di predazione e gli indici di aggressività, simili per i due trattamenti sul network multitrofico, si spiegherebbero tenendo conto che le formiche che effettuano interazioni predatorie con i bruchi non sono le stesse che, nel frattempo, si occupano di suggerire la melata dagli afidi.

Dagli esperimenti che hanno coinvolto il predatore degli afidi *A. aphidimyza* è risultato che le formiche non sono in grado di limitare l'azione di questi predatori afidofagi. Ciò è probabilmente dovuto ad un camuffamento chimico adottato dalle larve che acquisirebbero gli odori degli afidi dei quali si nutrono. La relazione tra le formiche e il predatore afidofago *A. aphidimyza* è stata analizzata utilizzando due specie di afidi, una specie che intrattiene normalmente rapporti mutualistici con le formiche (*A. gossypii*) ed una non mutualista (*M. persicae*). Ciò allo scopo di poter valutare se il comportamento delle formiche verso questo predatore fosse in qualche modo modulato dal valore della risorsa da difendere, ovvero dall'intensità della trofobiosi che le formiche instaurano con gli afidi. L'ipotesi iniziale, basata sul paradigma classico della trofobiosi, prevedeva che ad una relazione di mutualismo più stretta, come quella instaurata con *A. gossypii*, corrispondesse un più elevato livello di difesa nei confronti del partner trofobiotico. Dagli esperimenti effettuati è risultato che l'impatto di *F. pratensis* sul tasso di sopravvivenza delle larve di *A. aphidimyza* è trascurabile e che i livelli di aggressività che le formiche esprimono verso questo predatore sono di scarsa intensità, anche in presenza di una relazione trofobiotica più stretta. Tale risultato sembra contraddire il paradigma classico della trofobiosi (in questo caso, protezione dai predatori in cambio di cibo) e suggerisce che le interazioni tra formiche ed *A. aphidimyza* non siano modulate dal valore della risorsa da difendere, in quanto l'appetibilità della melata prodotta dagli afidi non rende le formiche più aggressive verso questo predatore afidofago. Gli adattamenti difensivi delle larve del dittero predatore sono risultati estremamente efficaci e dagli esperimenti è emerso che queste larve non inducono comportamenti aggressivi nelle formiche, che sembrano non accorgersi della presenza di un potenziale predatore degli afidi. È risultato molto interessante il fatto che, anche nel caso di un contatto tra formiche ed *A. aphidimyza*, il più delle volte occasionale, le formiche non abbiano mostrato alcun interesse verso il predatore. Ciò porta ad ipotizzare che le larve di *A.*

*aphidimyza* usufruiscano di qualche caratteristica (fisica, chimica o comportamentale) che le renderebbe di fatto “invisibili” alle formiche.

Sulla base di precedenti ricerche e dei dati raccolti nel presente lavoro è possibile ipotizzare alcune spiegazioni sui meccanismi che garantiscono alle larve di *A. aphidimyza* una efficace difesa nei confronti di *F. pratensis*. Una caratteristica tipica di questo predatore, che potrebbe favorire l’assenza di reazioni da parte delle formiche, è la loro predazione cosiddetta “furtiva”, ovvero la capacità di neutralizzare e nutrirsi a spese degli afidi senza che questi riescano ad emettere feromoni di allarme (Hoffmann e Frodsham, 1993). Questi afidofagi infatti iniettano nel corpo degli afidi una sostanza anestetizzante (Rabasse e van Steenis 1999) che impedisce loro di emettere il feromone di allarme ( $\beta$ -farnesene). Nault *et al.* (1976) e Verheggen *et al.* (2012) hanno dimostrato la elevata reattività delle formiche al  $\beta$ -farnesene. Pertanto, la capacità delle larve di *A. aphidimyza* di predare gli afidi evitando che questi emettano segnali chimici in grado di richiamare le formiche potrebbe rendere più difficile per *F. pratensis* la loro localizzazione.

Un ulteriore adattamento evoluto da questo predatore potrebbe essere il camuffamento chimico; è ipotizzabile infatti che le larve siano in grado di acquisire i composti chimici (ad es. della cuticola) degli afidi, rendendo il loro odore simile a quello delle prede e che questo sia funzionale ad un loro camuffamento nei confronti delle formiche. Gli idrocarburi cuticolari derivati dagli insetti predati potrebbero essere incorporati nel profilo di idrocarburi della cuticola del predatore (Eisner 1978; Rasekh *et al.* 2010; Lieper e Dettner 1993; Lohman *et al.* 2006), permettendogli di evitare la localizzazione e l’attacco da parte delle formiche. Gli esperimenti comportamentali da noi effettuati sembrerebbero portare a questo tipo di spiegazione: le larve nutrite della specie di afide mutualista *A. gossypii* poste tra afidi non mutualisti *M. persicae* in fase sperimentale, erano infatti maggiormente identificabili dalle formiche e venivano attaccate con maggiore frequenza rispetto ai trattamenti non incrociati. Questo può essere dovuto alla differenza di odori cuticolari che le larve dell’afidofago hanno assunto nutrendosi di *A. gossypii* fino alla fine del loro sviluppo larvale, rispetto agli odori cuticolari di *M. persicae* in mezzo ai quali venivano a trovarsi per il breve periodo dell’esperimento. Non è da escludere che le larve del dittero possano acquisire gli odori cuticolari degli afidi anche tramite un’azione meccanica dovuta allo stretto contatto fisico con essi.

Infine le larve di *A. aphidimyza* potrebbero sfruttare oltre ad un eventuale camuffamento chimico anche strategie comportamentali di diluizione del rischio di attacco all’interno della colonia di afidi, come

suggerito da Lucas e Brodeur (2001). Gli afidi, dunque, non sarebbero sfruttati unicamente come fonte di cibo, ma è probabile che forniscano anche protezione contro i predatori e, quindi, possono essere visti come un componente funzionale della strategia difensiva di *A. aphidimyza* per proteggere lo sviluppo delle larve dalla predazione.

In definitiva dai risultati ottenuti emerge che il paradigma della trofobiosi tra formiche ed afidi non viene rispettato. Le formiche non aumentano l'aggressività ed il tasso di predazione verso i fitofagi competitori degli afidi quando questi sono presenti contemporaneamente sulle stesse piante. Esse non sono neanche in grado di sopprimere i predatori afidofagi che si nutrono a spese della loro risorsa trofica. Tuttavia, è possibile che la presenza delle formiche abbia comunque un effetto deterrente nei confronti di parassitoidi o altri predatori degli afidi che nel complesso riceverebbero un beneficio netto dalla loro presenza (Styrsky e Eubanks 2007).

**SEZIONE 2**  
**Interazioni Piante - Formiche**

## 7 MATERIALI E METODI

Gli esperimenti sono stati realizzati nel laboratorio di Entomologia presso la facoltà di agraria dell'Università di Wageningen, Olanda.

### 7.1 Le specie del sistema multitrofico sperimentale

#### 7.1.1 Le piante

*Cucumis sativus* L.

Descrizione

Per la descrizione si fa riferimento al paragrafo 4.1.1

Motivazione della scelta

Per la motivazione della scelta si fa riferimento al paragrafo 4.1.

Coltivazione

Le piante di cetriolo sono state coltivate in vaso con terreno “pot ground 4” avente le seguenti caratteristiche: Ph 5,7, 30% torba di sfagno svedese, 20% torba baltica, 30% terreno da giardino, 20% corteccia

Le piante sono cresciute in serra in ambiente controllato ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $60 \pm 10\%$  R.H., L16:D8) presso il centro di coltivazione UNIFARM, collegato all'università (figura 7.1).

Per gli esperimenti ho utilizzato piante di 3-4 settimane, aventi un'altezza di circa 40 cm.



Fig. 7.1 Serre di coltivazione delle piante da esperimento in UNIFARM

### *Solanum tuberosum* L.

#### Descrizione

E' una pianta erbacea originaria delle Ande. Gli steli durante i primi stadi dello sviluppo hanno un portamento eretto e sono alti da 60 a 150 cm; raggiunta la maturità assumono un portamento prostrato e spesso ingialliscono. Le foglie sono pennato-composte, formate da 7-9 foglioline di diversa grandezza e alternate. I margini possono essere lisci o seghettati (figura 7.2). Le infiorescenze sono portate in posizione terminale e sono costituite da fiori pentameri. Questi sono di un colore che varia dal giallo all'argento e presentano degli stami gialli. Il frutto è una bacca polposa giallastra. A causa dell'alta quantità dell'alcaloide tossico solanina contenuta al loro interno, i frutti della patata non sono commestibili. L'impollinazione è entomofila e i principali impollinatori sono gli Imenotteri del genere *Bombus*. Gli insetti trasportano il polline da una pianta all'altra, permettendone la fecondazione. In alcuni casi è possibile anche l'autofecondazione. Tutte le varietà di patata possono riprodursi per riproduzione vegetativa, piantando i tuberi o parti di essi. Alcune varietà commerciali presentano fiori imperfetti e non producono semi, quindi vengono propagate solo per mezzo dei tuberi, chiamati impropriamente "*semi*". I fiori fecondati producono i frutti, che in alcune varietà sono piccoli, verdi e di forma simile ai pomodori ciliegini. Ogni frutto può portare fino a 300 semi (tratto da Agraria.org)



Fig. 7.2 Pianta di *S. tuberosum*

#### Motivazione della scelta

E' una pianta di interesse commerciale, di facile reperibilità, crescita veloce e può subire infestazioni da parte degli stessi afidi presenti sui cetrioli.

*S. tuberosum* L. produce  $\beta$ -farnesene tra le sostanze volatili indotte dall'attacco dei fitofagi (Gosset *et al.*2009). Questa sostanza è potenzialmente attrattiva per le formiche, infatti, il  $\beta$ -farnesene è un feromone di allarme degli afidi che viene percepito dalle formiche, generando in esse un aumento della motilità ed aggressività (Nault 1976; Verheggen 2012).

Le piante di patata appartenevano alla varietà Bintje, anch'essa una cultivar senza particolare resistenza agli agenti patogeni.

#### Coltivazione

Le piante sono state coltivate in vaso con terreno "pot ground 4" avente le seguenti caratteristiche: Ph 5,7. 30% torba di sfagno svedese, 20% torba baltica, 30% terreno da giardino, 20% corteccia

Le piante sono cresciute in serra in ambiente controllato ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $60 \pm 10\%$  RH, L16:D8) presso il centro di coltivazione UNIFARM. Per gli esperimenti abbiamo utilizzato piante di 3-4 settimane, aventi un'altezza di circa 40 cm.

## 7.1.2 Gli insetti

*Formica pratensis* R.

Per la descrizione e la motivazione della scelta si fa riferimento al paragrafo 4.1.2

Allevamento

Dei frammenti di nidi di *Formica pratensis* sono stati prelevati dall'ambiente in località Kaaistoep, Tilburg (51 32 20.55N, 40.37E 005 00) (figura 7.3). Circa 300 formiche sono state messe in scatole di plastica (28 x 20 x 14 cm) insieme ad una porzione del materiale del nido e una piccola quantità di pupe (10-30). Le formiche sono state raccolte da 10 diversi nidi a distanza di almeno 50 metri l'uno dall'altro.



Fig 7.3 Luogo di raccolta delle porzioni di nido di *F. pratensis* (bosco di conifere ai bordi delle aree aperte)

I frammenti sono stati tenuti per due settimane in una cella climatizzata ( $23 \pm 2$  ° C, il  $65\% \pm 5\%$  RH, 16L-8D; 10000 lux) (figura 7.4). Ogni due settimane nuovi frammenti delle colonie venivano prelevati a sostituzione dei vecchi. Le formiche sono state alimentate con pezzi di *Tenebrio Molitor* L. e 5 gr. di miele millefiori. Veniva fornita anche acqua *ad libitum*.



Fig. 7.4 Cella climatizzata in cui venivano stabulati gli insetti

## **I fitomizi**

*Aphis gossypii* (Glover) e *Myzus persicae* (Sulzer)

Per la descrizione e la motivazione della scelta si fa riferimento al paragrafo 4.1.2

Allevamento

Adulti e ninfe dell'afide verde del pesco *M. persicae* e dell'afide del cotone *A. gossypii* sono stati allevati rispettivamente su *Raphanus sativus* L. e su *Cucumis sativus* L. in una cella climatizzata ( $23 \pm 2$  ° C, il  $65\% \pm 5\%$  RH, 16L-8D, 10000 lux) (figura)

## **I fitofagi masticatori**

*Mamestra brassicae* L.

Per la descrizione e la motivazione della scelta si fa riferimento al paragrafo 4.1.2

Allevamento

I bruchi di *M. brassicae* sono stati allevati su *Brassica oleracea* L. varietà gemmifera cv Cyrus in una cella climatizzata ( $22 \pm 2$  ° C,  $40-80\% \pm 5\%$  RH, 16L-8D) fino al raggiungimento del secondo-terzo stadio di sviluppo.

*Chrysodeixis chalcites* (Esper)

Descrizione

### Identificazione e danno

Gli adulti hanno apertura alare 35-40 mm. La livrea è bruno rossastre con due macchie color argento sul paio d'ali anteriore (figura 7.5).



Fig. 7.5 Farfalla di *C. chalcites*

La larva di colore verde chiaro, manca delle due prime pseudozampe e si muove inarcandosi. E' altamente polifaga ed attacca e divora rapidamente tutte le parti aeree delle piante ospiti arrivando a distruggerle completamente in poche settimane. Giunte a maturità, si tesse un rado bozzolo bianco entro il quale incrisalida. E' una specie migratrice con costumi notturni. Vola da aprile a novembre con maggiore frequenza tra luglio e settembre. Compie 3-4 generazioni l'anno (tratto da Agraria.org).

Motivazione della scelta

Mentre *M. brassicae* si nutre facilmente su piante di cetriolo ma si sviluppa con difficoltà su piante di patata, *C. chalcites* manifesta una spiccata erbivoria verso le piante di patata. Questo è il motivo per cui abbiamo utilizzato due diverse specie di fitofagi masticatori per gli esperimenti.

Allevamento

Numerosi bruchi di *C. chalcites* a diversi stadi di sviluppo sono stati ottenuti dalla biofabbrica Koppert BV, Berkel een Rodenrijs Olanda e poi allevati in cella climatizzata ( $23 \pm 2$  ° C, il  $65\% \pm 5\%$  RH, 16L-8D, 10000 lux) su piante di patata cv. Bintje, fino al raggiungimento del 5°-6° stadio di sviluppo (figura 7.6).



Fig. 7.6 Bruco di *C. chalcites* di 5<sup>a</sup>-6<sup>a</sup> età.

## 7.2 Il sistema sperimentale

Abbiamo messo a punto due sistemi multitrofici, ciascuno strutturato con un produttore primario, tre consumatori primari di cui un fitofago fitomizo mutualista un fitomizo non mutualista, un fitofago masticator e la formica *Formica pratensis* come consumatore secondario (tab 7.1).

	Sistema multitrofico 1	Sistema multirofico 2
<b>Piante</b>	<i>Cucumis sativus</i>	<i>Solanum tuberosum</i>
<b>Fitomizo mutualista</b>	<i>Aphis gossypii</i>	<i>Aphis gossypii</i>
<b>Fitomizo non mutualista</b>	<i>Myzus persicae</i>	<i>Myzus persicae</i>
<b>Fitofago masticator</b>	Bruchi di <i>Mamestra brassicae</i>	Bruchi di <i>Chrysodeixis chalcites</i>
<b>Predatore</b>	<i>Formica pratensis</i>	<i>Formica pratensis</i>

Tab. 7.1 Organismi utilizzati per gli esperimenti

### 7.2.1 Esperimenti in olfattometro

Esperimenti di doppia scelta sono stati effettuati utilizzando un olfattometro aperto a forma di T. Dell'aria, depurata attraverso un filtro a carboni attivi, è stata pompata attraverso un sistema di tubi di teflon e separata in due flussi da una giunzione a Y. I due flussi d'aria venivano regolati da due flussimetri che fissavano la portata a 2500 ml/min. L'aria entrava quindi all'interno di due vasi in vetro da 35 L.

contenenti le piante, sormontati da un coperchio anch'esso in vetro chiudibile ermeticamente che conteneva un foro d'ingresso ed un foro di uscita dell'aria. L'aria in uscita, contenente le eventuali sostanze volatili emesse dalle piante, arrivava fino all'estremità di ciascun braccio dell'olfattometro dove si trovava la formica da testare (figura 7.7 A). Prima di ogni trattamento il flusso d'aria veniva controllato utilizzando un registratore di flusso digitale (Drycal Defender 510 di Mesa Lab) per verificare che fosse uguale ad entrambe le estremità dell'olfattometro. Tutti i tubi di collegamento erano di Teflon con l'eccezione degli ultimi 20 cm costituiti da due tubi in vetro del diametro di 1 cm. La parte terminale di questi tubi è stata posta a 1,5 cm di distanza dalla fine dei bracci dell'olfattometro, in modo tale che le formiche non potessero toccare le estremità dei tubi. Un telo nero circondava su tre lati tutto il sistema e delle luci al neon erano posizionate esattamente al di sopra della striscia di camminamento delle formiche.

La striscia sulla quale le formiche camminavano e su cui erano esposte alle due diverse miscele di odori provenienti da parti opposte, era fatta di PVC e rivestita con carta da filtro. I bracci della striscia erano lunghi 25 cm ciascuno ed erano aperti verso l'alto con una sezione a forma di V per contenere meglio il flusso d'aria. Le formiche potevano raggiungere la striscia utilizzando un bastoncino di legno posto a 90° rispetto ai bracci e collegato ad uno dei 10 nidi (figura 7.7 B)

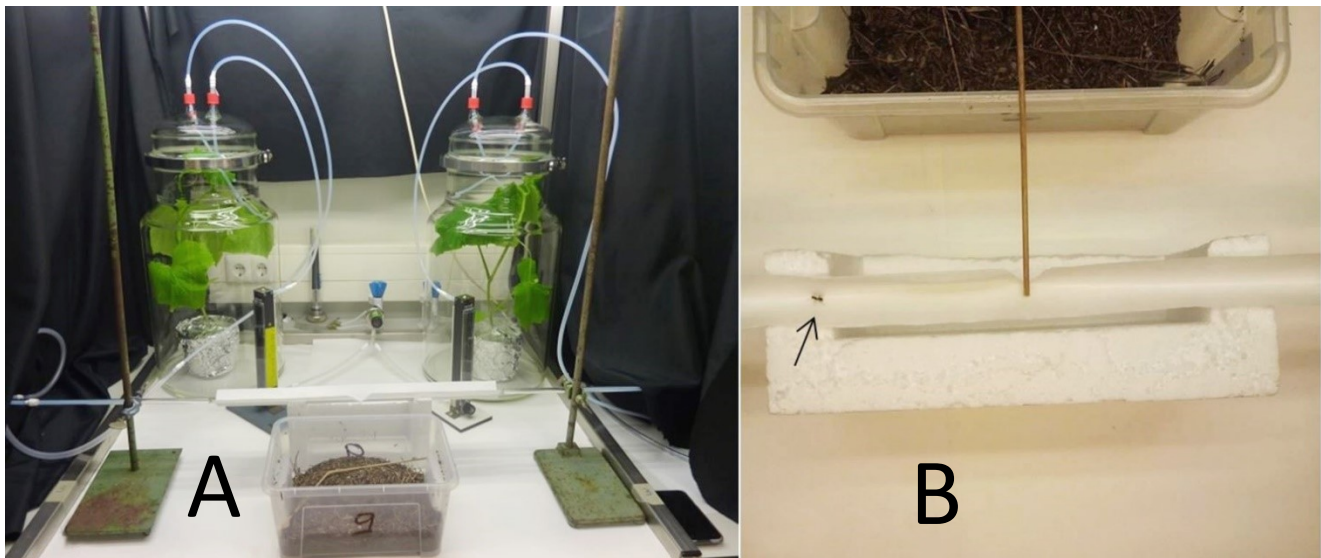


Fig. 7.7 Olfattometro. A. visione d'insieme B. dettaglio dei bracci a T con la connessione al nido attraverso il bastoncino di legno. Una formica attratta da uno dei due flussi d'aria è indicata sulla sinistra (freccia nera)

## 7.2.2 Programmazione degli esperimenti

Gli esperimenti sono stati condotti in una stanza climatizzata a  $22 \pm 1$  ° C,  $70 \pm 10\%$  RH Per gli esperimenti, sono state utilizzate direttamente le scatole contenenti i frammenti dei nidi in modo da non dover manipolare nessun esemplare di formica. Un bastoncino di legno (vedi paragrafo precedente) ha permesso alle formiche di salire al di fuori del nido e di raggiungere la striscia di camminamento dell'olfattometro. Un bastoncino nuovo è stato utilizzato per ogni nido

Ogni esperimento è iniziato quando una singola formica, spontaneamente, ha scalato il bastone ed è entrata nell'olfattometro. Appena la prima formica raggiungeva la striscia di camminamento, il bastoncino veniva rimosso impedendo così l'accesso ad altri esemplari. Per ogni formica veniva registrata la scelta fatta, definita come il tempo impiegato per raggiungere l'estremità di uno dei due bracci, effettuando anche dei movimenti di antennamento in direzione del flusso a dimostrazione di interesse verso la sorgente odorosa (figura 7.8). Le formiche che non raggiungevano le estremità di uno dei due bracci o che, raggiunta l'estremità, non antennavano in direzione del flusso entro 2 minuti dall'ingresso in olfattometro erano considerate come “non scelta” ed escluse dall'analisi dei dati.

Ciascuna formica è stata testata una sola volta. Per evitare che le formiche successive alla prima seguissero un'eventuale feromone di traccia o altri segnali chimici prodotti dai conspecifici, ad ogni formica la carta da filtro che copriva la striscia di camminamento veniva sostituita con una nuova.

Per ogni trattamento sono state utilizzate 5 formiche per ogni nido, per un totale di 50 formiche. (5X10 nidi). La scelta dell'ordine dei nidi da usare era randomizzata.



Fig.7.8 Una formica all'estremità della striscia di camminamento che muove le antenne verso la sorgente del flusso d'aria.

I vasi delle piante usate per gli esperimenti sono stati coperti con fogli di alluminio per ridurre il rilascio di sostanze volatili dal terreno.

Ogni 5 formiche testate le sorgenti del flusso venivano scambiate per minimizzare eventuali preferenze di posizione (bias).

Ogni 10 formiche testate le piante venivano sostituite con due nuove che avevano subito lo stesso trattamento, in modo da compensare eventuali scarse emissioni da parte di una pianta.

Le piante usate per gli esperimenti sono state infestate in tempi diversi a seconda del fitofago. Per gli afidi si è provveduto ad infestarle 72 ore prima degli esperimenti con circa 350 afidi a vari stadi di sviluppo, per pianta. Nel caso dei bruchi l'infestazione è stata fatta 24 ore prima degli esperimenti con 20 bruchi di *M. brassicae* al secondo-terzo stadio di sviluppo per le piante di cetriolo e con 3 bruchi di *C. chalcites* al quinto-sesto stadio di sviluppo per le piante di patata. Questo perché la reazione delle piante all'attacco di un fitofago masticator, il cui danno è molto ingente, è molto più rapida rispetto a quello di un fitomizo. Le piante infestate erano separate dalle altre e tenute in armadi termostatici ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $65\% \pm 10\%$  R.H., L16:D8, 10000 lux) (figura 7.9). Gli esperimenti venivano effettuati nella seconda settimana di permanenza delle formiche nella cella climatizzata. Due giorni prima dell'inizio degli esperimenti veniva interrotta l'alimentazione alle formiche così da aumentarne la motivazione al foraggiamento



Fig.7.9 Piante di cetriolo infestate con *M. brassicae* (i bruchi venivano chiusi in sacchetti di tela insieme alle foglie per costringerli a nutrirsi della stessa foglia)

Sono stati fatti otto trattamenti, quattro con le piante di cetriolo e quattro con quelle di patata (tabella 7.2)

Trattamento	Sistema multitrofico 1	Sistema multitrofico 2
<b>Piante infestate con afidi mutualisti</b> <i>Vs</i> <b>Piante non infestate</b>	<i>A. gossypii</i> <i>Vs</i> <i>C. sativus</i>	<i>A. gossypii</i> <i>Vs</i> <i>S. tuberosum</i>
<b>Piante infestate con afidi non mutualisti</b> <i>Vs</i> <b>Piante non infestate</b>	<i>M. persicae</i> <i>Vs</i> <i>C. sativus</i>	<i>M. persicae</i> <i>Vs</i> <i>S. tuberosum</i>
<b>Piante infestate con fitofagi masticatori</b> <i>Vs</i> <b>Piante non infestate</b>	<i>M. brassicae</i> <i>Vs</i> <i>C. sativus</i>	<i>C. chalcites</i> <i>Vs</i> <i>S. tuberosum</i>
<b>Piante infestate con fitofagi masticatori e afidi mutualisti</b> <i>Vs</i> <b>Piante infestate con afidi mutualisti</b>	<i>M. brassicae and A. gossypii</i> <i>Vs</i> <i>A. gossypii</i>	<i>C. chalcites and A. gossypii</i> <i>Vs</i> <i>A. gossypii</i>

Tab.7.2 Trattamenti sperimentali

### 7.2.3 Raccolta delle sostanze volatili prodotte dalle piante

La raccolta delle sostanze volatili prodotte dalle piante infestate e da quelle integre è stata effettuata attraverso l'utilizzo dell'*air entrainment*, uno strumento che permette di collezionare le sostanze volatili prodotte, intrappolandole in adsorbenti chimici (Tenax) costituiti da un polimero poroso, dove vengono adsorbite e preconcentrate. Si tratta di una tecnica "dinamica" in quanto l'aria fluisce continuamente sul campione veicolando le sostanze volatili sull'adsorbente (Agelopoulos e Pickett, 1998).

Lo strumento era costituito da 4 vasi in vetro della capacità di 35 L ciascuno, sormontati da un coperchio anch'esso in vetro chiudibile ermeticamente, che conteneva un foro d'ingresso ed un foro di uscita dell'aria. All'interno dei vasi venivano poste le piante da analizzare (figura 7.10). Attraverso una pompa veniva generato un flusso d'aria che, dopo essere stato depurato da un filtro a carboni attivi, veniva regolato a 300 ml/min. da un flussimetro per ciascun vaso. L'aria, attraverso dei tubi in teflon, entrava in contatto con le piante nei vasi ed usciva percorrendo un altro tubo, inframmezzato da una cartuccia di metallo caricata con Tenax (figura 7.11). Ciascuna cartuccia aveva un numero di riconoscimento univoco. Il flusso d'aria veniva tenuto aperto per due ore per ogni esperimento. In figura 7.12 è rappresentato lo schema dell'*air entrainment*. (in figura con solo due vasi)



Fig. 7.10 Vasi per l'air entrainment. Le frecce evidenziano la posizione delle cartucce con il materiale adsorbente

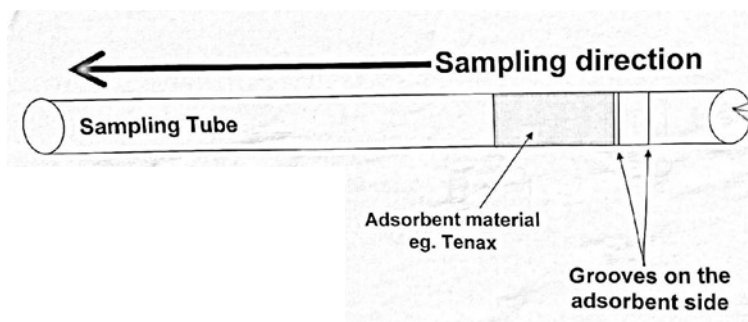


Fig. 7.11 Cartuccia caricata con Tenax. La freccia indica la direzione del flusso d'aria

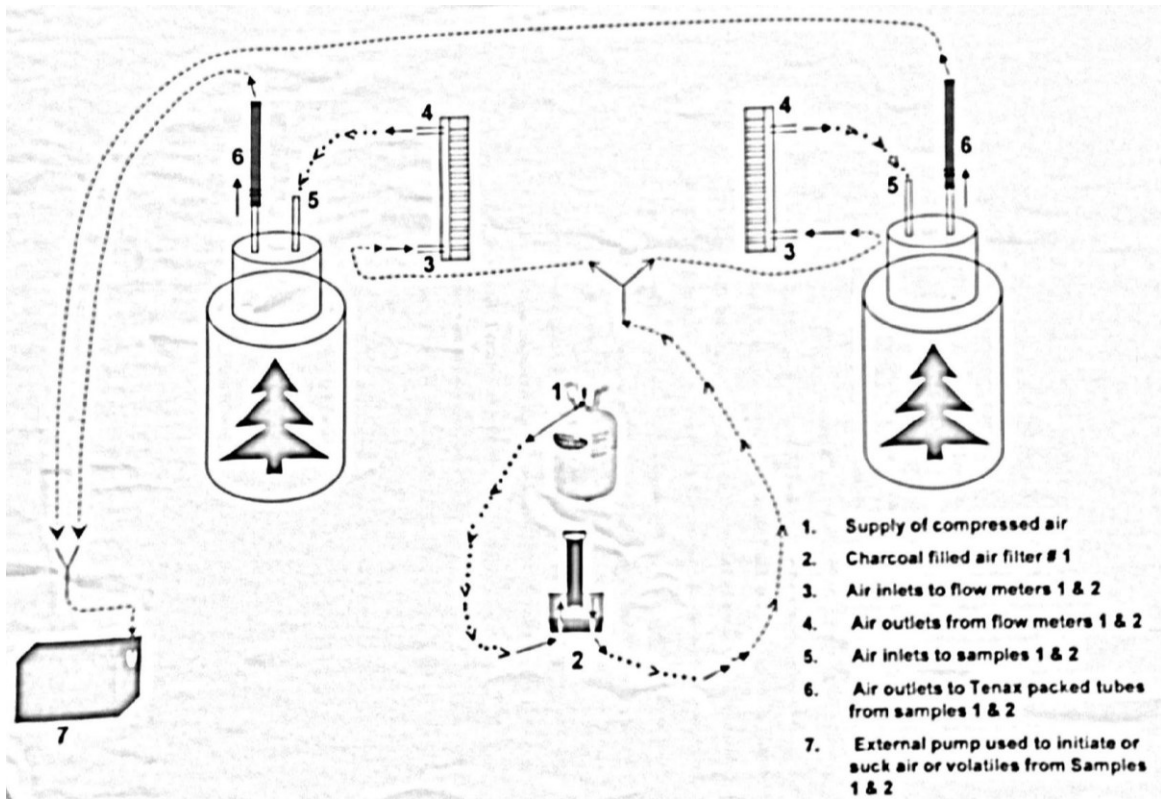


Fig. 7.12 Schema dell'air entrainment: 1-aria compressa 2-filtro a carboni attivi 3-flussimetri 5-vasi con i campioni 6-cartucce adsorbenti 7-pompa esterna.

#### 7.2.4 Programmazione degli esperimenti

Gli esperimenti sono stati condotti in una stanza climatizzata a  $22 \pm 1^\circ \text{C}$ ,  $70 \pm 10\% \text{RH}$

I trattamenti effettuati sono stati sei, tre per ogni specie di pianta

Trattamento	<i>Cucumis sativus</i>	<i>Solanum tuberosum</i>
<b>Piante infestate con afidi mutualisti</b> <i>Vs</i>	<i>A. gossypii</i> <i>Vs</i>	<i>A. gossypii</i> <i>Vs</i>
<b>Piante non infestate</b>	Piante non infestate	Piante non infestate
<b>Piante infestate con fitofagi masticatori</b> <i>Vs</i>	<i>M. brassicae</i> <i>Vs</i>	<i>C. chalcites</i> <i>Vs</i>
<b>Piante non infestate</b>	Piante non infestate	Piante non infestate
<b>Piante infestate con fitofagi masticatori e afidi mutualisti</b> <i>Vs</i>	<i>M. brassicae</i> + <i>A. gossypii</i> <i>Vs</i> <i>A. gossypii</i>	<i>C. chalcites</i> + <i>A. gossypii</i> <i>Vs</i> <i>A. gossypii</i>
<b>Piante infestate con afidi mutualisti</b>		

Tab.7.3 Trattamenti sperimentali

I vasi delle piante usate per gli esperimenti sono stati coperti con fogli di alluminio per ridurre il rilascio di sostanze volatili dal terreno.

Per l'infestazione delle piante cfr. paragrafo 7.2.2

Sono state usate 8 piante per ogni tipologia di infestazione e 8 piante non infestate per *C. sativus*. Per *S. tuberosum* sono state usate 10 piante per ogni tipologia di infestazione e 10 non infestate, per un totale di 72 piante.

Per ogni trattamento si utilizzava una pianta per ogni tipo di infestazione ed una pianta non infestata (3 piante infestate + 1 integra).

La posizione all'interno dei vasi di ciascun tipo di pianta veniva cambiata ad ogni trattamento per minimizzare eventuali bias posizionali.

All'inizio ed alla fine dei trattamenti sono stati inseriti nell'apparato 4 vasi con il terreno usato per la crescita delle piante, coperti da un foglio di alluminio forato al centro per simulare il foro da cui usciva lo stelo delle piante, così da conoscere e quindi escludere in fase di trattamento dei dati, le eventuali sostanze volatili emesse dal terreno.

Al termine delle due ore di trappolaggio delle sostanze ciascuna pianta veniva tagliata alla base e pesata per poter normalizzare la quantità di sostanze volatili prodotte in funzione del peso fresco della pianta.

### **7.2.5 Analisi delle sostanze volatili in gas-cromatografia e spettrometria di massa**

Per la separazione ed il riconoscimento delle sostanze volatili prodotte dalle piante sono stati usati in accoppiamento il gas-cromatografo Thermo Trace GC Ultra (figura 7.11a) e lo spettrometro di massa Thermo Trace DSQ quadrupolo (figura 7.11b) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).



Fig. 7.11a-b Gas cromatografo e spettrometro di massa utilizzati

Precedentemente all'estrazione delle sostanze, ogni cartuccia è stata posta sotto un flusso di azoto ( $50 \text{ ml min}^{-1}$ ) per 10 minuti a temperatura ambiente al fine di eliminare l'umidità interna (figura 7.12). I volatili raccolti sono stati estratti dal Tenax termicamente a  $250^\circ\text{C}$  per 10 min. sotto un flusso di elio regolato a  $20 \text{ ml min}^{-1}$  utilizzando l'unità di desorbimento termico Ultra 50:50 (Markes, Llantrisant, UK). Le sostanze sono state quindi nuovamente raccolte e concentrate in un solvente universale alla temperatura di  $0^\circ\text{C}$  utilizzando una macchina a trappolaggio termico (Markes). Successivamente i volatili sono stati trasferiti in colonna analitica ZB-5MSi ( $30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm I.D.} \times 0.25 \mu\text{m}$ ) (Phenomenex, Torrance, CA, USA) con il metodo del riscaldamento balistico passando a  $280^\circ\text{C}$  alla velocità di  $40^\circ\text{C s}^{-1}$ , mantenendoli in temperatura per 10 min. per la separazione delle sostanze. Il forno gas cromatografico è stato tenuto inizialmente a  $40^\circ\text{C}$  per 2 min. a cui è seguito, alla velocità di  $6^\circ\text{C min}^{-1}$ , il raggiungimento della temperatura finale di  $280^\circ\text{C}$ , mantenuta per 4 min. sotto un flusso costante di elio di  $1 \text{ ml min}^{-1}$ .



Fig.7.12 Cartucce contenenti il Tenax (freccia) sottoposte al flusso di azoto per togliere l'umidità

Lo spettrometro di massa a quadrupolo è stato fatto operare in scan-mode con un range di massa di 35-400 Dalton a 4.70 scansioni  $s^{-1}$  e gli spettri sono stati registrati con il metodo della ionizzazione elettronica (EI) a 70 eV.

L'identificazione dei composti è stata effettuata sia per comparazione degli spettri di massa con quelli nella libreria del NIST (National Institute of Standards and Technology), sia utilizzando il database degli spettri di massa dei composti naturali dell'Università di Wageningen nonché per via sperimentale attraverso L'Indice di Ritenzione Lineare (LRI)

### **7.3 Analisi dei dati**

Per verificare l'eventuale presenza di differenze comportamentali significative tra le formiche appartenenti ai 10 differenti nidi è stato utilizzato il G test of independence.

Per valutare la significatività della risposta delle formiche alle sostanze volatili emesse dalle piante è stato utilizzato il test del chi quadrato. La variabile considerata era la proporzione di formiche che rispondevano ad uno dei due flussi d'aria. Le formiche che non hanno effettuato nessuna scelta sono state escluse dal trattamento dei dati (cfr. par. 7.2.2)

Il confronto tra la composizione delle sostanze volatili emesse dalle piante utilizzate in funzione delle specie di fitofagi presenti è stato fatto effettuando un'analisi multivariata utilizzando l'analisi PLS-DA (Projection to Latent Structures Discriminant Analysis)

## 8 RISULTATI

### 8.1 Esperimenti in olfattometro

Il G test è risultato non significativo e quindi non ci sono differenze comportamentali tra i gruppi di formiche appartenenti a nidi diversi (tabella 8.1). Per tale ragione nell'analisi dei dati sono state utilizzate tutte le formiche testate per ogni trattamento come un unico gruppo, indipendentemente dal nido di provenienza.

Trattamenti	Sistema multitrofico 1	Sistema multitrofico 2
<b>Piante infestate con afidi mutualisti</b> <i>Vs</i> <b>Piante non infestate</b>	$G^2= 4,564, df= 9, p= 0,907$	$G^2= 15,702, df= 9, p= 0,197$
<b>Piante infestate con afidi non mutualisti</b> <i>Vs</i> <b>Piante non infestate</b>	$G^2= 4,284, df= 9, p= 0,969$	$G^2= 17,476, df= 9, p= 0,103$
<b>Piante infestate con fitofagi masticatori</b> <i>Vs</i> <b>Piante non infestate</b>	$G^2=9,020, df= 9, p= 0,691$	$G^2=4,142, df= 9, p= 0,965$
<b>Piante infestate con fitofagi masticatori e afidi mutualisti</b> <i>Vs</i> <b>Piante infestate con afidi mutualisti</b>	$G^2=5,433, df= 9, p= 0,900$	$G^2= 7,112, df= 9, p= 0,786$

Tab. 8.1 Risultati del G test

I risultati degli esperimenti in olfattometro mostrano una chiara risposta positiva delle formiche verso gli odori di alcune delle piante infestate. Vi sono delle differenze nella risposta in funzione della specie di fitofago presente e della specie di pianta utilizzata (tabella 8.2).

#### Risposta delle formiche nel sistema multitrofico 1

Nei trattamenti in cui erano presenti le piante di cetriolo, gli esperimenti in olfattometro hanno mostrato che le formiche rispondono in modo significativo agli odori emessi dalle piante in cui vi era la presenza del fitofago masticatore *M. brassicae*, solo o in associazione con *A. gossypii*. La presenza dei soli afidi, sia mutualisti (*A. gossypii*) sia non mutualisti (*M. persicae*), non ha invece indotto una risposta significativa nelle formiche rispetto agli odori delle piante non infestate.

## Risposta delle formiche nel sistema multitrofico 2

Nei trattamenti in cui erano presenti le piante di patata la scelta delle formiche è stata significativa verso gli odori emessi dalle piante infestate con ciascuna delle singole specie di erbivori rispetto alle piante non infestate.

Trattamenti	Sistema multitrofico 1					Sistema multitrofico 2				
	Test	Control	N	$\chi^2$		Test	Control	N	$\chi^2$	
				D	p				D	p
<b>Piante infestate con afidi mutualisti (test)</b> <i>Vs</i> <b>Piante non infestate (control)</b>	31	19	50	2,88	0,09	35	15	50	8	0,005
<b>Piante infestate con afidi non mutualisti (test)</b> <i>Vs</i> <b>Piante non infestate (control)</b>	31	19	50	2,88	0,09	34	16	50	6,48	0,01
<b>Piante infestate con fitofagi masticatori (test)</b> <i>Vs</i> <b>Piante non infestate (control)</b>	34	16	50	6,48	0,01	35	15	50	8	0,005
<b>Piante infestate con fitofagi masticatori e afidi mutualisti (test)</b> <i>Vs</i> <b>Piante infestate con afidi mutualisti (control)</b>	33	17	50	5,12	0,02	24	26	50	ns	ns

Tab. 8.2 Numero di formiche che hanno scelto una delle due fonti di sostanze volatili e risultati del test  $\chi^2$

I grafici delle pagine seguenti evidenziano le scelte operate dalle formiche espresse in percentuale.

## Piante infestate con afidi mutualisti Vs piante non infestate

### Sistema multitrofico 1

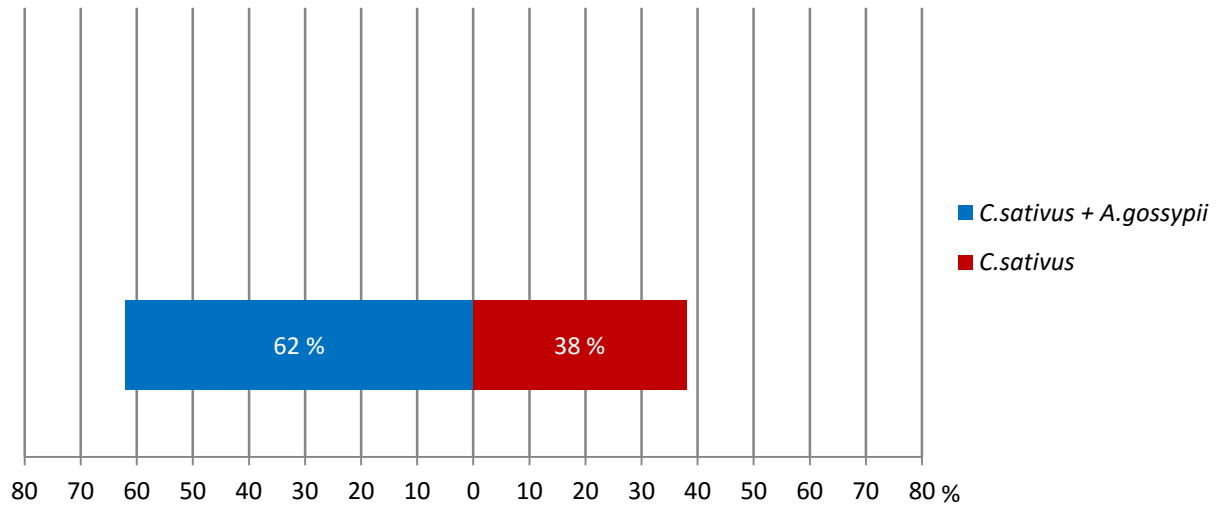


Grafico 8.1 Risposta delle formiche in percentuale agli odori emessi dalle piante di cetriolo infestate con *A. gossypii* rispetto alle piante non infestate (ns).

### Sistema multitrofico 2

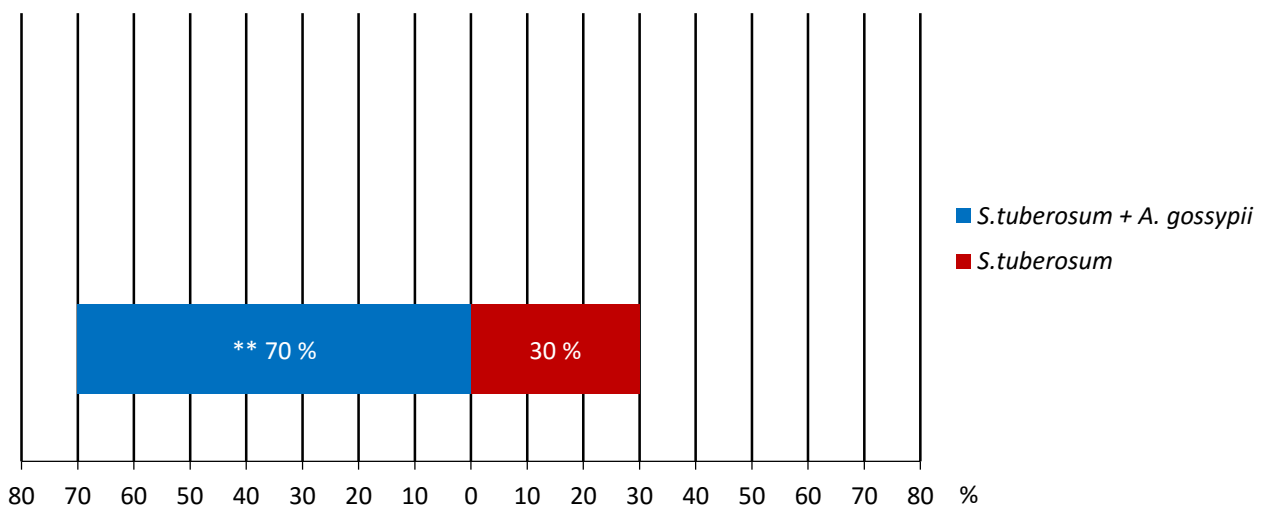


Grafico 8.2 Risposta delle formiche in percentuale agli odori emessi dalle piante di patata infestate con *A. gossypii* rispetto alle piante non infestate ( $p=0,005$ ).

## Piante infestate con afidi non mutualisti Vs piante non infestate

### Sistema multitrofico 1

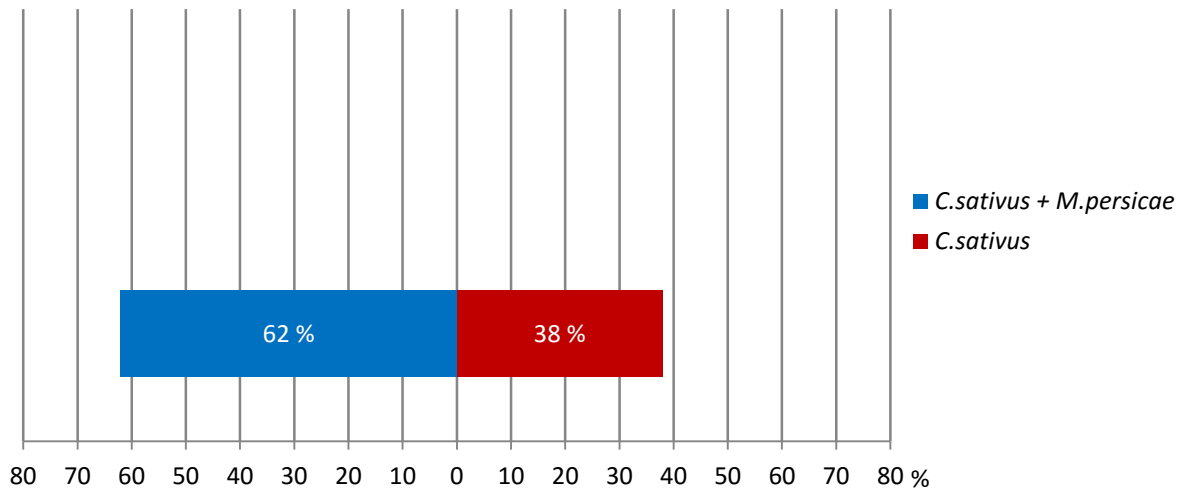


Grafico 8.3 Risposta delle formiche in percentuale agli odori emessi dalle piante di cetriolo infestate con *M. persicae* rispetto alle piante non infestate (ns).

### Sistema multitrofico 2

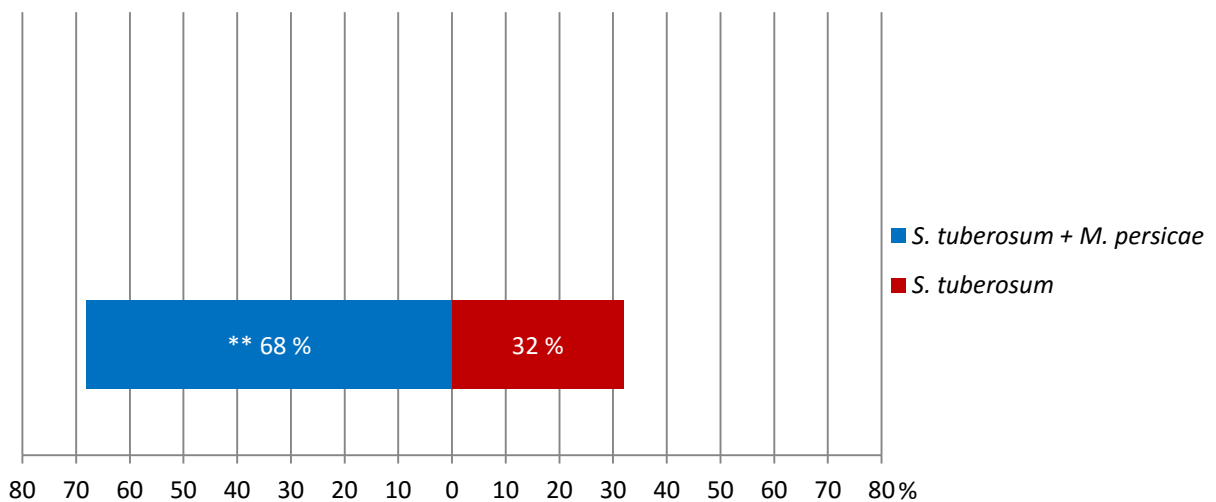


Grafico 8.4 Risposta delle formiche in percentuale agli odori emessi dalle piante di patata infestate con *M. persicae* rispetto alle piante non infestate (p= 0,01).

## Piante infestate con fitofagi masticatori Vs piante non infestate

### Sistema multitrofico 1

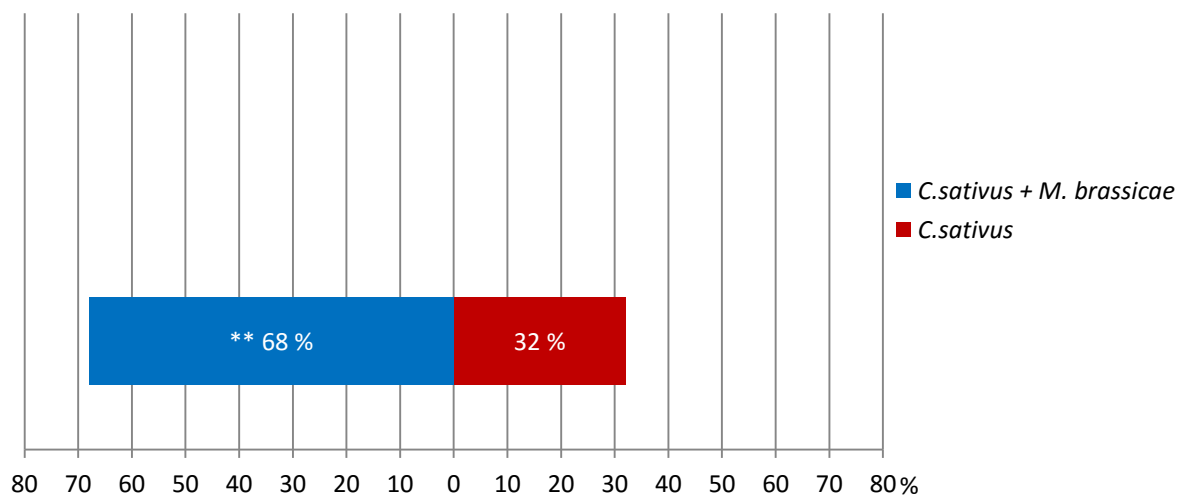


Grafico 8.5 Risposta delle formiche in percentuale agli odori emessi dalle piante di cetriolo infestate con *M. brassicae* rispetto alle piante non infestate ( $p=0,01$ )

### Sistema multitrofico 2

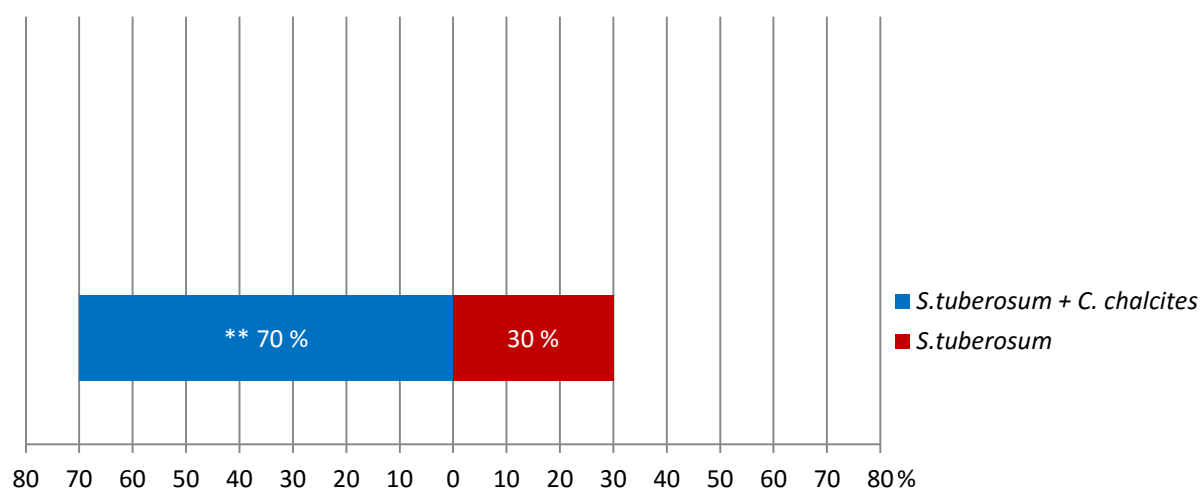


Grafico 8.6 Risposta delle formiche in percentuale agli odori emessi dalle piante di patata infestate con *C. chalcites* rispetto alle piante non infestate ( $p=0,005$ )

## Piante infestate con fitofagi masticatori e afidi mutualisti Vs piante infestate con afidi mutualisti

### Sistema multitrofico 1

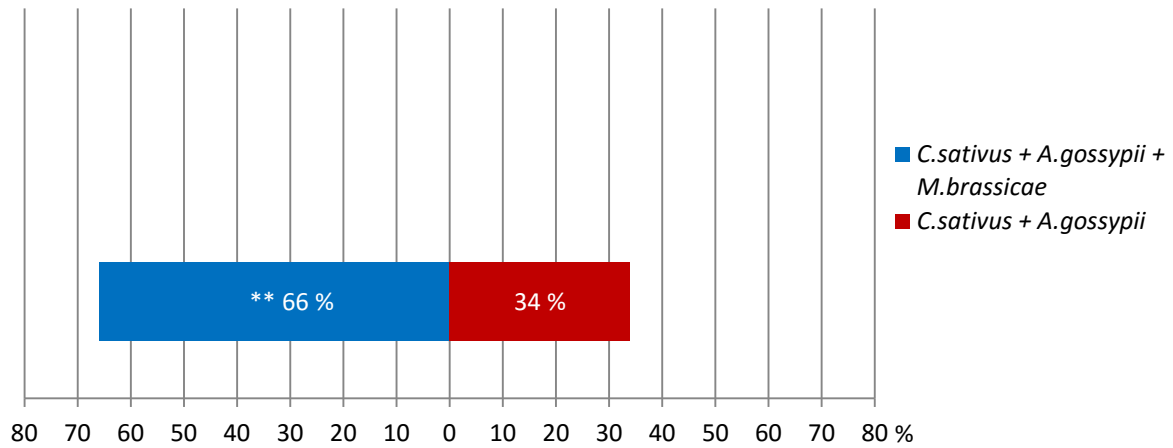


Grafico 8.7 Risposta delle formiche in percentuale agli odori emessi dalle piante di cetriolo infestate con *A. gossypii* e *M. brassicae* rispetto alle piante infestate con *A. gossypii* ( $p=0,02$ )

### Sistema multitrofico 2

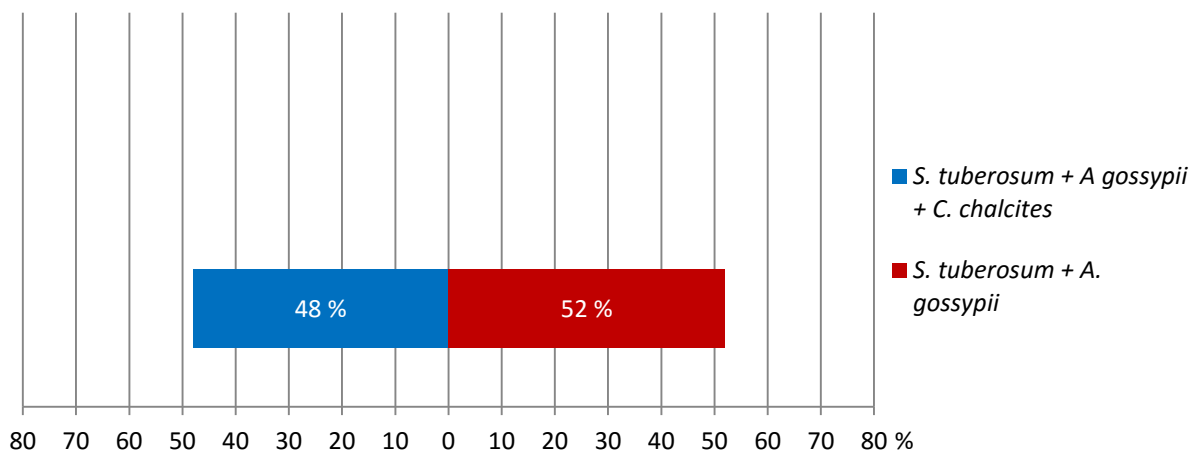


Grafico 8.8 Risposta delle formiche in percentuale agli odori emessi dalle piante di patata infestate con *A. gossypii* e *C. chalcites* rispetto alle piante infestate con *A. gossypii* (ns)

## 8.2 Emissione di sostanze volatili dalle piante

La raccolta di sostanze volatili prodotte dalle piante con il metodo dell'*air entrainment* e la successiva analisi in gas-cromatografia e spettrometria di massa, ha permesso di identificare 91 composti nelle piante di *C. sativus* ed 85 in quelle di *S. tuberosum*.

### 8.2.1 Emissioni delle piante di *C. sativus*

Dei 91 composti trovati, 27 non sono presenti nello spettro di emissione delle piante non infestate e sono quindi prodotti in seguito all'attacco dei fitofagi. Cinque di questi composti non sono stati identificati. In tabella 8.3 è rappresentato l'elenco di queste sostanze ed il fitofago che ne ha indotto la produzione. Nell'analizzare le differenze nell'emissione dei composti volatili da parte delle piante, oltre ad evidenziare i composti che sono prodotti *de novo*, abbiamo esaminato la differenza nel quantitativo emesso di ogni sostanza, rapportato al peso fresco di ciascuna pianta (cfr. par. 7.2.4), confrontandolo con le differenti tipologie di infestazione e con le piante non infestate. Per il confronto è stato utilizzando l'indice VIP (Variable Importance in the Projection) che assegna un peso numerico a ciascun composto in funzione della differenza tra i trattamenti nella quantità raccolta dalle piante mediante l'*air entrainment*. I composti con valore maggiore di 1 sono quelli che mostrano una differenza significativa tra i trattamenti in oggetto. Nella tabella 8.4 sono riportate le sostanze con valore maggiore di 1 nel confronto tra le sostanze emesse dalle piante di cetriolo infestate dagli afidi *A. gossypii* e le piante non infestate. Le differenze nelle quantità emesse comprendono i composti prodotti *de novo* durante l'infestazione come il (E)- $\beta$ -Farnesene o il Cuparene e altre sostanze che sono emesse anche dalle piante non infestate, la cui quantità cresce in maniera sostanziale in seguito all'infestazione (es. 2-Methylbutanenitrile). L'elenco completo delle sostanze emesse nei differenti trattamenti con le piante di cetriolo è presentato in appendice A. I confronti tra le emissioni delle piante sono rappresentate nelle seguenti tabelle:

Tab. 8.5 piante infestate con *M. brassicae* rispetto piante non infestate.

Tab. 8.6 piante infestate con *M. brassicae* + *A. gossypii*, rispetto a quelle infestate dai soli *A. gossypii*

Tab. 8.7 piante infestate con *M. brassicae* rispetto a quelle infestate da *A. gossypii*

Composto	Fitofago
3-Methylbutanal_ 3.02	<i>M. brassicae</i>
(E)-3-Methylbutanal oxime_ 7.37	<i>M. brassicae</i>
(Z)-2-Penten-1-ol, acetate_ 7.88	<i>M. brassicae</i>
(Z)-1,5-Octadien-3-ol_ 9.41	<i>M. brassicae</i>
(E,E)-2,4-Heptadienal_ 9.99	<i>M. brassicae</i>
Linalool oxide B_ 12.31	<i>M. brassicae</i>
2-Isopropyl-3-methoxypyrazine_ 12.47	<i>M. brassicae</i>
(E)-Carveol_ 15.28	<i>M. brassicae</i>
beta-Cyclocitral_ 15.59	<i>M. brassicae</i>
(Z)-3-Hexenyl tiglate_ 17.93	<i>M. brassicae</i> ; <i>A. gossypii</i>
Bicycloelemene_ 18.30	<i>M. brassicae</i>
Megastigma-4,6(E),8(E)-trien_ 18.38	<i>M. brassicae</i>
Methyl anthranilate_ 18.40	<i>M. brassicae</i>
Unknown_ 19.47	<i>M. brassicae</i>
Unknown_ 20.06	<i>M. brassicae</i>
2-Naphthol, 1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydro-4a-methyl-_ 20.28	<i>M. brassicae</i>
(E)-beta-Farnesene_ 20.81	<i>M. brassicae</i> ; <i>A. gossypii</i>
alpha-Caryophyllene_ 20.86	<i>M. brassicae</i> ; <i>A. gossypii</i>
Cuparene_ 21.45	<i>M. brassicae</i> ; <i>A. gossypii</i>
Unknown sesquiterpene_ 22.58	<i>M. brassicae</i>
(E)-Nerolidol_ 22.98	<i>M. brassicae</i>
(Z)-Calamenene_ 23.06	<i>M. brassicae</i>
(Z)-3-Hexen-1-ol, benzoate_ 23.14	<i>M. brassicae</i>
(E)-Calamenene_ 23.45	<i>M. brassicae</i>
(E)-Bergamota-2,12-dien-14-al_ 24.08	<i>M. brassicae</i>
Unknown sesquiterpene_ 24.69	<i>M. brassicae</i>
Unknown sesquiterpene_ 25.54	<i>M. brassicae</i>

Tab. 8.3 Elenco delle sostanze prodotte solo dalle piante infestate, con il fitofago che ne ha indotto la produzione, in ordine di Tempo di Ritenzione (vedi sotto).

Legenda per le tabelle:

H= pianta non infestata (Healthy)

G= pianta infestata con *A. gossypii*

B= pianta infestata con *M. brassicae*

G+B= pianta infestata con *A. gossypii* e *M. brassicae*

RT= Tempo di Ritenzione, cioè il tempo che intercorre in minuti tra l'immissione di un composto nella colonna gas-cromatografica e la sua rilevazione

VIP values (H vs G treatments)		
Compound #	Compound_RT (min)	VIP
66	(E)-beta-Farnesene 20.81	2,88149
6	2-Methylbutanenitrile 3.86	1,93455
56	Cyclosativene 18.98	1,9084
9	2-Methylpropanal oxime 4.43	1,74545
4	2-Ethylfuran 3.48	1,69851
3	3-Pentanone 3.44	1,56865
70	Cuparene 21.45	1,45447
50	(Z)-3-Hexenyl tiglate 17.93	1,42035
46	Methyl salicylate 14.98	1,30618
62	beta-Caryophyllene 20.14	1,27499
13	(Z)-3-Methylbutanal oxime 6.95	1,24589
30	(Z)-beta-Ocimene 11.04	1,24026
85	Allofarnesene II 24.10	1,18938
7	3-Methylbutanenitrile 3.91	1,16985
73	(Z)-Nerolidol 21.98	1,15275
63	alpha-Ionone 20.24	1,14065
72	(Z,E)-alpha-Farnesene 21.60	1,10942
31	(E)-beta-Ocimene 11.32	1,08529
67	alpha-Caryophyllene 20.86	1,07502
83	Allofarnesene I 23.64	1,0651

Tab 8.4 Composti la cui quantità emessa differisce in modo significativo tra piante infestate con *A. gossypii* rispetto alle piante non infestate.

VIP values (H vs B treatments)		
Compound #	Compound_RT (min)	VIP
15	(E)-3-Methylbutanal oxime 7.37	1,20947
37	2-Isopropyl-3-methoxypyrazine 12.47	1,20938
53	Methyl anthranilate 18.40	1,20934
36	Linalool oxide B 12.31	1,20932
79	(Z)-Calamenene 23.06	1,20917
77	Unknown sesquiterpene 22.58	1,20805
47	(E)-Carveol 15.28	1,20796
64	2-Naphthol, 1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydro-4a-methyl- 20.28	1,20682
61	Unknown 20.06	1,20664
66	(E)-beta-Farnesene 20.81	1,20627
90	Unknown sesquiterpene 25.54	1,20617
59	Unknown 19.47	1,20612
88	Unknown sesquiterpene 24.69	1,20611
78	(E)-Nerolidol 22.98	1,20578
48	beta-Cyclocitral 15.59	1,205
52	Megastigma-4,6(E),8(E)-trien 18.38	1,20318
50	(Z)-3-Hexenyl tiglate 17.93	1,20103
30	(Z)-beta-Ocimene 11.04	1,18523
43	(E,E)-Cosmene 13.34	1,18203
31	(E)-beta-Ocimene 11.32	1,181
14	Isoamyl acetate 6.96	1,17683
44	allo-neo-Ocimene 13.62	1,17587
41	1,3-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)- 13.18	1,17259
24	1,4-Cyclohexadiene, 3-ethenyl-1,2-dimethyl- 10.16	1,16063
8	3-Methyl-1-butanol 3.94	1,15971
9	2-Methylpropanal oxime 4.43	1,15208
85	Allofarnesene II 24.10	1,14882
21	beta-Myrcene 9.82	1,13564
82	(E)-Calamenene 23.45	1,13212
39	2,5-Dimethylcyclohexanol 12.84	1,12826
25	(Z)-3-Hexen-1-ol, acetate 10.24	1,12555
40	(E)-DMNT 13.02	1,11274
76	alpha-Cadinene 22.54	1,10721
63	alpha-Ionone 20.24	1,09969
1	3-Methylbutanal 3.02	1,09933
35	1,3-Cyclohexadiene, 2-methyl-5-(1-methylethenyl)- 12.12	1,0985
5	Propyl acetate 3.70	1,09407
80	(Z)-3-Hexen-1-ol, benzoate 23.14	1,09236
58	alpha-Copaene 19.17	1,09162
71	beta-Ionone 21.47	1,09118
4	2-Ethylfuran 3.48	1,08934
23	(E,E)-2,4-Heptadienal 9.99	1,07816
6	2-Methylbutanenitrile 3.86	1,07617
46	Methyl salicylate 14.98	1,07167
73	(Z)-Nerolidol 21.98	1,07086
19	(Z)-1,5-Octadien-3-ol 9.41	1,06749
81	(E,E)-TMTT 23.27	1,06643
70	Cuparene 21.45	1,06353
84	(E)-Bergamota-2,12-dien-14-al 24.08	1,06278
45	4-Oxoisophorone 13.71	1,0509
16	(Z)-2-Penten-1-ol, acetate 7.88	1,02639
13	(Z)-3-Methylbutanal oxime 6.95	1,02529

Tab. 8.5 Composti la cui quantità emessa differisce in modo significativo tra piante infestate con *M. brassicae* e piante non infestate.

VIP values (G vs G+B treatments)		
Compound #	Compound_RT (min)	VIP
78	(E)-Nerolidol_22.98	1,23837
37	2-Isopropyl-3-methoxy pyrazine_12.47	1,23754
80	(Z)-3-Hexen-1-ol, benzoate_23.14	1,23745
77	Unknown sesquiterpene_22.58	1,23698
79	(Z)-Calamenene_23.06	1,23591
15	(E)-3-Methylbutanal oxime_7.37	1,23583
36	Linalool oxide B_12.31	1,2356
53	Methyl anthranilate_18.40	1,2328
90	Unknown sesquiterpene_25.54	1,23192
48	beta-Cyclocitral_15.59	1,23189
88	Unknown sesquiterpene_24.69	1,2318
47	(E)-Carveol_15.28	1,22966
64	2-Naphthol, 1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydro-4a-methyl-_20.28	1,22815
59	Unknown_19.47	1,22671
13	(Z)-3-Methylbutanal oxime_6.95	1,20295
7	3-Methylbutanenitrile_3.91	1,19128
83	Allofarnesene I_23.64	1,18563
85	Allofarnesene II_24.10	1,18275
72	(Z,E)-alpha-Farnesene_21.60	1,18025
56	Cyclosativene_18.98	1,17891
40	(E)-DMNT_13.02	1,17728
65	2-Methylbutyl benzoate_20.42	1,16409
41	1,3-Cyclohexadiene,1-methyl-4-(1-methylethenyl)-_13.18	1,16134
43	(E,E)-Cosmene_13.34	1,14787
8	3-Methyl-1-butanol_3.94	1,14464
42	Alloocimene_13.32	1,14397
25	(Z)-3-Hexen-1-ol, acetate_10.24	1,1424
11	(E)-2-Hexenal_6.35	1,13657
30	(Z)-beta-Ocimene_11.04	1,13579
14	Isoamyl acetate_6.96	1,13525
19	(Z)-1,5-Octadien-3-ol_9.41	1,1333
31	(E)-beta-Ocimene_11.32	1,1317
58	alpha-Copaene_19.17	1,12641
24	1,4-Cyclohexadiene, 3-ethenyl-1,2-dimethyl-_10.16	1,12029
12	(Z)-3-Hexen-1-ol_6.47	1,11927
81	(E,E)-TMTT_23.27	1,11741
44	allo-neo-Ocimene_13.62	1,11659
16	(Z)-2-Penten-1-ol, acetate_7.88	1,11231
39	2,5-Dimethylcyclohexanol_12.84	1,11122
9	2-Methylpropanal oxime_4.43	1,10589
52	Megastigma-4,6(E),8(E)-trien_18.38	1,07999
71	beta-Ionone_21.47	1,07878
61	Unknown_20.06	1,04856
82	(E)-Calamenene_23.45	1,04753
46	Methyl salicylate_14.98	1,04302
60	(Z)-Jasmone_19.63	1,04226
76	alpha-Cadinene_22.54	1,03898
29	Benzylalcohol_11.03	1,02173
33	Artemisia alcohol_11.46	1,01706
6	2-Methylbutanenitrile_3.86	1,01664
23	(E,E)-2,4-Heptadienal_9.99	1,01629

Tab. 8.6 Composti la cui quantità emessa differisce in modo significativo tra piante infestate con *M. brassicae* + *A. gossypii* e piante infestate con *A. gossypii*.

VIP values (G vs B treatments)		
Compound #	Compound_RT (min)	VIP
15	(E)-3-Methylbutanal oxime 7.37	1,21734
37	2-Isopropyl-3-methoxypyrazine 12.47	1,21715
79	(Z)-Calamenene 23.06	1,21714
53	Methyl anthranilate 18.40	1,21705
36	Linalool oxide B 12.31	1,21693
77	Unknown sesquiterpene 22.58	1,21677
47	(E)-Carveol 15.28	1,21578
64	2-Naphthol, 1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydro-4a-methyl- 20.28	1,21418
59	Unknown 19.47	1,21379
90	Unknown sesquiterpene 25.54	1,21334
88	Unknown sesquiterpene 24.69	1,21314
78	(E)-Nerolidol 22.98	1,21281
48	beta-Cyclocitral 15.59	1,21106
80	(Z)-3-Hexen-1-ol, benzoate 23.14	1,2103
52	Megastigma-4,6(E),8(E)-trien 18.38	1,21005
13	(Z)-3-Methylbutanal oxime 6.95	1,18807
7	3-Methylbutanenitrile 3.91	1,18154
83	Allofarnesene I 23.64	1,17761
72	(Z,E)-alpha-Farnesene 21.60	1,17188
41	1,3-Cyclohexadiene,1-methyl-4-(1-methylethenyl)- 13.18	1,1716
85	Allofarnesene II 24.10	1,16893
14	Isoamyl acetate 6.96	1,1651
56	Cyclosativene 18.98	1,16087
40	(E)-DMNT 13.02	1,15924
30	(Z)-beta-Ocimene 11.04	1,15102
42	Alloocimene 13.32	1,14768
8	3-Methyl-1-butanol 3.94	1,1465
43	(E,E)-Cosmene 13.34	1,14409
25	(Z)-3-Hexen-1-ol, acetate 10.24	1,14151
31	(E)-beta-Ocimene 11.32	1,13935
9	2-Methylpropanal oxime 4.43	1,13765
24	1,4-Cyclohexadiene, 3-ethenyl-1,2-dimethyl- 10.16	1,12708
39	2,5-Dimethylcyclohexanol 12.84	1,1263
44	allo-neo-Ocimene 13.62	1,1216
65	2-Methylbutyl benzoate 20.42	1,11745
58	alpha-Copaene 19.17	1,11441
16	(Z)-2-Penten-1-ol, acetate 7.88	1,1097
12	(Z)-3-Hexen-1-ol 6.47	1,09903
23	(E,E)-2,4-Heptadienal 9.99	1,09494
81	(E,E)-TMTT 23.27	1,09157
19	(Z)-1,5-Octadien-3-ol 9.41	1,07823
11	(E)-2-Hexenal 6.35	1,06959
76	alpha-Cadinene 22.54	1,06667
5	Propyl acetate 3.70	1,06445
61	Unknown 20.06	1,04053
82	(E)-Calamenene 23.45	1,03508
71	beta-Ionone 21.47	1,03135
63	alpha-Ionone 20.24	1,03057
35	1,3-Cyclohexadiene, 2-methyl-5-(1-methylethenyl)- 12.12	1,02606
60	(Z)-Jasmone 19.63	1,00889

Tab. 8.7 Composti la cui quantità emessa differisce in modo significativo tra piante infestate con *A. gossypii* e piante infestate con *M. brassicae*.

L'analisi PLS-DA mostra che le piante soggette all'attacco dei differenti fitofagi possono essere raggruppate in cluster distinti per qualità e quantità di emissioni volatili (figure nelle pagine successive, sezione a). Ciascuna delle piante che ha subito il medesimo trattamento produce un profilo di emissione delle sostanze volatili simile mentre ciascun trattamento, ad esclusione di B e G+B, produce un profilo di emissione diverso dagli altri. Il contributo di ciascun composto volatile nella formazione del *blend* caratteristico per ciascun trattamento è rappresentato nella sezione b delle figure. Le sostanze più prossime alla zona dove è indicato il trattamento (H, G, B, G+B) sono prodotte esclusivamente o per la maggior parte da quel trattamento. Le emissioni di sostanze volatili sono differenti in quantità e qualità in funzione delle specie di erbivori che infestano la pianta. Con le piante di cetriolo l'associazione tra *A. gossypii* e *M. brassicae* che sfruttano contemporaneamente la stessa pianta, induce la produzione di un profilo di sostanze del tutto simile a quello prodotto dall'infestazione del solo *M brassicae* e non è possibile dividere i trattamenti in due gruppi distinti (fig. 8.1 e 8.5).

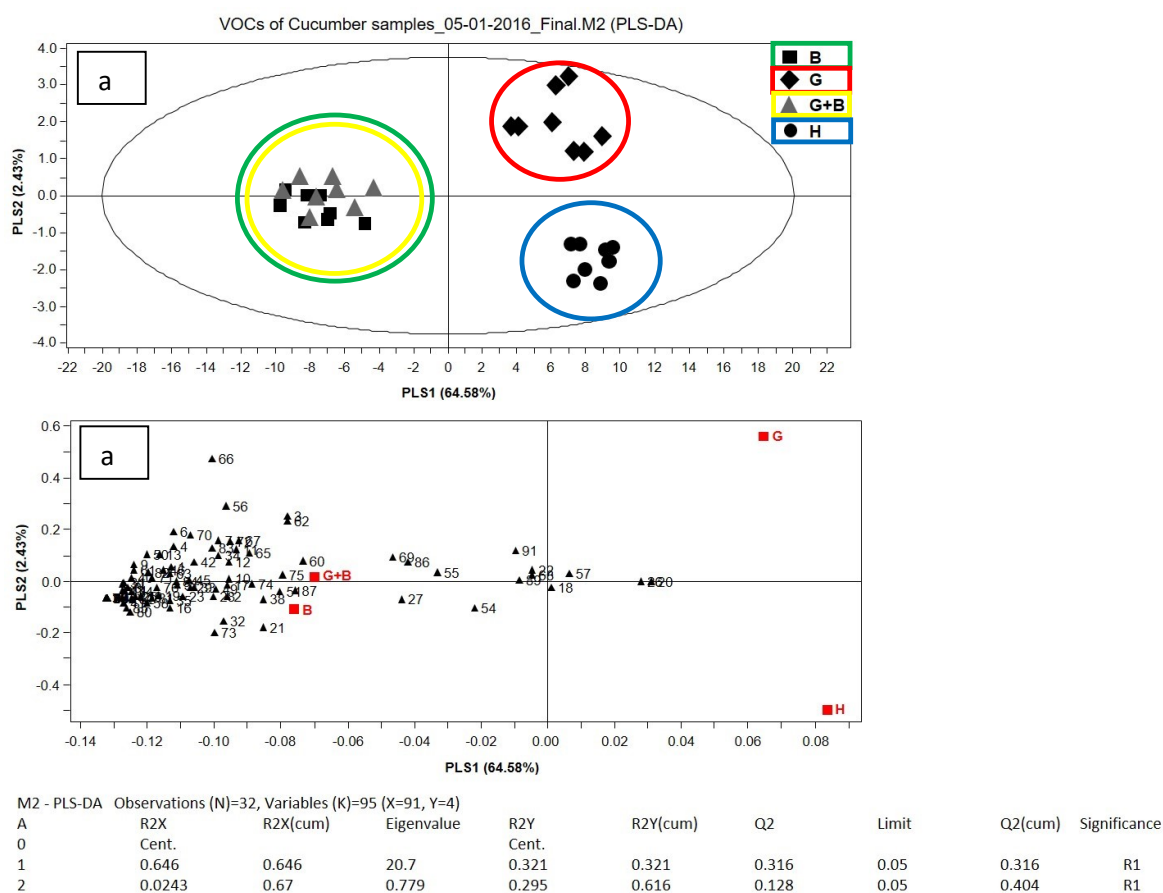
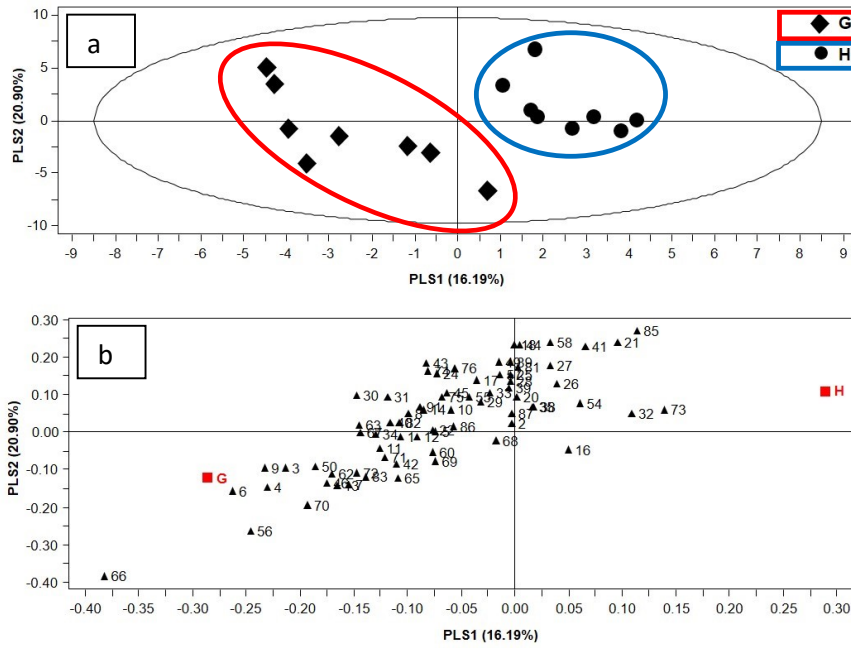


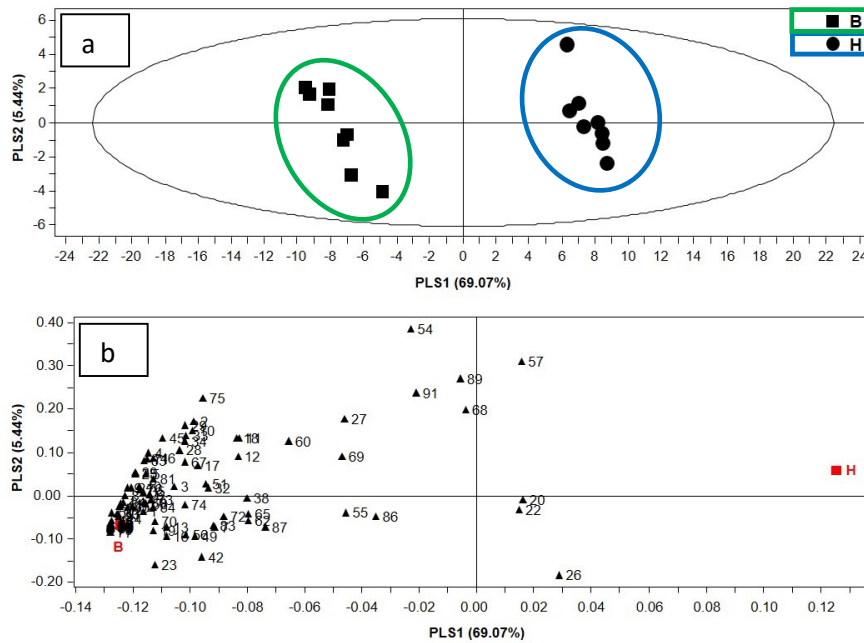
Fig.8.1 PLS-DA comprendente tutti i trattamenti



M3 - PLS-DA Observations (N)=16, Variables (K)=73 (X=71, Y=2)

A	R2X	R2X(cum)	Eigenvalue	R2Y	R2Y(cum)	Q2	Limit	Q2(cum)	Significance
0	Cent.			Cent.					
1	0.162	0.162	2.59	0.746	0.746	0.209	0.05	0.209	R1
2	0.209	0.371	3.34	0.156	0.902	0.237	0.05	0.397	R1
3	0.107	0.478	1.72	0.0713	0.973	0.299	0.05	0.577	R1
4	0.0835	0.562	1.34	0.0184	0.991	0.1	0.05	0.619	R1

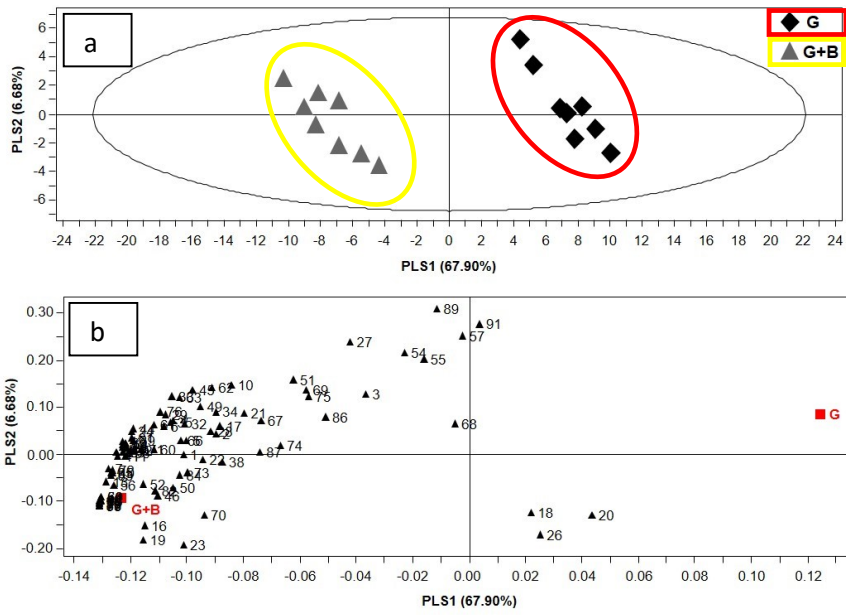
Fig. 8.2 PLS-DA *A. gossypii* vs planta integra



M5 - PLS-DA Observations (N)=16, Variables (K)=93 (X=91, Y=2)

A	R2X	R2X(cum)	Eigenvalue	R2Y	R2Y(cum)	Q2	Limit	Q2(cum)	Significance
0	Cent.			Cent.					
1	0.691	0.691	11.1	0.976	0.976	0.971	0.05	0.971	R1
2	0.0544	0.745	0.871	0.0189	0.995	0.575	0.05	0.988	R1

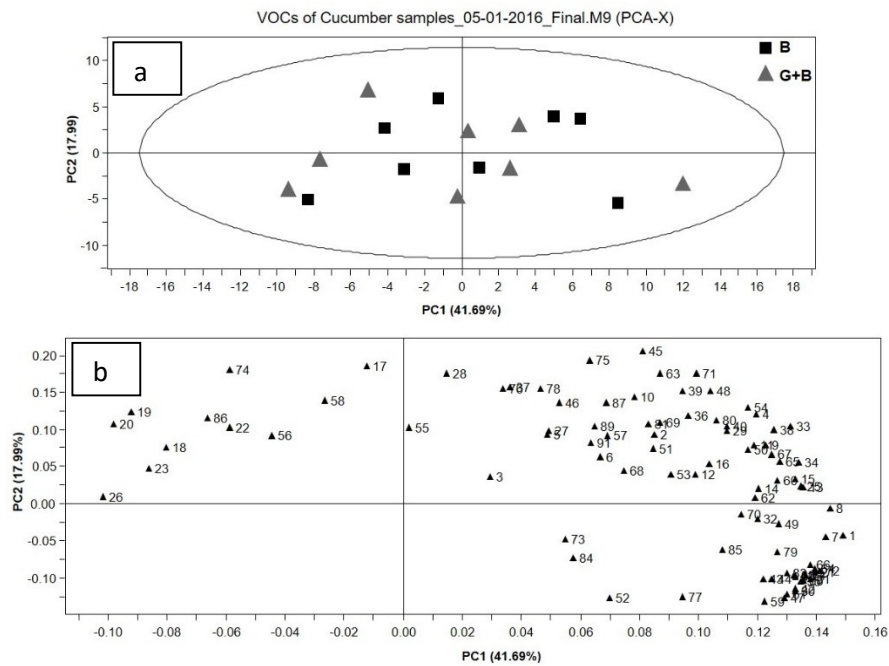
Fig. 8.3 PLS-DA *M. brassicae* vs planta integra



M7 - PLS-DA Observations (N)=16, Variables (K)=93 (X=91, Y=2)

A	R2X	R2X(cum)	Eigenvalue	R2Y	R2Y(cum)	Q2	Limit	Q2(cum)	Significance
0	Cent.			Cent.					
1	0.679	0.679	10.9	0.945	0.945	0.935	0.05	0.935	R1
2	0.0668	0.746	1.07	0.0444	0.99	0.622	0.05	0.975	R1

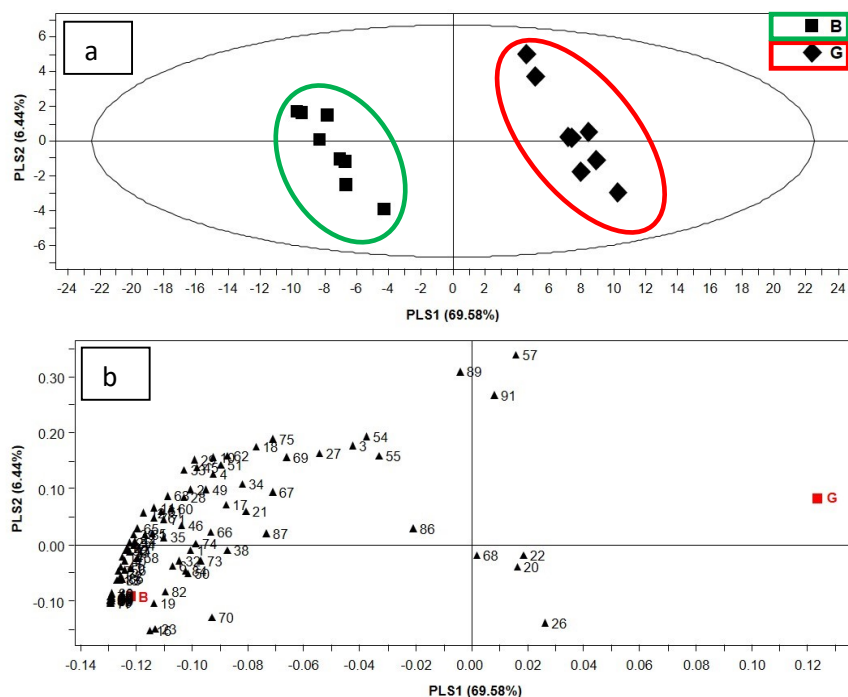
Fig. 8.4 PLS-DA *A. gossypii* vs *A. gossypii* + *M. brassicae*



M9 - PCA-X Observations (N)=16, Variables (K)=91 (X=91, Y=0)

A	R2X	R2X(cum)	Eigenvalue	Q2	Limit	Q2(cum)	Significance	Iterations
0	Cent.							
1	0.417	0.417	6.67	0.303	0.0727	0.303	R1	13
2	0.18	0.597	2.88	0.177	0.0769	0.426	R1	15

Fig. 8.5 PLS-DA *M. brassicae* vs *A. gossypii* + *M. brassicae*



M8 - PLS-DA Observations (N)=16, Variables (K)=93 (X=91, Y=2)									
A	R2X	R2X(cum)	Eigenvalue	R2Y	R2Y(cum)	Q2	Limit	Q2(cum)	Significance
0	Cent.			Cent.					
1	0.696	0.696	11.1	0.951	0.951	0.942	0.05	0.942	R1
2	0.0644	0.76	1.03	0.0432	0.994	0.745	0.05	0.985	R1

Fig. 8.6 PLS-DA *M. brassicae* vs *A. gossypii*

Dall'analisi dei grafici si può notare come il numero e la quantità maggiore dei composti sia prodotto dalle piante infestate dai bruchi (B). Il grafico 8.3 mostra questa differenza rispetto alle piante non infestate (H). Il grafico 8.2 mostra invece come nel confronto tra piante infestate con afidi (G) e piante non infestate (H), molti composti stiano tra le due sorgenti, ad indicare che per quelli, non vi è differenza sostanziale nelle quantità rilasciate dalle due piante.

I risultati delle emissioni sono compatibili con quelli comportamentali delle formiche che infatti erano attratte dalle piante infestate dai bruchi e non da quelle con gli afidi (pag.92, 93, 94)

Il grafico 8.4 che compara le emissioni delle piante infestate dai bruchi + afidi (G+B) e quelle infestate dagli afidi, mostra come poche siano quelle rilasciate in prevalenza dagli afidi. Questo spiegherebbe la maggior attrattività delle piante infestate con i bruchi e gli afidi rispetto a quelle con i soli afidi (pag. 95).

Il grafico 8.6 Confronta le piante infestate con i bruchi e quelle ospitanti gli afidi. Si può vedere che la quasi totalità delle sostanze volatili è emessa in modo maggiore dalle piante con i bruchi.

## 8.2.2 Emissioni delle piante di *S. tuberosum*

Degli 85 composti trovati, 4 non sono presenti nello spettro di emissione delle piante non infestate e sono quindi prodotti in seguito all'attacco dei fitofagi. In tabella 8.8 è rappresentato l'elenco di queste sostanze ed il fitofago che ne ha indotto la produzione. La tabella 8.9 mostra le sostanze con valore maggiore di 1 dell'indice VIP (cfr. prg. 8.2.1) nel confronto tra le sostanze emesse dalle piante di patata infestate dagli afidi *A. gossypii* e le piante non infestate. L'elenco completo di tutte le sostanze emesse nei differenti trattamenti con le piante di patata è in appendice A. Le tabelle 8.10 e 8.11 mostrano le sostanze con VIP maggiore di 1 nel confronto tra le piante infestate con *C. chalcites* e le piante non infestate e tra le piante infestate con *C. chalcites* + *A. gossypii*, confrontate con quelle infestate dai soli *A. gossypii*. La tabella 8.12 confronta le sostanze emesse tra piante con bruchi e piante con afidi.

Composto	Fitofago
(Z)-3-Hexen-1-ol, isobutyrate 13.68	<i>C. chalcites</i> ; <i>A. gossypii</i>
Sesquithujene 19.43	<i>A. gossypii</i>
Beta-Guaiene 20.67	<i>C. chalcites</i>
beta-Cedren-4-one 24.44	<i>C. chalcites</i> ; <i>A. gossypii</i>

Tab. 8.8 Elenco delle sostanze prodotte solo dalle piante infestate, con il fitofago che ne ha indotto la produzione, in ordine di Tempo di Ritenzione (vedi sotto).

Legenda per le tabelle:

H= pianta non infestata (Healthy)

G= pianta infestata con *A. gossypii*

C= pianta infestata con *C. chalcites*

C+G= pianta infestata con *C. chalcites* e *A. gossypii*

RT= Tempo di Ritenzione, cioè il tempo che intercorre tra l'immissione di un composto nella colonna gas-cromatografica e la sua rilevazione

VIP values (H vs G treatments)		
Compound #	Compound_RT (min)	VIP
29	Sesquithujene_19.43	2,23344
1	1-Penten-3-ol_3.28	1,91845
40	Sesquisabinene_20.56	1,91719
8	Tricyclene_8.01	1,64882
14	Linalool_12.59	1,56009
60	beta-Curcumene_21.98	1,40827
47	(E)-Cadina-1(6),4-diene_21.25	1,32474
7	(Z)-2-Penten-1-ol, acetate_7.81	1,2805
34	alpha-Gurjunene_19.92	1,25865
39	(E)-alpha-Bergamotene_20.42	1,21802
71	Palustrol_23.19	1,17773
65	alpha-Cadinene_22.54	1,15573
55	Bicyclo[4.4.0]dec-1-ene, 2-isopropyl-5-methyl-9-methylene_21.65	1,14786
28	Cyclohexane, 1-ethenyl-1-methyl-2,4-bis(1-methylethenyl)-_19.33	1,13615
53	alpha-Selinene_21.54	1,1324
46	Bicyclosesquiphellandrene_21.05	1,08807
64	Cadina-1,4-diene_22.45	1,0824
25	alpha-Cubebene_18.57	1,06905
35	beta-Duprezianene_19.99	1,05828
41	beta-Barbatene_20.64	1,0447
61	gamma-Cadinene_22.07	1,04428
50	alpha-Curcumene_21.38	1,0429
78	T-Cadinol_24.55	1,04247
4	Dimethyl disulfide_4.13	1,03302
63	delta-Cadinene_22.25	1,02885
13	Methyl benzoate_12.49	1,0282
30	beta-Cubebene_19.47	1,0232
10	(Z)- <sup>2</sup> -Ocimene_11.01	1,0095
12	Guaiacol_12.36	1,0067

Tab 8.9 Composti la cui quantità emessa differisce in modo significativo tra piante infestate con *A. gossypii* rispetto alle piante non infestate

VIP values (H vs C treatments)		
Compound #	Compound_RT (min)	VIP
1	1-Penten-3-ol_3.28	1,95789
32	(Z)-Jasmone_19.63	1,66513
17	(E,E)-Cosmene_13.34	1,29406
18	allo-neo-Ocimene_13.62	1,27177
80	alpha-Amylcinnamaldehyde, (E)-_24.66	1,24392
7	(Z)-2-Penten-1-ol, acetate_7.81	1,23862
14	Linalool_12.59	1,23654
19	(Z)-3-Hexen-1-ol, isobutyrate_13.68	1,22371
71	Palustrol_23.19	1,1743
3	2-Methylbutanenitrile_3.84	1,16897
28	Cyclohexane, 1-ethenyl-1-methyl-2,4-bis(1-methylethenyl)-_19.33	1,16555
84	alpha-Hexylcinnamaldehyde, (E)-_26.47	1,15979
36	(E)-beta-Caryophyllene_20.14	1,14178
4	Dimethyl disulfide_4.13	1,13377
26	3-Buten-2-one, 4-(3-cyclohexen-1-yl)-_18.98	1,13219
44	alpha-Caryophyllene_20.86	1,10946
81	alpha-Cadinol_24.84	1,08807
16	Alloocimene_13.32	1,08783
82	Unknown sesquiterpene_25.27	1,08458
29	Sesquithujene_19.43	1,07775
51	Germaacrene D_21.41	1,06388
74	Ledol_23.87	1,05606
67	alpha-Calacorene_22.65	1,05483
85	4-Acetyl-alpha-cedrene_26.95	1,04868
12	Guaiacol_12.36	1,01816
31	beta-Elemene_19.51	1,01531
20	(Z)-3-Hexenyl butyrate_14.67	1,0126
76	Unknown_24.19	1,00162

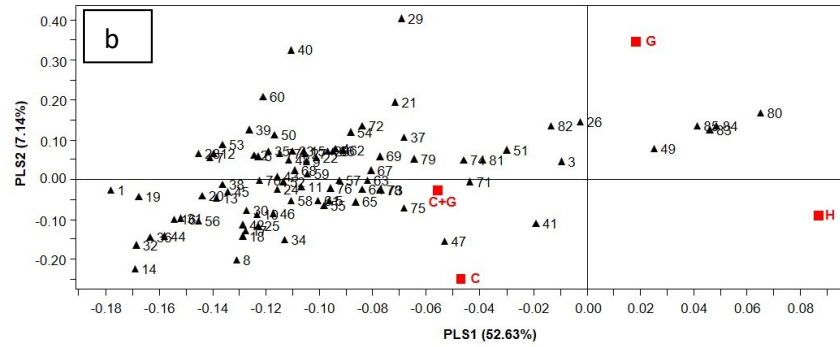
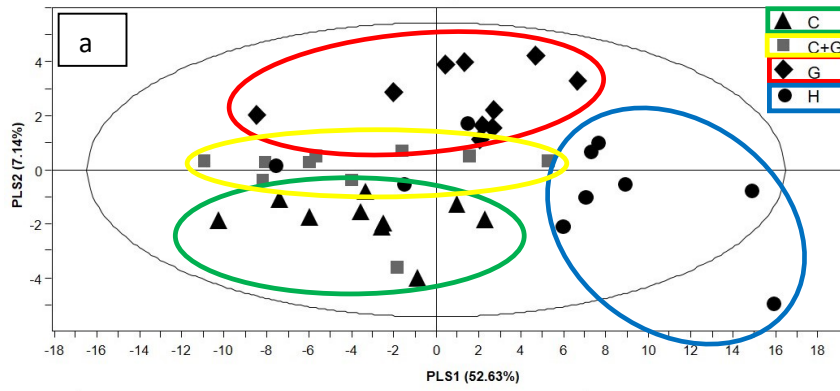
Tab. 8.10 Composti la cui quantità emessa differisce in modo significativo tra piante infestate con *C. chalcites* e piante non infestate

VIP values (G vs C+G treatments)		
Compound #	Compound_RT (min)	VIP
14	Linalool_12.59	1,85279
41	beta-Barbatene_20.64	1,74144
18	allo-neo-Ocimene_13.62	1,53887
16	Alloocimene_13.32	1,53106
54	alpha-Zingibere_21.61	1,43248
60	beta-Curcumene_21.98	1,41534
17	(E,E)-Cosmene_13.34	1,41058
40	Sesquisabinene_20.56	1,37367
29	Sesquithujene_19.43	1,35879
3	2-Methylbutanenitrile_3.84	1,2653
32	(Z)-Jasmone_19.63	1,25395
21	Methyl salicylate_14.98	1,20372
8	Tricyclene_8.01	1,17961
72	(E,E)-TMTT_23.27	1,16494
36	(E)-beta-Caryophyllene_20.14	1,14848
80	alpha-Amylcinnamaldehyde, (E)-_24.66	1,12226
20	(Z)-3-Hexenyl butyrate_14.67	1,12018
10	(Z)- <sup>2</sup> -Ocimene_11.01	1,10965
24	Bicycloelemene_18.30	1,09496
48	gamma-Muurolene_21.30	1,08597
62	beta-Sesquiphellandrene_22.22	1,07419
44	alpha-Caryophyllene_20.86	1,06605
66	Unknown sesquiterpene_22.58	1,05463
69	gamma-Calacorene_23.06	1,03471
23	(Z)-3-hexenyl tiglate_17.93	1,03403
19	(Z)-3-Hexen-1-ol, isobutyrate_13.68	1,03339
49	alpha-Isomethyl ionone_21.33	1,02233
4	Dimethyl disulfide_4.13	1,01295
1	1-Penten-3-ol_3.28	1,00938

Tab. 8.11 Composti la cui quantità emessa differisce in modo significativo tra piante infestate con *C. chalcites* + *A. gossypii* e piante infestate con *A. gossypii*.

VIP values (C vs G treatments)		
Compound #	Compound_RT (min)	VIP
29	Sesquithujene_19.43	1,92681
40	Sesquisabinene_20.56	1,91935
60	beta-Curcumene_21.98	1,86202
14	Linalool_12.59	1,47331
21	Methyl salicylate_14.98	1,33071
36	(E)-beta-Caryophyllene_20.14	1,30012
8	Tricyclene_8.01	1,2864
44	alpha-Caryophyllene_20.86	1,24097
24	Bicycloelemene_18.30	1,22866
32	(Z)-Jasmone_19.63	1,22698
50	alpha-Curcumene_21.38	1,19681
72	(E,E)-TMTT_23.27	1,17381
28	Cyclohexane, 1-ethenyl-1-methyl-2,4-bis(1-methylethenyl)-_19.33	1,15546
18	allo-neo-Ocimene_13.62	1,13726
20	(Z)-3-Hexenyl butyrate_14.67	1,12119
34	alpha-Gurjunene_19.92	1,12105
25	alpha-Cubebene_18.57	1,11628
31	beta-Elemene_19.51	1,10966
56	Germacrene B_21.72	1,10819
39	(E)-alpha-Bergamotene_20.42	1,10776
80	alpha-Amylcinnamaldehyde, (E)-_24.66	1,08332
54	alpha-Zingibere_21.61	1,0767
17	(E,E)-Cosmene_13.34	1,07663
82	Unknown sesquiterpene_25.27	1,07081
48	gamma-Muurolene_21.30	1,02914
59	(Z)-Nerolidol_21.92	1,02439
70	(Z)-3-Hexen-1-ol, benzoate_23.14	1,00602
83	Caryophyllene acetate_25.68	1,00165

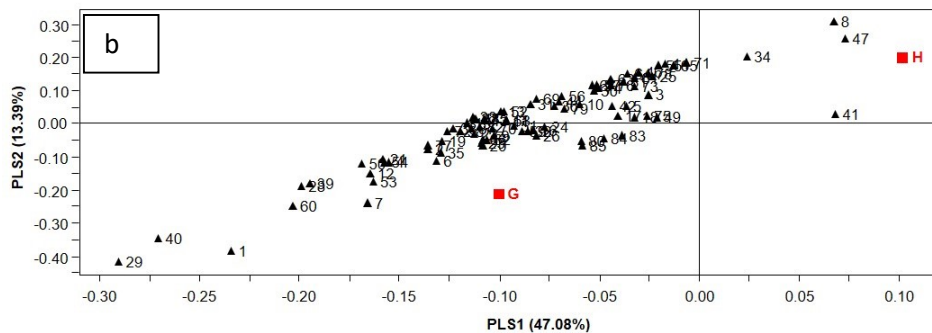
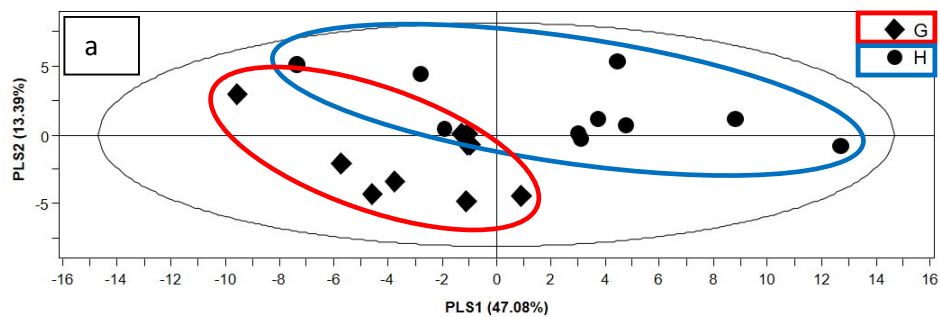
Tab. 8.12 Composti la cui quantità emessa differisce in modo significativo tra piante infestate con *A. gossypii* e piante infestate con *C. chalcites*.



M2 - PLS-DA Observations (N)=40, Variables (K)=89 (X=85, Y=4)

A	R2X	R2X(cum)	Eigenvalue	R2Y	R2Y(cum)	Q2	Limit	Q2(cum)	Significance
0	Cent.			Cent.					
1	0.526	0.526	21.1	0.134	0.134	0.107	0.05	0.107	R1
2	0.0714	0.598	2.86	0.21	0.344	0.142	0.05	0.234	R1
3	0.0887	0.687	3.55	0.0973	0.441	0.0503	0.05	0.272	R1
4	0.0707	0.757	2.83	0.0693	0.51	0.0509	0.05	0.309	R1

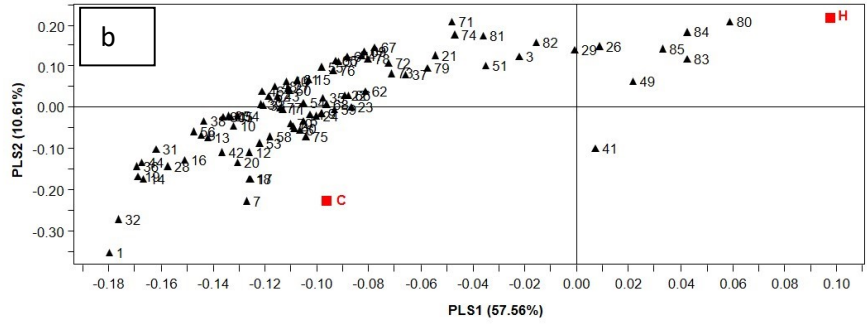
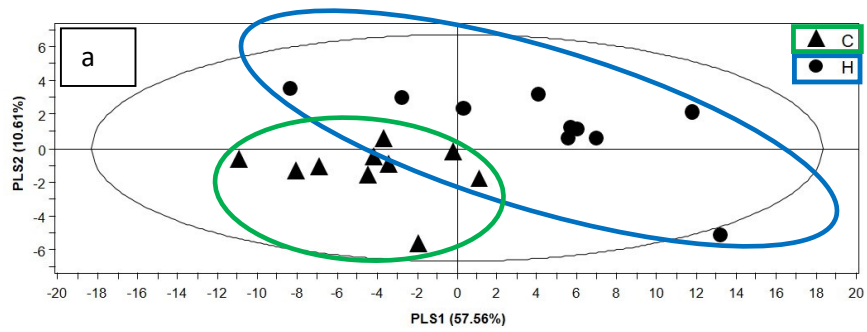
Fig.8.7 PLS-DA comprendente tutti i trattamenti



M3 - PLS-DA Observations (N)=20, Variables (K)=87 (X=85, Y=2)

A	R2X	R2X(cum)	Eigenvalue	R2Y	R2Y(cum)	Q2	Limit	Q2(cum)	Significance
0	Cent.			Cent.					
1	0.471	0.471	9.42	0.292	0.292	0.173	0.05	0.173	R1
2	0.134	0.605	2.68	0.373	0.665	0.347	0.05	0.46	R1
3	0.091	0.696	1.82	0.164	0.829	0.271	0.05	0.607	R1
4	0.0986	0.794	1.97	0.0493	0.879	0.0805	0.05	0.638	R1

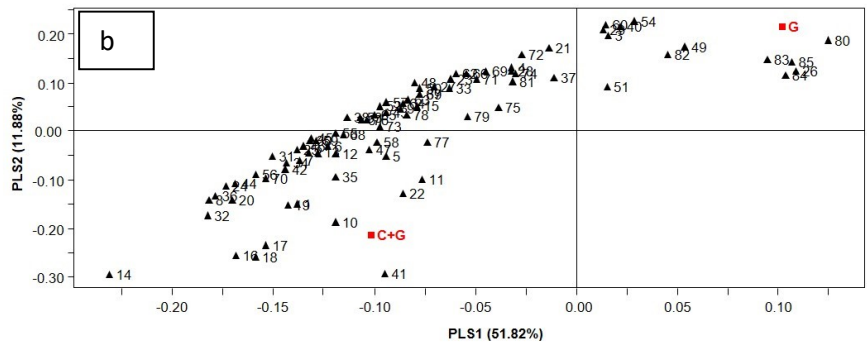
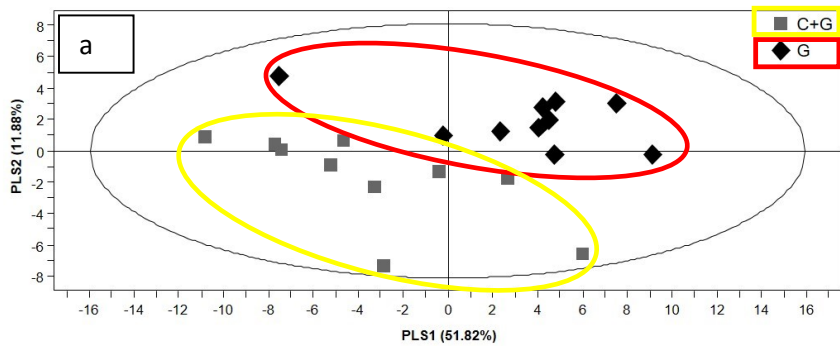
Fig.8.8 PLS-DA *A. gossypii* vs piante integre



M4 - PLS-DA Observations (N)=20, Variables (K)=87 (X=85, Y=2)

A	R2X	R2X(cum)	Eigenvalue	R2Y	R2Y(cum)	Q2	Limit	Q2(cum)	Significance
0	Cent.			Cent.					
1	0.576	0.576	11.5	0.421	0.421	0.345	0.05	0.345	R1
2	0.106	0.682	2.12	0.297	0.718	0.288	0.05	0.533	R1
3	0.0757	0.757	1.51	0.186	0.904	0.424	0.05	0.731	R1
4	0.0587	0.816	1.17	0.0654	0.969	0.524	0.05	0.872	R1
5	0.0349	0.851	0.698	0.0175	0.987	0.289	0.05	0.909	R1

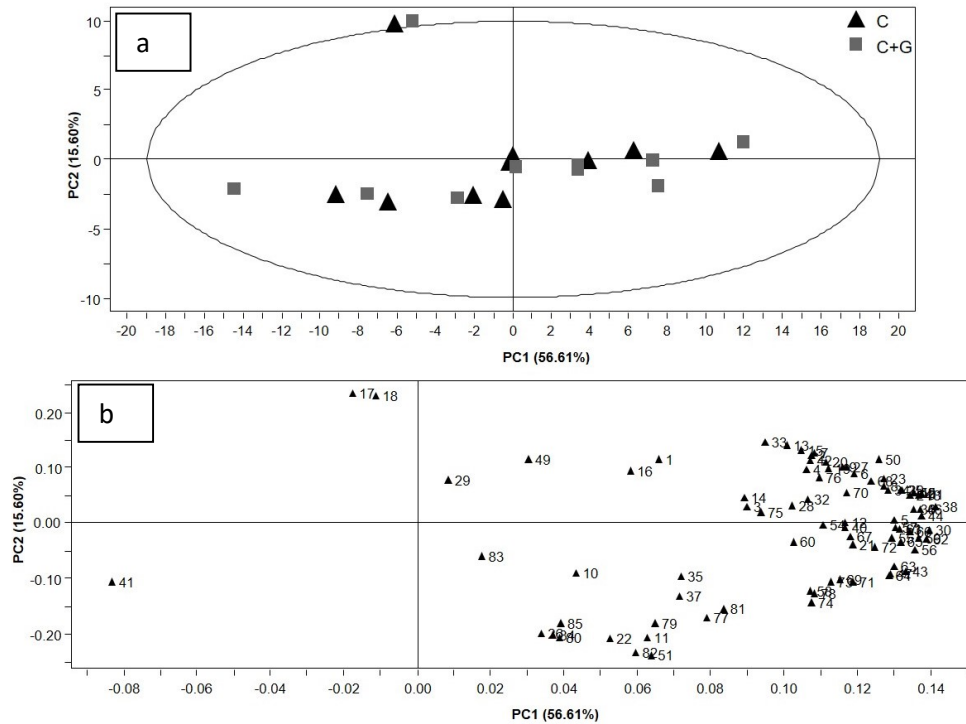
Fig.8.9 PLS-DA *C. chalcites* vs piante integre



M8 - PLS-DA Observations (N)=20, Variables (K)=87 (X=85, Y=2)

A	R2X	R2X(cum)	Eigenvalue	R2Y	R2Y(cum)	Q2	Limit	Q2(cum)	Significance
0	Cent.			Cent.					
1	0.518	0.518	10.4	0.351	0.351	0.199	0.05	0.199	R1
2	0.119	0.637	2.37	0.405	0.756	0.418	0.05	0.534	R1

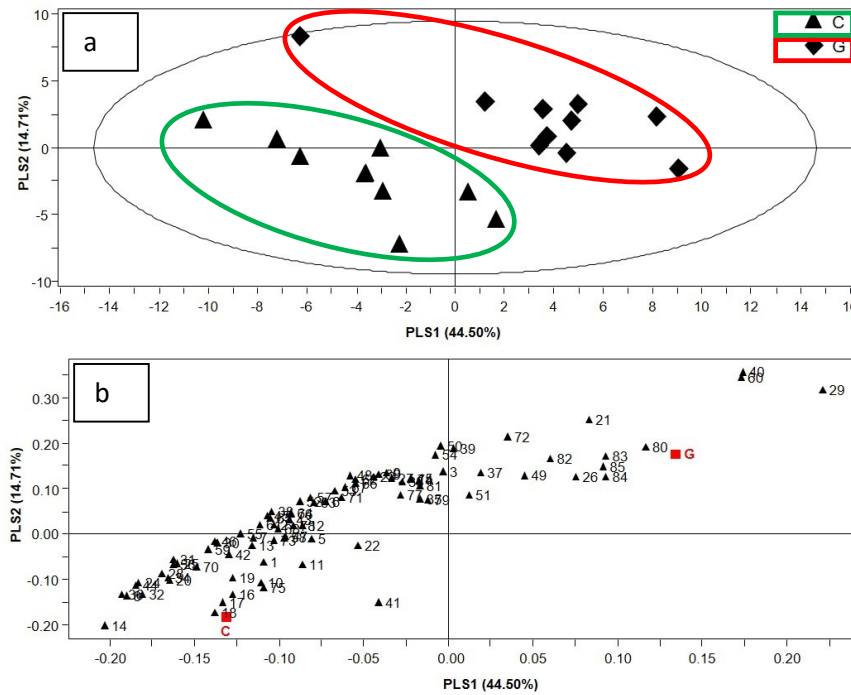
Fig.8.10 PLS-DA *C. chalcites* + *A. gossypii* vs *A. gossypii*



M9 - PCA-X Observations (N)=20, Variables (K)=85 (X=85, Y=0)

A	R2X	R2X(cum)	Eigenvalue	Q2	Limit	Q2(cum)	Significance	Iterations
0	Cent.							
1	0.566	0.566	11.3	0.49	0.061	0.49	R1	10
2	0.156	0.722	3.12	0.247	0.0638	0.616	R1	21
3	0.0902	0.812	1.8	0.152	0.0668	0.674	R1	14

Fig.8.11 PLS-DA *C. chalcites* vs *C. chalcites* + *A. gossypii*.



M7 - PLS-DA Observations (N)=20, Variables (K)=87 (X=85, Y=2)

A	R2X	R2X(cum)	Eigenvalue	R2Y	R2Y(cum)	Q2	Limit	Q2(cum)	Significance
0	Cent.			Cent.					
1	0.445	0.445	8.9	0.504	0.504	0.333	0.05	0.333	R1
2	0.147	0.592	2.94	0.39	0.893	0.617	0.05	0.744	R1
3	0.0676	0.66	1.35	0.0556	0.949	0.108	0.05	0.772	R1

Fig.8.12 PLS-DA *C. chalcites* vs *A. gossypii*.

Si può osservare come il numero e la quantità maggiori di sostanze sia prodotto dai bruchi (C) (figur 8.9). In questo caso però gli afidi (G) producono numerosi composti in maggior quantità rispetto alle piante non infestate (H) (figura 8.8). Questo spiegherebbe la maggior attrattività sia delle piante infestate con i bruchi che di quelle con gli afidi rispetto alle piante integre in olfattometro (pag 92, 93, 94). Quando le piante con i bruchi (C), da soli o in associazione con gli afidi (C+G), sono comparate a quelle ospitanti solo gli afidi (G), anche se si ha una prevalenza nell'emissione dei *volatiles*, da parte delle piante con i bruchi, ci sono numerosi composti intorno a G (figura 8.10 e 8.12). Questo potrebbe essere il motivo per cui le formiche non hanno compiuto una scelta netta tra una delle due fonti di emissione (pag. 95).

Anche per le piante di patata l'associazione tra l'afide mutualista *A. gossypii* e il fitofago masticatore (in questo caso *C. chalcites*) che sfruttano contemporaneamente la stessa pianta, induce la produzione di un profilo di sostanze del tutto simile a quello prodotto dall'infestazione del solo *C. chalcites* e non è possibile dividere i trattamenti in due gruppi distinti (figura 8.11).

## 9 DISCUSSIONE

Nelle interazioni piante-animali riveste grande importanza l'emissione degli "Herbivore induced Plant Volatiles" (HIPVs) come strategia di difesa indiretta delle piante (Rico-Grey e Oliveira 2007; Schoonhoven *et al* 2005; Heil 2014; Guerreri *et al.* 2003). In questo contesto rimane aperta la questione del ruolo potenziale che tali sostanze chimiche possono giocare nelle relazioni con le formiche in quanto poco si sa sulla capacità di questi insetti di seguire questo tipo di stimoli per individuare gli artropodi fitofagi potenziali prede o i produttori di melata. Nel caso in cui le formiche fossero in grado di rispondere al "cry for help" emesso dalle piante, esso avrebbe un significato diverso a seconda del fitofago che ne ha indotto l'emissione. Se questi composti servissero alle formiche per raggiungere le prede, le sostanze volatili prodotte sarebbero dei sinomoni, producendo un vantaggio sia per la pianta emittente che così si libera dei fitofagi, sia per le formiche che così individuano la loro preda. Se invece le formiche utilizzassero gli HIPVs per localizzare degli afidi con i quali instaurare un rapporto di trofobiosi, le sostanze volatili sarebbero dei cairomoni, perché avvantaggerebbero solo le formiche, a danno della pianta (Tremblay 1999).

Gli esperimenti di raccolta ed analisi gas-cromatografica delle sostanze volatili emesse dalle piante oggetto di studio (*Cucumis sativus* e *Solanum tuberosum*), hanno confermato che gli organismi vegetali sono una vera centrale di produzione biochimica (Ode 2006). Dalle nostre analisi 91 composti volatili diversi sono stati individuati nelle piante di cetriolo e 85 in quelle di patata. Dalle elaborazioni effettuate, rispettivamente 27 e 4 di essi sono prodotti *de novo* dalle piante attaccate dai fitofagi. In generale, il cambiamento più consistente è dato dalla quantità di alcune sostanze volatili emesse dalle piante infestate rispetto a quelle integre che determina un cambiamento nei rapporti tra le sostanze che compongono i *volatiles*. Il cosiddetto "Cry for Help" delle piante è quindi dato da un *blend* di composti diversi più che dalle singole sostanze prodotte *de novo* dalle piante infestate.

Attraverso gli esperimenti comportamentali tramite olfattometro, abbiamo verificato che *F. pratensis* risponde agli HIPVs emessi dalle piante di interesse agrario da noi utilizzate, con

modalità differenti in funzione della specie di fitofago presente ed anche in funzione della specie vegetale utilizzata.

Con le piante di cetriolo le sostanze volatili prodotte sotto l'attacco degli afidi sono risultate non essere attrattive per le formiche, al contrario, la presenza di fitofagi masticatori ha indotto una risposta significativa in *F. pratensis*. Una possibile spiegazione a questo comportamento potrebbe essere che la maggior parte delle specie di afidi non sono mutualiste e non instaurano nessun tipo di associazione con le formiche (Bristow 1991). E' possibile che seguire tale stimolo chimico possa portare a una fonte trofica non utile, generando una perdita di tempo e di energie per le formiche. Un'importante *cue* per le formiche nel rintracciare gli afidi mutualisti è invece l'odore della melata (Völkl *et al.* 1999; Del-Claro e Oliveira 1996). Nei nostri esperimenti un discreto quantitativo di melata era presente sulla superficie delle foglie ma non è stata osservata una risposta significativa da parte delle formiche. Possiamo supporre che il quantitativo di melata presente non fosse sufficiente per indurre una risposta nelle formiche oppure che *F. pratensis* non segua questo tipo di traccia. Un altro modo che hanno le formiche per riconoscere gli afidi mutualisti è quello di toccare con le antenne il loro corpo, captandone gli idrocarburi cuticolari, distintivi in alcune specie di afidi mutualisti (Lang e Menzel 2011). In questo caso è necessario che le formiche possano venire a contatto con gli afidi e nei nostri esperimenti in olfattometro questo non era permesso. Quando le piante di cetriolo erano attaccate da fitofagi masticatori, le formiche erano attratte dai VOCs emessi dalle piante infestate rispetto alle piante integre perché seguire questo tipo di sostanze porterebbe questi esapodi, che hanno un forte comportamento predatorio, ad una fonte certa di proteine. Il comportamento delle formiche nel caso delle piante di cetriolo concorda con la teoria della "reliability-detectability" (Vet e Dike 1992). Secondo questa teoria gli stimoli indotti in pianta dagli insetti fitofagi offrono il miglior compromesso tra affidabilità e percettibilità per gli entomofagi in cerca di prede. L'odore dei fitofagi offre un elevato grado di *reliability* (affidabilità circa l'effettiva presenza della preda) ma un basso grado di *detectability*, in quanto evolutivamente il fitofago trae vantaggio dall'emettere meno odori possibile per non essere individuato dai predatori e perché la biomassa degli insetti fitofagi è trascurabile rispetto a quella della pianta (Schoonhoven *et al.* 1998). La pianta ha un elevato grado di *detectability* perché può emettere sostanze volatili anche dalle porzioni non direttamente sotto attacco, per via sistemica, ed evolutivamente trae vantaggio dall'emettere più sostanze possibile per essere individuata dai predatori dei fitofagi. Il grado di *reliability* è anch'esso elevato perché la produzione degli HIPVs avviene solo a seguito del danno inferto alla pianta dall'attacco dei

fitofagi, presenti quindi *in situ*. In questo senso le risposte della pianta indotte dai fitofagi masticatori sono molto maggiori rispetto all'attacco dei fitomizi perché con i primi la pianta è soggetta ad una pesante distruzione meccanica dei tessuti vegetali mentre con i secondi il danno è puntiforme e prolungato (Guerreri et al. 2003)

Nel caso delle piante di patata la risposta delle formiche all'emissione degli HIPVs è stata differente. Esse hanno risposto in modo significativo ai trattamenti con ogni fitofago testato rispetto alle piante intatte. C'è stata quindi una risposta positiva anche con la presenza degli afidi non mutualisti, che non instaurano alcun rapporto trofobiotico con le formiche. In questo caso verrebbe a mancare l'aspetto della reliability perché le formiche raggiungerebbero un target non interessante dal punto di vista trofico. Dall'analisi delle sostanze prodotte da queste piante è emerso che il  $\beta$ -Farnesene, che ipotizzavamo essere prodotto in conseguenza dell'attacco dei fitofagi (Gosset et al.2009), è prodotto anche dalle piante non infestate e si potrebbe quindi annoverare tra le difese costitutive anziché indotte. In presenza di afidi viene emesso un consistente quantitativo del terpenoide sesquithujene. L'attrattività che esercitano i terpenoidi nei confronti di predatori e parassitoidi è stata ampiamente dimostrata (Dike 1994; Turlings *et al.* 1990; Schoonhoven *et al.* 2005) . La sua presenza quindi determinerebbe, probabilmente in associazione con altre sostanze, la risposta positiva delle formiche alla presenza degli afidi sulle piante. L'attrattività che questi composti esercitano sulle formiche dipende quindi sia dalla composizione del *blend* di sostanze ma anche e soprattutto dai rapporti quantitativi che compongono gli HIPVs rispetto alle sostanze emesse dalle piante non infestate (Shoennenoven *et al.*2005). Ulteriori indagini potranno comunque chiarire quali sostanze componenti gli HIPVs risultano essere quelle attrattive per le formiche.

## 10.CONCLUSIONI GENERALI

Piante e formiche sono organismi dominanti in molti ecosistemi terrestri e le loro molteplici ed antiche interazioni rappresentano degli importanti modelli di studio nelle relazioni piante-animali. Questa lunga storia comune, spesso caratterizzata da processi di coevoluzione, ha portato allo sviluppo di numerose caratteristiche adattative la cui conoscenza potrebbe essere estremamente importante in numerosi campi, dalla biologia di base, all'applicazione in campo agronomico (Hölldobler e Wilson 1990; Rico-Grey e Oliveira 2007; Ness *et al.* 2010; Grasso *et al.* 2015). Le formiche esercitando un controllo top-down degli artropodi, consumano un gran numero di prede e quindi riducono le popolazioni di insetti erbivori che gravano sulle piante (Punttila *et al.* 2004; Cerdà e Dejean 2011; Choate e Drummond 2011). Il ruolo che questi esapodi ricoprono all'interno delle reti trofiche, nonostante la loro ubiquità, ha ricevuto relativamente poca attenzione negli studi ecologici. In particolare ancora poco si conosce degli effetti di tali interazioni sulle dinamiche delle reti trofiche che includono piante e artropodi.

I risultati ottenuti nella presente ricerca hanno fornito dati utili ad una migliore comprensione delle interazioni che avvengono all'interno di un sistema multitrofico basato sui rapporti tra piante e insetti e sulle possibili dinamiche sinergiche o negative tra le specie che ne fanno parte.

Dagli esperimenti sulla predazione verso i bruchi di *M. brassicae* è risultato che le formiche manifestano un elevato potenziale predatorio, eradicando completamente la presenza dei bruchi sulle piante. Questo livello di aggressività però non cresce con la presenza degli afidi mutualisti che dovrebbero essere difesi dai competitori. Le formiche non sono neanche in grado di sopprimere i predatori afidofagi che ipotizziamo riescano ad effettuare un camuffamento chimico, assumendo gli odori degli afidi con i quali stanno a contatto. Gli esperimenti comportamentali effettuati sembrano supportare questa ipotesi che, comunque, richiederà ulteriori approfondimenti (ad es. analisi chimiche dei composti epicuticulari) per essere confermata. In definitiva sembra che gli afidi non ricevano benefici dalla presenza delle formiche che si nutrono della loro melata senza dare nulla in cambio. Tutto ciò evidenzia l'importanza di *A. aphidimyza* come limitatore di afidi e il suo utilizzo in lotta biologica in presenza o meno delle formiche. Queste, quindi, in un sistema multitrofico caratterizzato dalla presenza del dittero afidofago, potrebbero garantire un beneficio alle piante limitando varie specie di fitofagi senza interferire con l'azione di controllo esercitata dalle larve del dittero.

In questo contesto, un possibile effetto negativo della presenza delle formiche è dato dall'interazione mutualistica che queste possono instaurare con insetti fitomizi, sfruttando la loro melata e offrendo loro protezione dai nemici naturali (Stewart-Jones *et al.* 2008; Eubanks *et al.* 2002; Kaplan e Eubanks 2002; Stadler e Dixon 2008). Tuttavia, in un'ottica eco-etologica di bilancio costi/benefici, è possibile che l'interazione mutualistica formiche/afidi possa essere vantaggiosa anche per la pianta quando l'effetto positivo indiretto dato dalla riduzione del numero di erbivori competitori operato dalle formiche, superi l'effetto negativo diretto della fitofagia operata dai fitomizi sulle piante. Si deve tenere presente che gli afidi e gli altri erbivori sono in competizione per la stessa risorsa, quindi l'interazione tra loro è di tipo negativo ed indiretto, poiché entrambi riducono la qualità della pianta. Va anche sottolineato che molte tra le specie più comuni di afidi infestanti non sono mutualiste e non interagiscono pertanto con le formiche (Bristow 1991). Conoscere i benefici (predazione sugli erbivori) e i costi (protezione dei fitomizi) offerti dalle formiche negli agroecosistemi diventa fondamentale in un'ottica di utilizzo di questi insetti in programmi di controllo biologico.

L'analisi delle reazioni delle formiche all'emissione degli HIPVs delle piante coltivate oggetto di studio, ha evidenziato che le formiche rispondono positivamente alle sostanze volatili, in funzione della specie di fitofago infestante e della specie di pianta. E' probabile quindi che gli HIPVs svolgano un ruolo importante nel modulare i comportamenti delle formiche verso le potenziali prede. Le formiche hanno anche la capacità di associare particolari odori con la presenza di una fonte di nutrimento, pattugliando l'area in cui questi odori vengono percepiti (Hölldobler e Wilson 1990; van Wilgenburg *et al.* 2012). In un'ottica di controllo biologico, ciò potrebbe essere utilizzato per indirizzarne il comportamento delle formiche in modo da migliorarne i servizi. La diffusione di queste sostanze su piante di interesse agrario potrebbe attrarre le formiche facilitando la loro azione di "body guard" per la pianta limitando l'attacco dei fitofagi. In questo contesto, ulteriori indagini sulla natura delle sostanze volatili coinvolte nell'attrarre le formiche verso le piante infestate potrà fornire indicazioni preziose per un loro utilizzo finalizzato ad aumentare l'impatto benefico che possono svolgere negli agroecosistemi, nonché per migliorare la conoscenza delle relazioni piante-formiche (Heil 2008; Heil 2015).

In conclusione, considerando le formiche come un possibile strumento per un'agricoltura sostenibile (Offenberg 2015), lo studio dei rapporti che questi insetti hanno verso gli altri organismi facenti parte delle reti trofiche potrebbe aprire nuove opportunità e dare una nuova visione delle strategie di controllo biologico alternative nonché fornire ulteriori dati sulle relazioni ecologiche intercorrenti tra piante coltivate formiche e altri insetti.

## 11 RIASSUNTO

Le formiche svolgono un importante ruolo all'interno degli ecosistemi ed alcune specie sono considerate *keystone* in quanto in grado di modificare la componente biotica e/o abiotica dell'ecosistema stesso. Sono animali ubiquitari che hanno colonizzato molteplici ambienti, compresi gli agroecosistemi. Negli agroecosistemi spesso svolgono un ruolo impattante determinando la diffusione o il regresso di specie di artropodi, alcune delle quali dannose alle colture. La presente ricerca tiene conto di un'ampia visione dei rapporti ecoetologici intercorrenti tra le formiche e la componente biotica di un ecosistema, utilizzando il concetto di rete multitrofica. In quest'ottica, si è pensato di costruire un sistema multitrofico costituito da una specie vegetale di interesse agrario (*Cucumis sativus*), dai suoi fitofagi naturali, divisi in fitomizi (afidi) (*Aphis gossypii* e *Myzus persicae*) e fitofagi masticatori (bruchi del lepidottero *Mamestra brassicae*), formiche (*Formica pratensis*) e predatori afidofagi (*Aphidolets aphidimyza*). Il sistema multitrofico è stato utilizzato sia per studiare l'aggressività delle formiche, sia per verificare l'esistenza di una comunicazione interspecifica tra le formiche e le piante (allelochimici).

Gli studi sull'aggressività sono consistiti nel:

- Verificare il livello di aggressività delle formiche nei confronti di un fitofago masticatore, competitore degli afidi nello sfruttare la pianta ospite.
- Verificare se la presenza di afidi mutualisti fa variare il livello di aggressività delle formiche verso il competitore.
- Verificare se esiste aggressività verso un predatore di afidi, i quali, secondo il paradigma della trofobiosi, dovrebbero essere difesi dalle formiche in cambio della melata.
- Verificare se il predatore ha evoluto strategie volte ad eludere il controllo delle formiche sugli insetti che si avvicinano alla colonia di afidi.

Gli studi sui rapporti piante-formiche sono stati effettuati mediante olfattometro, osservando la risposta delle formiche alle sostanze volatili provenienti da piante infestate in modo differente con i fitofagi del sistema. Attraverso il trappolaggio e l'analisi gas-cromatografica delle sostanze prodotte dalle piante oggetto di studio abbiamo quindi individuato tipo e quantità di

ogni composto volatile. Oltre alle piante di cetriolo, per questi esperimenti sono state utilizzate anche piante di patata (*Solanum tuberosum*).

Dagli esperimenti sull'aggressività è risultato che le formiche manifestano un elevato potenziale predatorio, eradicando completamente la presenza dei bruchi sulle piante. Questo livello di aggressività tuttavia non cresce con la presenza degli afidi mutualisti che dovrebbero essere difesi dai competitori. Le formiche inoltre non sono in grado di sopprimere i predatori afidofagi che ipotizziamo riescano ad effettuare un camuffamento chimico, assumendo gli odori degli afidi dei quali si nutrono.

I risultati degli esperimenti in olfattometro mostrano una chiara risposta positiva delle formiche verso gli odori di alcune delle piante infestate. Vi sono delle differenze nella risposta in funzione della specie di fitofago presente e della specie di pianta utilizzata. Nei trattamenti in cui erano presenti le piante di *C. sativus*, gli esperimenti in olfattometro hanno mostrato che le formiche rispondono in modo significativo agli odori emessi dalle piante in cui vi era la presenza del fitofago masticator *M. brassicae*, solo o in associazione con *A. gossypii*. La presenza dei soli afidi, sia mutualisti (*A. gossypii*) sia non mutualisti (*M. persicae*), non ha invece indotto una risposta significativa nelle formiche rispetto agli odori delle piante non infestate.

Nei trattamenti in cui erano presenti le piante di *S. tuberosum* la scelta delle formiche è stata significativa verso gli odori emessi dalle piante infestate con ciascuna delle singole specie di erbivori rispetto alle piante non infestate

Gli esperimenti sull'analisi delle sostanze volatili emesse dalle piante hanno confermato che gli organismi vegetali sono una vera centrale di produzione biochimica, infatti ben 91 composti volatili diversi sono stati individuati dall'analisi gas-cromatografica delle piante di cetriolo e 85 in quelle di patata. Dalle elaborazioni effettuate, rispettivamente 27 e 4 di essi sono prodotti esclusivamente dalle piante attaccate dai fitofagi. In generale, il cambiamento più consistente è dato dalla quantità di alcune sostanze volatili emesse dalle piante infestate rispetto a quelle integre che determina un cambiamento nei rapporti tra le sostanze che compongono i *volatiles*. E' probabile che l'effetto attrattivo esercitato sulle formiche sia dato da un *Blend* di sostanze più che dai singoli composti presenti

Le informazioni raccolte da questo lavoro potranno essere utili nell'elaborazione di piani di lotta integrata che prevedano l'utilizzo delle formiche, organismi che possono determinare benefici maggiori rispetto ai costi sopportati da una pianta o una coltura attaccata dai fitofagi.

## BIBLIOGRAFIA

Agelopoulos NG & Pickett JA (1998) Headspace analysis in chemical ecology: effects of different sampling methods on ratios of volatile compounds present in headspace samples. *Journal of Chemical Ecology*, 24(7): 1161-1172.

Agrawal AA (1998) Leaf damage and associated cues induce aggressive ant recruitment in a neotropical ant-plant. *Ecology*, 79(6): 2100-2112

Albajes R, Gullino ML, van Lenteren JC & Elad Y (1999) Integrated pest and disease management in greenhouse crops. Kluwer Academic Publishers.

Azcárate FM, Manzano P (2011) A fable on voracious and gourmet ants: ant-seed interactions from predation to dispersal. In Polidori C, ed. *Predation in the Hymenoptera: an evolutionary perspective*, Kerala: Transworld Research Network, 79-99.

Baldwin IT, Halitschke R, Paschold A, von Dahl CC & Preston CA (2006) Volatile Signaling in Plant-Plant Interactions: "Talking Trees" in the Genomics Era. *Science*: Vol. 311, Issue 5762, pp. 812-815

Barlow CA (1962) The influence of temperature on the growth of experimental populations of *Myzus persicae* (Sulzer) and *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) (Aphididae). *Canadian Journal of Zoology*, 40(2): 145-156

Bass, C., Puinean, A.M., Zimmer, C.T., Denholm, I., Field, L.M., Foster, S.P., Gutbrod, O., Nauen, R., Slater, R., Williamson, M.S., 2014. The evolution of insecticide resistance in the peach potato aphid, *Myzus persicae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 51: 41-51.

Beattie AJ. (1985) *The evolutionary ecology of ant-plant mutualisms*. Cambridge: Cambridge University Press.

Benckiser G (2009) Ants and sustainable agriculture. A review. *Agronomy for sustainable development*, 1-9

Blackman R L, & Eastop VF (2000) *Aphids on the world's crops, an identification and information guide*. Second Edition, John Wiley & Sons, Chichester, England.

Blüthgen B & Fielder K (2004) Preferences for sugars and amino acids and their conditionality in a diverse nectar-feeding ant community. *Journal of Animal Ecology*, 73: 155-166.

Bristow CM (1991) Why are so few aphids ant-tended? In Huxley CR, Cutler DF ant-plant interactions. Oxford University Press, Oxford pp. 104-119.

Bohan DA, Raybould A, Mulder C, Woodward G, Tamaddoni-Nezhad A, Blüthgen B, Pocock MJO, Muggleton S, Evans DM, Astegiano J, Massol F, Loeuille N, Petit S & Macfadyen S, (2013) Chapter One - Networking Agroecology: Integrating the Diversity of Agroecosystem Interactions. *Advances in Ecological Research*, 49: 1-67.

Bruinsma M, Posthumus MA, Mumm R, Mueller MJ, van Loon JJA & Dicke M (2009) Jasmonic acid-induced volatiles of *Brassica oleracea* attract parasitoids: effects of time and dose, and comparison with induction by herbivores. *Journal of Experimental Botany*, pp 1-13

Celli G & Maini S (1988) *Lotta biologica integrata in agricoltura*. Cestaat, Roma: 196 pp.

Cerdá X, Dejean A (2011) Predation by ants on arthropods and other animals. In: Polidori C. (ed): *Predation in the Hymenoptera: an evolutionary perspective*, Transworld Research Network, Kerala, India. pp: 39-78.

Choate B & Drummond F (2011) Ants as biological control agents in agricultural cropping systems. *Terrestrial Arthropod Reviews* Volume 4, Issue 2: 157 – 180

Choh Y, Takabayashi J. (2006) Herbivore-induced extrafloral nectar production in lima bean plants enhanced by previous exposure to volatiles from infested conspecifics. *Journal of Chemical Ecology* 32: 2073-2077.

Chong CS, D'Alberto CF, Thomson LJ and Hoffmann AA (2010) Influence of native ants on arthropod communities in a vineyard. *Agricultural and Forest Entomology* 12: 223–232

Coley PD, Bryant JP, & Chapin FS, (1985) Resource availability and plant antiherbivore defense. *Science*, 230 (4728): 895–899.

Del-Claro K & Oliveira PS (1996) Honeydew flicking by treehoppers provides cues to potential tending ants. *Animal Behaviour* 51: 1071–1075

- Detrain C, Prieur J (2014) Sensitivity and feeding efficiency of the black garden ant *Lasius niger* to sugar resources. *Journal of Insect Physiology* 64: 74-80.
- Dike M (1999) Evolution of induced indirect defence of plants, in: *The ecology and evolution of inducible defenses* 4: 62-88
- Dicke M. & Baldwin I.T. (2009). The evolutionary context for herbivore-induced plant volatiles: beyond the 'cry for help'. *Trends in Plant Science*. 15: 167–175.
- Dicke M, de Boer JG, Höfte M & and Rocha-Granados MC (2003) Mixed blends of herbivore-induced plant volatiles and foraging success of carnivorous arthropods. *OIKOS* 101: 38–48
- Dicke, M., 2009. Chemical ecology of host-plant selection by herbivorous arthropods: a multitrophic perspective. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28: 601-617.
- Dicke, M., and van Loon, J.J.A., 2000. Multitrophic effects of herbivore-induced plant volatiles in an evolutionary context. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 97: 237-249.
- Dike M, Van Loon JJA & Soler R (2009) Chemical complexity of volatiles from plants induced by multiple attack *Nature Chemical Biology* 5: 317 - 324
- Dixon AFG, (1998) *Aphid ecology*. Chapman & Hall.
- Douglas AE. (2010) *The symbiotic habit*. Princeton: Princeton University Press.
- Eastop VF (1977) *Aphis gossypii* Glov. In Kranz, J., Schmutterer, H., and Koch, W. *Diseases, pests and weeds in tropical crops*. Paul Parey, Berlin and Hamburg: 328-329.
- Eisner T, Hicks K, Eisner M & Robson DS (1978) "Wolf-in-Sheep's-Clothing" Strategy of a Predaceous Insect Larva. *Science*, 199 (4330): 790-794.
- Endo S, & Itino T (2013) Myrmecophilous aphids produce cuticular hydrocarbons that resemble those of their tending ants. *Population Ecology*, 55: 27-34.
- Eubanks MD, Blackwell SA, Parrish CJ, Delamar ZD & Sanders HH (2002) Intraguild Predation of Beneficial Arthropods by Red Imported Fire Ants in Cotton. *Environmental Entomology* 31(6): 1168-1174.

Frank SD (2010) Biological control of arthropod pests using banker plant systems: past progress and future directions. *Biological Control*, 52: 8-16.

Fuller SJ, Chavigny P, Lapchin L, Vanlerberghe-Masutti F (1999) Variation in clonal diversity in glasshouse infestations of the aphid, *Aphis gossypii* Glover in southern France. *Mol. Ecol.*, 8: 1867-77

Gilkeson L (1987) A note on the fecundity of the aphid predator, *Aphidoletes aphidimyza* (Rondani) (Diptera: Cecidiomyiidae). *The Canadian Entomologist*, 119 (12), 1145-1146

Godzińska EJ, Kieruzel M, Korczyńska J (1990) Predation of ants of the genus *Formica* L. (Hymenoptera, Formicidae) on Colorado beetles, *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera, Chrysomelidae). *Memorabilia zoologica*, 44: 47-53

Gosset V, Harmel N, Göbel C, Francis F, Haubruge E, Wathelet JP, du Jardin P, Feussner I & Fauconnier ML (2009) Attacks by a piercing-sucking insect (*Myzus persicae* Sultzer) or a chewing insect (*Leptinotarsa decemlineata* Say) on potato plants (*Solanum tuberosum* L.) induce differential changes in volatile compound release and oxylipin synthesis. *Journal of Experimental Botany*, 60: 1231–1240.

Grasso DA, Mori A & Le Moli F (2007) Difesa cooperativa e coevoluzione ospite/parassita: un caso di studio nel genere *Formica* (Hymenoptera, Formicidae). *Atti Accademia Nazionale Italiana di Entomologia Anno LV*: 85-87

Grasso DA, Pandolfi C, Bazihizina N, Nocentini D, Nepi M and Mancuso S (2015) Extrafloral-nectar-based partner manipulation in plant–ant relationships. *AoB Plant Special Issue: Using Ideas from Behavioural Ecology to Understand Plants* 1-15

Guerrieri E, Sasso R, Digilio MC & Iodice L (2006) Meccanismi di difesa indiretta indotti in pianta dall'attacco di afidi. In *Interazioni insetti-piante: i segnali di allarme delle piante e le risposte dei parassitoidi*. *Atti dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia, Rendiconti anno LIV* 97-110.

Guerrieri E & Digilio MC (2008) Aphid-plant interactions: a review. *Journal of Plant Interactions* 3:4, 223-232

- Hairston NG, Smith FE & Slobodkin LB (1960) Community, structure population control and competition. *American Naturalist* 94 n 879: 421-425
- Hare JD (2011) Ecological Role of Volatiles Produced by Plants in Response to Damage by Herbivorous Insects. *Annual Review of Entomology* 56:161–80
- Hatano E, Kunert G, Michaud JP & Weisser WW (2008) Chemical cues mediating aphid location by natural enemies. *European. Journal of Entomology*, 105: 797–806, 2008
- Heil M. (2008) Indirect defence via tritrophic interactions. *New Phytologist* 178: 41-61.
- Heil M (2014). Herbivore-induced plant volatiles: targets, perception and unanswered questions. *New Phytologist* 204: 297–306
- Heil M (2015) Extrafloral Nectar at the Plant-Insect Interface: A Spotlight on Chemical Ecology, Phenotypic Plasticity, and Food Webs. *Annual Review of Entomology* 60:213–32
- Heil M & Ton J (2008) Long-distance signalling in plant defence. *Trends in Plant Science* Vol.13 n.6:264-272.
- Heil M, Silva Bueno JC. (2007) Within-plant signaling by volatiles leads to induction and priming of an indirect plant defense in nature. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 104: 5467-5472.
- Hölldobler B & Wilson EO (1990) *The ants*. Cambridge, Harvard University Press.
- Hölldobler B, Wilson EO. (2009) *The Superorganism: The Beauty, Elegance, and Strangeness of Insect Societies*. New York: Norton & Co. Incorporated.
- Hunter MD & Price PW (1992) Playing chutes and ladders: heterogeneity and the relative roles of bottom-up and top-down forces in natural communities. *Ecology*, 73: 724-732.
- Huxley CR. (1991) Ants and plants: a diversity of interactions. In: Huxley CR, Cutler DF, eds. *Ant-Plant Interactions*. Oxford: Oxford University Press, 1-11.
- Inui Y & Itioka T (2007) Species-specific Leaf Volatile Compounds of Obligate *Macaranga* Myrmecophytes and Host-specific Aggressiveness of Symbiotic *Crematogaster* Ants. *Journal of Chemical Ecology* 33:2054–2063

Janssen A, Pallini A, Venzon M, & Sabelis MW (1998) Review Behaviour and indirect interactions in food webs of plant-inhabiting arthropods. *Experimental and Applied Acarology*, 22 (9): 497-521.

Janssen A, & Sabelis MW (2004) Food Web Interactions and Ecosystem Processes. *Ecological Studies Volume 173*: 175-191.

Kaplan I & Eubanks MD (2002) Disruption of Cotton Aphid (Homoptera: Aphididae)—Natural Enemy Dynamics by Red Imported Fire Ants (Hymenoptera: Formicidae). *Environmental Entomology* 31(6): 1175-1183

Kappers IF, Hoogerbrugge H, Bouwmeester HJ & Dicke M (2011) Variation in Herbivory-induced Volatiles among Cucumber (*Cucumis sativus* L.) Varieties has Consequences for the Attraction of Carnivorous Natural Enemies. *Journal of Chemical Ecology* 37: 150–160

Kost C, Heil M. (2006) Herbivore-induced plant volatiles induce an indirect defence in neighbouring plants. *Journal of Ecology* 94: 619-628.

Kost C & Heil M (2008) The Defensive Role of Volatile Emission and Extrafloral Nectar Secretion for Lima Bean in Nature. *Journal of Chemical Ecology* 34:2–13

Lang C & Menzel F (2011) *Lasius niger* ants discriminate aphids based on their cuticular hydrocarbons. *Animal Behaviour*, 82: 1245-1254.

Liepert C, & Dettner K (1993) Recognition of aphid parasitoids by honeydew-collecting ants: the role of cuticular lipids in a chemical mimicry systems. *Journal of Chemical Ecology*, 19: 2143– 2153.

Lohman DJ, Liao Q & Pierce NE (2006). Convergence of chemical mimicry in a guild of aphid predators. *Ecological Entomology*, 31: 41-51.

Lucas E., Brodeur J., 2001. A fox in sheep's clothing: furtive predators benefit from the communal defense of their prey. *Ecology*, 82(11): 3246-3250. Ecological Society of America

Lucas E & Brodeur J (1999) Oviposition site selection by the predatory midge *Aphidoletes aphidimyza* (Diptera: Cecidomyiidae). *Population Ecology*, 28 (4): 622-627.

- Marazzi B, Bronstein JL, Koptur S. (2013) The diversity, ecology and evolution of extrafloral nectaries: current perspectives and future challenges. *Annals of Botany* 111: 1243-1250.
- Markkula M, Tiitanen K, Hamalainen M & Forsberg A (1979) The aphid *midge* *Aphidoletes aphidimyza* (Diptera, Cecidomyiidae) and its use in biological control of aphids. *Annales Entomologici Fennici*, 45: 89-98.
- Martin B, Rahbé Y & Fereres A (2003) Blockage of stylet tips as the mechanism of resistance to virus transmission by *Aphis gossypii* in melon lines bearing the Vat gene. *Ann. Appl. Biol.*, 142: 245-250
- Mayer V, Schaber D, Hadacek F (2008) Volatiles of myrmecophytic *Piper* plants signal stem issue damage to inhabiting *Pheidole* ant-partners. *Journal of Ecology* 96: 962-970.
- Messelink GJ, Bloemhard CMJ, Sabelis MW & Janssen A (2013) Biological control of aphids in the presence of thrips and their enemies. *BioControl* 58: 45-55.
- Morlacchi P (2010) Interazioni multitrofiche tra popolazioni in sistemi di colture officinali: *Coccinella septempunctata* Linneus e *Macrosiphoniella millefolii* DeGeer su *Achillea collina* Becker. Tesi di Dottorato in Entomologia Agraria Ciclo XXII. Università di Bologna
- Morgan ED (2009) Trail pheromones of ants. *Physiological Entomology* 34: 1–17
- Mumm R & Dicke M (2009) Variation in natural plant products and the attraction of bodyguards involved in indirect plant defense. *Canadian Journal of Zoology* 88(7): 628-667
- Nault LR, Montgomery ME & Bowers WS (1976) Ant-aphid association: role of aphid alarm pheromone *Science* Vol. 192 no. 4246 pp. 1349-1351
- Ness J, Mooney K, Lach L. (2010) Ants as mutualists. In: Lach L, Parr CL, Abbott KL, eds. *Ant ecology*. New York: Oxford University Press, 97-114.
- Novgorodova TA & Gavrilyuk AV (2012) The degree of protection different ants (Hymenoptera: Formicidae) provide aphids (Hemiptera: Aphididae) against aphidophages. *European Journal of Entomology* 109: 187–196.
- Ode PJ (2006) Plant chemistry and natural enemy fitness: Effects on Herbivore and Natural Enemy Interactions *Annual Review of Entomology*, 51: 163-185

- Odum EP & Barrett GW (2007) Fondamenti di ecologia. Piccin, III edizione italiana, 594 pp.
- Offenberg J (2015) Ants as tools in sustainable agriculture. *Journal of Applied Ecology*, 52: 1197–1205.
- Pare' PW & Tumlinson JH (1999) Plant Volatiles as a Defense against Insect Herbivores. *Plant Physiology*, 121: 325–331
- Pasqua G, Abbate G & Forni C (2008). *Botanica generale e diversità vegetale*. Piccin, 608 pp
- Pavan M (1959) Attività italiana per la lotta biologica con formiche del gruppo *Formica rufa* contro gli insetti dannosi alle foreste. Ministero dell'Agricoltura e delle Foreste, Collana verde, 4: 1-80.
- Philpott SM, Perfecto I, Armbrrecht I, Parr CL (2010) Ant diversity and function in disturbed and changing habitats. In: Lach L, Parr C, Abbott K (eds) *Ant ecology*. Oxford University Press, Oxford, 137–156
- Poelman EH (2015) From induced resistance to defence in plant-insect interactions. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 157: 11–17
- Polis GA (1994) Food webs, trophic cascades and community structure. *Australian Journal of Ecology*, 19: 121-136.
- Polis GA & Strong DR (1996) Food web complexity and community dynamics. *American Naturalist*, 147 (5): 813-846.
- Punttila P, Niemelä P & Karhu K (2004) The impact of wood ants (Hymenoptera: Formicidae) on the structure of invertebrate community on mountain birch (*Betula pubescens* ssp. *czerepanovii*). *Annales Zoologici Fennici*, Vol. 41, No. 2 pp. 429-446
- Rabasse JM & van Steenis MJ (1999) Biological control of aphids In Albajes R, Gullino L, van Lenteren JC & Elad Y *Integrated Pest and Disease Management in Greenhouse Crops*, pp 235-243
- Rasekh A, Michaud JP, Kharazi-Pakdel A & Allahyari H (2010) Ant mimicry by an aphid parasitoid, *Lysiphlebus fabarum*. *Journal of Insect Science*: Vol. 10 (126): 1-14

- Rasmann S, Köllner TG, Degenhardt J, Hiltbold I, Toepfer S, Kuhlmann U, Gershenzon J & Turlings TCJ (2005) Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. *Nature* 434, 732-737
- Rasmann S, Buri A, Gallot-Lavall M, Joaquim J, Purcell J & Pellissier L (2014) Differential allocation and deployment of direct and indirect defences by *Vicia sepium* along elevation gradients. *Journal of Ecology*, 102: 930–938
- Rico-Grey V, Oliveira PS. (2007) The ecology and evolution of ant-plant interactions. Chicago: The University of Chicago Press.
- Rosumek FB, Silveira FAO, Neves FD, Barbosa NPD, Diniz L, Oki Y, Pezzini F, Fernandes GW, Cornelissen T. (2009) Ants on plants: a meta-analysis of the role of ants as plant biotic defenses. *Oecologia* 160:537–549
- Satar S, Kersting U & Uygun N (2005). Effect of temperature on development and fecundity of *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae) on cucumber. *Journal of Pest Science*, 78 (3): 133-137.
- Schatz B, Hossaert-McKey M (2010) Ants use odour cues to exploit fig–fig wasp interactions. *Acta Oecologia*, 36: 107–113.
- Schirmer S, Sengonca C & Blaeser P (2008) Influence of abiotic factors on some biological and ecological characteristics of the aphid parasitoid *Aphelinus asychis* (Hymenoptera: Aphelinidae) parasitizing *Aphis gossypii* (Sternorrhyncha: Aphididae). *European Journal of Entomology*, 105: 121-129
- Schoonhoven L.M., Jermy T & van Loon JJA (1998) Plant chemistry: endless variety. *Insect-Plant Biology*. Chapman & Hall, London, UK
- Schoonhoven LM, Van Loon JJA & Dicke M (2005) *Insect-plant biology*. 2<sup>nd</sup> edition. Oxford University Press, Oxford
- Skinner GJ (1980). The feeding habits of the wood-ant, *Formica rufa* (Hymenoptera: Formicidae) in limestone woodland in north-west England. *Journal of Animal Ecology* 49: 417-433.

Smaghe G, Mommaerts V, Hokkanen H, Menzler-Hokkanen I (2012) Multitrophic interactions: the entomovector technology. In: Smaghe G, Diaz I (eds): *Arthropod-Plant Interactions. Novel Insight and Approached for IPM*, Springer, pp 127-157.

Speight MR, Hunter MD, Watt AD (2008) *Ecology of Insects: Concepts and Applications*. Wiley-Blackwell.

Stadler B, Dixon AFG (2008) *Mutualism: ants and their insect partners*. Cambridge University Press, New York.

Stadler B, Dixon AFG & Kindlmann P (2002) Relative fitness of aphids: effects of plant quality and ants. *Ecology Letters*, 5: 216–222.

Stam JM, Kroes A, Li Y, Gols R, van Loon JJA, Poelman EH, & Dicke M (2014) Plant Interactions with Multiple Insect Herbivores: From Community to Genes. *Annual Review of Plant Biology*, 65: 6.1–6.25

Stewart-Jones A, Pope TW, Fitzgerald JD & Poppy GM (2008) The effect of ant attendance on the success of rosy apple aphid populations, natural enemy abundance and apple damage in orchards. *Agricultural and Forest Entomology*, 10: 37–43

Styrsky JD & Eubanks MD (2007) Ecological consequences of interactions between ants and honeydew producing insects. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 274, 151–164.

Tremblay E (1999). *Entomologia applicata. Vol. I. Generalità e mezzi di controllo-* Liguori Ed., Napoli: 269 pp.

Tscharntke T & Hawkins BA (2002) *Multitrophic Level Interactions*. Cambridge University Press.

Turlings TCJ, Tumlinson JH & Lewis WJ (1990) Exploitation of Herbivore-Induced Plant Odors by Host-Seeking Parasitic Wasps. *Science*, Vol. 250, Issue 4985, pp. 1251-1253

Van Lenteren (2006) Phytophagous insects in a multitrophic network. In *Interazioni insetti-piante: i segnali di allarme delle piante e le risposte dei parassitoidi*. Atti dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia, Rendiconti anno LIV 65-87.

- Van Leneren JC, Schettino M, Isidoro N, Romani R, & van Schelt J (2002) Morphology of putative female sex pheromone glands and mating behaviour in *Aphidoletes aphidimyza*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 102 (2): 199–209
- Van Leneren JC, & Schettino M (2003) Kinky sex and suicidal mating behaviour in *Aphidoletes aphidimyza* *Entomologische Berichten*, 63(6): 143-146
- Van Loon JJA, De Boer JG & Dicke M (2000) Parasitoid-plant mutualism: parasitoid attack of herbivore increases plant reproduction. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 97: 219-227.
- Van Steenis, M.J., and El-Khawass, K.A.M.H., 1995. Life history of *Aphis gossypii* on cucumber: influence of temperature, host plant and parasitism. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 76: 121–131.
- Van Wilgenburg E, Felden A, Choe D-H, Sulc R, Luo J, Shea KJ, Elgar M A, Tsutsui ND (2012) Learning and discrimination of cuticular hydrocarbons in a social insect. *Biological Letters*, 8: 17–20.
- Verheggen F, Diez L, Sablon L, Fischer C, Bartram S, Haubruge E and, Detrain C (2012) Aphid Alarm Pheromone as a Cue for Ants to Locate Aphid Partners. *PlosOne*, 7 (8): e41841
- Vet LEM and Dike M (1992) Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context. *Annual Review of Entomology*, 37: 341-372.
- Vittecoq M, Djieto-Lordon C, Buatois B, Dormont L, McKey D, Blatrix R. (2011) The evolution of communication in two ant-plant mutualisms. *Evolutionary Biology*, 38: 360-369.
- Völkl W, Woodring J, Fischer M, Lorenz MW & Hoffmann KH (1999) Ant-aphid mutualisms: the impact of honeydew production and honeydew sugar composition on ant preferences. *Oecologia*, 118:483-491.
- Warren RJ, Giladi I. (2014) Ant-mediated seed dispersal: A few ant species (Hymenoptera: Formicidae) benefit many plants. *Myrmecological News*, 20: 129-140.
- Way MJ & Khoo KC (1992) Role of ants in pest management. *Annual Review of Entomology*, 37:479-503.

Watt M & Hales DF (1996). Dwarf Phenotype of the Cotton Aphid, *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae). *Australian Journal of Entomology*, 35: 153-159.

Weisser WW, Siemann E (2004) The Various Effects of Insects on Ecosystem Functioning. In: Weisser WW, Siemann E (eds): *Insects and Ecosystem Function*, pp 3-24.

## APPENDICE A

Elenco delle sostanze volatili emesse da *C. sativus*.

Legenda:

H = Pianta non infestata

G = Pianta infestata con *A. gossypii*

G + B = Pianta infestata con *A. gossypii* e *M. brassicae*

B = Pianta infestata con *M. brassicae*

Elenco delle sostanze volatili emesse da *S. tuberosum*

Legenda:

H = Pianta non infestata

G = Pianta infestata con *A. gossypii*

G + C = Pianta infestata con *A. gossypii* e *C. chalcites*

C = Pianta infestata con *C. chalcites*

## Risultati air entrainment piante di cetriolo (n8), in ordine di Tempo di Ritenzione

		1	2	3	4	5	6	7
		3-Methylbutanal 3.02	2-Methylpropanal, O-Methyloxime- 3.31	3-Pentanone 3.44	2-Ethylfuran 3.48	Propyl acetate 3.70	2-Methylbutanenitrile 3.86	3-Methylbutanenitrile 3.91
1	H	NF	1539806,097	153806,2684	151081,4138	583494,8395	5839261,675	NF
2	H	NF	359769,4735	119323,4014	300486,5785	242555,6383	6662786,924	NF
3	H	1121463,269	874755,5073	221390,146	328677,3904	430520,3262	6801718,105	306653,7092
4	H	NF	504571,5166	522859,5174	122823,9473	550865,6048	2017672,136	169628,9942
5	H	NF	932020,1251	164624,6334	161608,5696	345811,5329	4745032,048	176568,66
6	H	NF	271185,0064	652854,3943	136123,9763	228703,4293	3585900,109	398190,9583
7	H	NF	324157,1855	465753,8218	144278,8105	173960,9158	1735491,588	230646,5256
8	H	NF	892572,2968	90075,96325	87758,03044	185319,28	1949943,484	122431,4996
9	G	1232838,149	1520154,303	2552100,472	252558,0352	537848,8791	9708377,867	664183,1459
10	G	NF	739354,2504	4048130,157	980017,914	600010,1049	8571009,204	228403,8694
11	G	NF	479247,1872	131592,1505	501975,4934	546407,6896	10385189,94	195922,5163
12	G	NF	416262,3583	1294336,022	1161438,216	389865,1717	6411205,276	384119,8778
13	G	490545,1887	835579,8965	173461,2647	650604,5436	539408,5781	5103386,024	302516,8709
14	G	230919,639	225502,4388	377310,9672	248507,0052	193719,2539	9046673,978	278707,5972
15	G	NF	626222,0469	1223617,202	95881,75855	148504,7256	6003200,457	150807,4361
16	G	NF	706852,2927	2034615,657	351366,869	345081,4688	14184108,2	212152,4818
17	G+B	4415782,491	1842509,281	2127526,463	2881751,162	2782787,646	18344004,89	12077640,94
18	G+B	12739118,17	2432227,71	603677,7648	1725407,671	4638764,125	25946844,06	29803667,18
19	G+B	39047877,87	2816102,645	1397140,285	6241412,374	14005694,92	39115443,82	71251203,3
20	G+B	10778474,94	2026871,619	7300433,218	5246528,963	1399729,047	34122768,78	25903606,43
21	G+B	14052506,17	4590440,15	799672,537	3736556,855	1535489,619	29445007,67	30291172,07
22	G+B	6298464,389	7137338,697	1055160,692	1627508,875	9973374,148	12279557,39	23616784,1
23	G+B	7215846,719	1061754,044	1059749,648	2304291,931	734787,8326	31935788,72	20313121,93
24	G+B	2519216,585	466381,8928	2381746,791	873212,4238	734417,7787	13765602,61	8489914,236
25	B	5918279,551	6268798,525	2232369,736	3399235,66	3961763,737	22655841,46	18080267,83
26	B	17206475,25	8962120,755	1887079,228	6005990,735	9199335,807	19918455,85	36845399,01
27	B	12620892,6	12682043,2	2215841,54	3413324,327	4078523,399	34377037,86	25005203,3
28	B	5452768,67	2804299,848	426042,2816	2031333,572	3012107,378	40234054,62	17358137,07
29	B	29515030,03	9351996,652	2116892,005	2110729,58	1421675,416	13150019,48	67912889,08
30	B	5252811,694	1028001,72	857880,2436	406229,3432	2065373,652	17806709,45	15130224,41
31	B	10846016,89	1278935,923	2106564,365	1477373,265	1441212,967	16255420,28	28558358,75
32	B	11793069,5	1957567,325	3819050,294	1173344,803	2143419,103	21412113,91	13019429,88

		8	9	10	11	12	13	14
		3-Methyl-1-butanol 3.94	2-Methylpropanal oxime 4.43	2-Methylbutanal, O-methylxime- 4.86	(E)-2-Hexenal 6.35	(Z)-3-Hexen-1-ol 6.47	(Z)-3-Methylbutanal oxime 6.95	Isoamyl acetate 6.96
1	H	311472,6218	182923,6954	23849535,17	157184,2976	728436,6575	NF	332806,2057
2	H	260220,0423	207779,0597	2034178,699	104248,5945	NF	NF	491682,2559
3	H	173789,7712	260780,4476	3690047,525	155591,1874	2065306,795	58004,40965	207733,7703
4	H	146907,0272	69836,08058	3023192,608	86699,28222	611516,9212	39583,85269	120605,7307
5	H	670843,7755	317992,4661	5699079,957	100553,2002	644991,1502	36562,29606	172764,9541
6	H	391069,773	197397,0029	3071934,23	49732,41274	587107,9236	244950,1369	168617,4166
7	H	540555,2664	84041,86679	2148216,81	57178,97254	409550,6613	57506,60115	129597,0916
8	H	130939,435	97360,53575	4436083,112	NF	202726,8993	49655,41982	90006,35822
9	G	608080,097	338536,493	28654338,56	188878,1129	2085675,873	514275,8114	515203,4082
10	G	1604303,976	262617,3736	9746416,72	255925,7235	1272356,306	41234,76142	643338,2706
11	G	325861,1028	297195,0132	3525053,731	91015,44012	123311,4341	37729,94132	280040,3647
12	G	378170,4811	236624,921	4052805,975	106806,5925	858198,8016	307619,6775	287245,8629
13	G	321600,1654	198057,1148	4131002,498	176211,8172	380239,4996	60499,85438	192413,6793
14	G	247644,6207	428036,1539	2187060,012	135970,7049	256500,9464	135214,8947	180357,4749
15	G	252444,9669	239153,6879	4054537,872	113475,0569	329659,6856	80915,42691	103940,1073
16	G	197979,9988	760658,5063	3935357,948	149004,9772	777006,0971	83477,48536	111097,7185
17	G+B	11111747,28	2919707,196	19617056,17	4962029,366	46687779,13	149728585,3	11598004,36
18	G+B	57170838,84	4530171,983	14667072,9	1491670,318	6661123,625	292713222,5	32384393,21
19	G+B	131226235,5	12259126,56	18052620,32	20809322,33	230944775,3	578797119,6	88065424
20	G+B	38984390,87	4602787,217	15260012,99	6183457,44	93683887,27	206718879,1	13010582,53
21	G+B	85190437,36	3009971,248	16967109,48	3130488,507	26284300,96	284290346,1	37506997,12
22	G+B	17472239,78	1166817,786	20428278,76	4387371,403	45408758,91	178378913,3	20357900,46
23	G+B	25154753,96	2936531,85	10559007,09	3233326,254	76919197,98	132673203	5494811,924
24	G+B	5680085,427	1592695,001	5827644,383	1011994,786	14559561,28	62619562,52	2747156,209
25	B	27456044,99	3601208,693	30360445,01	4608005,659	33374526,73	296953318,9	18842033,69
26	B	51066015,64	4306698,363	28031072,12	13041538,16	158035628,8	367296532,1	44406293,25
27	B	30601740,06	5282565,122	44381277,31	9016126,276	99711071,37	225636226,6	16607620,09
28	B	22823718,84	5824717,93	17940799,42	835561,3283	7606895,336	158854368,4	20185621,15
29	B	98823534,08	3053526,54	23511836,13	3777485,576	25725104,42	588270403,1	56091488,09
30	B	8983662,75	1517378,876	10875989,53	510904,3367	9204934,909	129806080,3	10953238,53
31	B	41342376,65	2650939,979	9465086,501	2309835,124	22591789,64	270386708,1	26448497,22
32	B	9923903,835	2162989,096	12748790,87	1240817,524	20461271,07	82449244,96	9970673,744

		15	16	17	18	19	20	21	22
		(E)-3-Methylbutanal oxime 7.37	(Z)-2-Penten-1-ol, acetate 7.88	Camphene 8.72	Sabinene 9.35	(Z)-1,5-Octadien-3-ol 9.41	beta-Pinene 9.43	beta-Myrcene 9.82	6-Methyl-5-hepten-2-ol 9.94
1	H	NF	NF	316617,0122	2125153,792	NF	106990,0907	553326,7284	541614,4411
2	H	NF	NF	185759,6505	717648,8142	NF	68348,95795	412906,2709	497002,1139
3	H	NF	NF	218525,7183	512746,4799	NF	477720,7244	284887,0814	539535,0047
4	H	NF	34983,27104	142777,5853	690905,474	NF	73853,21697	166204,4746	769597,7282
5	H	NF	20085,23897	77140,96397	836306,6543	NF	64257,65393	155499,4037	783917,8667
6	H	NF	NF	254776,3355	1534078,956	NF	628010,6327	398511,5502	830789,6563
7	H	NF	27846,89498	71574,52305	443631,6532	NF	79976,93793	101569,4041	852381,2535
8	H	NF	NF	120559,3529	726392,631	NF	38355,93265	135259,0667	275523,42
9	G	NF	NF	368840,0694	2085506,73	NF	92277,91391	734979,3159	2182958,18
10	G	NF	NF	239362,2007	2684822,69	NF	120578,7529	573787,4024	323578,1933
11	G	NF	NF	393037,4459	590503,8636	NF	704751,6357	NF	303040,6734
12	G	NF	NF	158658,5357	615203,7338	NF	76309,21951	165128,6813	1608482,778
13	G	NF	NF	73773,31879	613090,351	NF	50410,2379	252480,2141	757359,5699
14	G	NF	NF	323477,4302	1024543,146	NF	375638,4389	230189,7889	534095,5975
15	G	NF	24819,91221	45956,48969	280965,3181	NF	55230,34085	97437,86732	772881,525
16	G	NF	34910,63778	129248,9695	616422,1785	NF	45705,69454	126057,5439	851813,1448
17	G+B	68999981,78	4352934,02	1442344,91	2574467,3	2515948,738	185322,6277	2350281,693	3025546,619
18	G+B	148898190,6	3611279,776	964795,252	1479670,268	4849166,112	205084,4291	4688758,27	4218047,609
19	G+B	253906975,5	27956052,74	349794,6775	NF	NF	NF	37137566,76	981293,6442
20	G+B	110141461,1	1336235,086	660488,8371	1440608,901	4553236,11	132396,8209	5423925,212	4644693,23
21	G+B	147259269,4	756613,0313	1035369,219	1338417,488	1914706,142	NF	4983684,504	2795850,052
22	G+B	86916727,22	1963382,892	601261,8416	1532822,54	1068435,282	526311,5991	1968718,919	2009493,075
23	G+B	67685238,16	636298,7946	274598,7488	2550383,206	2974927,07	162064,8859	9670146,396	3311331,296
24	G+B	23502736,34	649216,4273	257855,9897	737466,6143	748208,3252	44590,2127	2763257,025	1354007,049
25	B	153327885,6	5295622,85	1240574,753	2833805,066	3331377,723	114970,9337	2989242,285	3028341,576
26	B	174479720,8	20047842,47	1671537,504	2721757,948	5730604,145	231769,147	11057642,45	517832,1075
27	B	109847888,1	2236298,966	844143,0542	4307512,969	2870957,677	666767,4389	9009624,45	3286874,471
28	B	72768221,36	1575863,205	597567,3045	5880087,537	3298045,214	344950,017	2242454,503	3007034,098
29	B	253125725	9946041,491	196885,3763	1280411,59	NF	NF	13706082,54	NF
30	B	62707769,68	1461196,472	511365,8736	1244234,832	550461,6755	416786,5239	4807247,596	595044,7577
31	B	141060906,5	2287997,892	263751,1436	783875,088	2086977,813	131785,1579	6903604,826	2755146,259
32	B	37416513,04	1905938,462	1340815,859	2460395,588	1420178,229	205812,5794	4924385,749	1320514,996

		23	24	25	26	27	28	29	30
		(E,E)-2,4-Heptadienal_9.99	1,4-Cyclohexadiene, 3-ethenyl-1,2-dimethyl-_10.16	(Z)-3-Hexen-1-ol, acetate_10.24	3-Carene_10.30	Limonene_10.81	1,8-Cineole_10.91	Benzylalcohol_11.03	(Z)-beta-Ocimene_11.04
1	H	NF	92961,03662	2002324,377	273572,4698	11746594	565974,9869	1240761,046	284890,4834
2	H	NF	46456,53594	675890,8687	254581,6732	4817437,826	184554,8992	1659669,321	117968,0254
3	H	NF	64150,96096	6048840,909	267578,1974	3252070,196	100407,9586	635231,1277	101731,0584
4	H	NF	39176,89629	608361,7267	161707,1643	3477163,747	88378,84102	348342,025	207426,488
5	H	NF	53595,04282	479325,8	124735,7954	4010530,927	362312,9251	231702,499	210550,7674
6	H	NF	77924,52782	743449,4708	1436234,605	5256547,657	244574,4402	343457,914	323171,0515
7	H	NF	38419,83303	365197,4439	173254,2904	1647353,139	73938,57957	264037,0218	241726,2426
8	H	NF	40815,45361	234137,2328	91542,85094	1696562,703	169560,6863	287812,4572	157297,9185
9	G	NF	206051,6283	2230780,788	148948,3092	8739691,756	340790,448	1892660,608	864774,937
10	G	NF	123062,4754	1386882,92	191649,0078	5351490,339	666058,7643	1354121,744	688538,9759
11	G	NF	80589,89576	582787,599	438304,244	4396961,373	191781,549	679941,9894	136472,2699
12	G	NF	62285,15693	1654368,668	143400,9646	3583750,296	106355,9326	307262,3667	298398,9759
13	G	NF	55214,77736	402169,528	178415,9914	4249539,688	315668,9781	772573,386	144790,9311
14	G	NF	66588,64434	254909,5488	855045,389	3533139,213	108527,9241	522693,8945	564279,9703
15	G	NF	18097,51668	406900,4022	123682,6491	1206846,985	66228,69759	170244,5661	104918,0151
16	G	NF	42258,81058	1420781,791	73948,42951	1165096,149	107607,2847	202321,8561	463509,9383
17	G+B	6324947,674	787322,4658	49597996,22	1176779,535	9845476,031	1535399,623	4039365,035	4569678,786
18	G+B	11108555,12	2049667,256	25624768,18	135870,1227	4883167,38	1327913,265	26636524,14	17719760,46
19	G+B	NF	11642378,82	304758410,3	NF	7436487,674	351576,3456	12786591,05	93915382,92
20	G+B	9769790,519	2272506,333	48990923,22	255281,7493	5421154,716	1055366,695	20431639,7	21517481,95
21	G+B	NF	2734427,225	39556960,45	216086,4396	10514646,82	671377,6815	10716185,4	23027237,08
22	G+B	1983187,023	729710,4291	35992802,77	1424745,494	5062268,444	444496,5362	15066340,96	7396548,145
23	G+B	1787357,94	2629701,66	49557431,43	121637,1395	2364126,276	265737,459	5475934,257	31864005,94
24	G+B	950750,0628	948206,5132	16490096,04	102253,5736	1832068,616	567059,9144	798982,012	12035551,22
25	B	6747368,242	1196588,918	59607142,39	290606,6434	6121410,129	1979301,095	12436139,28	12592988,27
26	B	NF	4512657,848	149384196,7	NF	4956881,753	2830668,081	23784950,06	33850034,64
27	B	7640407,257	2906068,866	76905724,13	461872,6744	6764398,135	844281,0686	17091379,09	33716976,83
28	B	9913961,376	915854,8538	19049917,92	163960,8533	5604525,838	1139235,057	4529265,437	8617784,601
29	B	543543,2022	9067995,543	69277705,95	145386,1269	6117236,879	1083706,247	20944166,78	54807631,74
30	B	407415,9872	1594126,431	23377828,45	1106292,946	4699210,255	512630,7576	893195,1273	19106553,77
31	B	2258528,619	2753341,829	49526015,74	250186,4547	2591529,958	388485,6287	2744493,268	27232944,58
32	B	1641874,839	5142825,046	33298603,35	129095,3012	8419539,785	1215382,018	1611731,105	23931301,74

		31	32	33	34	35	36	37
		(E)-beta-Ocimene 11.32	Melonal 11.41	Artemisia alcohol 11.46	Linalooloxide A 11.92	1,3-Cyclohexadiene, 2-methyl-5-(1-methylethenyl)- 12.12	Linalool oxide B 12.31	2-Isopropyl-3-methoxypyrazine 12.47
1	H	384868,9885	982722,0447	2057137,276	562768,2161	439027,1507	NF	NF
2	H	119703,7881	1182634,614	2014936,14	1497198,832	304524,4902	NF	NF
3	H	126331,4274	1697901,728	1353181,809	430522,3782	277336,8918	NF	NF
4	H	290012,5821	2642966,266	237045,1016	183417,1084	223694,3148	NF	NF
5	H	389110,4038	1738931,332	415844,6739	283166,4737	315614,8856	NF	NF
6	H	557854,8677	997544,8196	517868,1307	728843,1606	118230,1935	NF	NF
7	H	594474,2421	941118,7717	444590,4334	266083,5404	49878,94846	NF	NF
8	H	359995,8947	614106,2209	423774,232	86100,25289	58015,27768	NF	NF
9	G	1285927,349	936495,1035	1697261,461	759687,8426	546085,151	NF	NF
10	G	836272,5558	1309847,159	1895043,95	892928,4227	562863,914	NF	NF
11	G	96973,76419	1465561,531	1227033,714	560539,7768	322901,9394	NF	NF
12	G	626778,4482	1550840,618	648815,3486	676026,6668	229474,5556	NF	NF
13	G	200821,7097	1098433,469	889463,816	607025,7683	317940,886	NF	NF
14	G	1175778,629	600232,131	631168,1038	5040587,018	62297,23086	NF	NF
15	G	229769,5153	917590,8947	246693,1106	341493,3198	61316,73023	NF	NF
16	G	1155490,926	411189,7675	309358,3414	160576,3118	15847,86824	NF	NF
17	G+B	8733308,604	2365706,791	4593742,796	2148356,308	859365,9677	4507131,098	4390025,484
18	G+B	30039180,46	2671317,604	5392907,007	3556644,231	2706433,792	5917106,312	5049588,426
19	G+B	112114816,3	5432512,88	12406345,59	5218479,757	10544962,94	6112491,426	2247257,328
20	G+B	33094152,28	3749082,639	9710751,935	5017967,211	2910502,928	2573364,21	12009402,23
21	G+B	33396787,83	4083533,292	4482750,798	3340276,716	3349284,466	1814454,45	3090188,015
22	G+B	14100364,64	1828142,715	3186726,388	2960550,342	1034788,337	1983047,916	1743515,654
23	G+B	40861496,35	2358929,561	5944652,904	2811207,167	3472833,721	1582361,981	1171284,747
24	G+B	18980479,37	1250893,864	1167921,482	727228,4876	1305410,89	964116,6237	2903967,554
25	B	21679632,21	1953124,671	6800238,158	2236152,376	1737090,981	4335342,453	3897582,789
26	B	47149539,91	3242412,367	10079101,52	4963477,862	4260494,485	10972589,86	4611398,95
27	B	51383508,65	3012686,15	7319313,818	3853100,532	4175668,715	6448685,374	2797562,916
28	B	15554129,2	2901662,069	3092163,964	1380845,557	1166395,578	2343466,707	4794919,686
29	B	62607069,75	5514605,893	4735899,453	3995003,169	6869875,554	3807329,963	3304265,642
30	B	26782294,91	1568036,525	1590036,73	949682,9767	2629499,711	2927350,584	1059287,173
31	B	38202533,28	2969415,761	3347048,381	3582786,56	3983161,488	3627980,607	1859216,13
32	B	29325913,2	6296133,897	2244018,998	1272173,374	4207950,716	3234490,796	3616277,73

		38	39	40	41	42	43	44
		Linalool 12.62	2,5-Dimethylcyclohexanol 12.84	(E)-DMNT 13.02	1,3-Cyclohexadiene,1-methyl-4-(1-methylethenyl)- 13.18	Alloocimene 13.32	(E,E)-Cosmene 13.34	allo-neo-Ocimene 13.62
1	H	1593276,035	153898,6603	2037882,104	557963,5592	NF	240985,4375	60619,91205
2	H	NF	34528,52274	51615,46525	194122,594	76892,59143	89439,03175	80956,84659
3	H	NF	32278,57505	90647,5959	236517,4853	80845,57504	107698,0133	49302,60471
4	H	364719,5007	36015,35219	192635,5301	221119,374	93537,3442	97228,56487	79862,30474
5	H	368779,5275	38502,14069	623772,8247	204898,9806	87647,84481	103324,3805	43651,14978
6	H	2259632,234	89650,7685	1202796,164	220726,1083	234432,3144	151983,3476	64415,5409
7	H	828290,3145	82883,25893	527261,0661	121313,9409	90995,48016	127150,6472	33861,13678
8	H	364701,6089	37303,66574	402311,025	136366,4723	70337,19871	87260,43929	35245,80326
9	G	845417,8143	178999,9321	801157,6465	479416,4768	399608,3014	682506,5421	320165,9968
10	G	1511026,394	82861,00644	1562828,836	292789,1392	219653,4244	347622,9213	102667,0781
11	G	307287,6566	46817,83097	295010,1289	211823,7247	27490,79731	55749,03448	16895,97553
12	G	NF	47657,41762	378871,3523	124763,1896	143957,7386	145453,9676	65985,63429
13	G	NF	45576,36615	306687,1603	149829,6439	62721,35026	82499,78262	17853,92553
14	G	207647,0222	32886,06642	1095540,997	151608,1038	209741,1301	208242,0752	74976,24575
15	G	198679,5221	47987,85015	596939,0639	102613,8886	41283,50277	58642,51048	20650,51774
16	G	122856,6624	31161,81181	1111263,807	139527,3213	192572,497	175431,2133	55211,74077
17	G+B	23083022,16	1405991,58	20683891,61	2584343,876	2900088,97	3497447,208	1135604,7
18	G+B	29807977,03	1771574,262	26511650,01	9561329,006	9019773,663	9985248,397	1822775,847
19	G+B	47596324,34	1590138,351	34073004,62	32887553,41	40123809,52	33945060,66	10779278,08
20	G+B	20262034,29	1405169,669	26223706,14	10653234,39	12844140,07	10466647,12	3089803,954
21	G+B	14547813,48	538643,1177	13470223,66	10763855,6	12069287,93	12038259,36	2861057,46
22	G+B	11067464,99	202011,6585	17168601,48	4321925,936	3343042,36	4097521,728	675498,2988
23	G+B	16179374,23	749717,2527	22792859,99	13249488,07	14832087,9	12993614,99	3590514,82
24	G+B	7152734,699	446767,5808	10861713,63	4173826,257	7538592,246	5303062,223	1477549,194
25	B	17247864,24	1469680,88	19193841,29	6157821,072	5883823,161	5655724,567	1337943,135
26	B	35267630,54	2037918,003	28408719,72	18217399,99	16574906,73	18797957,67	4069661,459
27	B	34597489,63	1613874,081	50614373,47	16787646,29	17266021,64	16422739,89	3431727,109
28	B	22313148,49	1744559,432	26733477,4	4129137,05	4402849,79	4312714,249	1216944,362
29	B	20722665,92	888406,0175	22623315,26	21560656,3	26307600,83	23202017,95	6604894,609
30	B	11879036,02	342924,2579	11108312,52	9124279,335	9508725,264	9525862,825	2177340,339
31	B	17431594,83	791832,8929	21332627,39	13852253,81	15405719,19	15464456,66	2965473,782
32	B	17387154,73	541910,8686	19576559,11	16162786,03	11019317,49	27563843,83	6479789,324

		45	46	47	48	49	50	51	52
		4-Oxoisophorone 13.71	Methyl salicylate 14.98	(E)-Carveol 15.28	beta-Cyclocitral 15.59	Indole 17.37	(Z)-3-Hexenyl tiglate 17.93	Bicycloelemene 18.30	Megastigma-4,6(E),8(E)-trien 18.38
1	H	411381,2712	2084832,567	NF	NF	NF	NF	NF	NF
2	H	189892,3498	1375124,949	NF	NF	140584,0433	NF	NF	NF
3	H	151167,7903	2362342,808	NF	NF	166129,9184	NF	NF	NF
4	H	148589,8784	1218685,561	NF	NF	NF	NF	NF	NF
5	H	176652,3987	1388075,905	NF	NF	NF	NF	NF	NF
6	H	282563,394	1996163,029	NF	NF	365092,458	NF	NF	NF
7	H	163641,6716	3082642,49	NF	NF	91721,82508	NF	NF	NF
8	H	136903,6665	1433486,634	NF	NF	51441,82649	NF	153121,2447	NF
9	G	437308,0489	5203465,414	NF	NF	696164,7644	NF	1553695,257	NF
10	G	434103,931	1802288,809	NF	NF	129686,4714	NF	NF	NF
11	G	256879,3345	1948118,309	NF	NF	NF	NF	NF	NF
12	G	207950,5013	1312809,913	NF	NF	242868,5699	110927,7231	NF	NF
13	G	287799,8395	3351204,886	NF	NF	NF	NF	NF	NF
14	G	184010,8544	4257424,523	NF	NF	371619,7945	220254,7908	NF	NF
15	G	95388,78251	3765128,238	NF	NF	NF	NF	NF	NF
16	G	121863,3697	1900930,988	NF	NF	194399,5788	90039,99533	NF	NF
17	G+B	838678,6922	29052724,81	545068,065	747392,3889	6616943,374	3805911,502	511603,216	NF
18	G+B	806967,4645	11604724,14	1797787,231	1391131,277	27920747,44	4114296,956	472394,6275	50540,94978
19	G+B	755928,192	11396898,64	14574951,99	992494,4859	47861236,58	9635392,313	114053,1513	192476,0944
20	G+B	865215,8283	8140086,732	2343270,095	1403552,422	42372626,1	12778353,2	NF	49294,86549
21	G+B	588525,9113	11735734,04	2875375,032	800714,7942	44575394,79	2238040,08	77860,85618	90414,93755
22	G+B	482124,5125	5375342,11	661803,7267	267250,4568	9284072,609	880147,5347	NF	18255,76338
23	G+B	393052,716	8968740,429	4787368,076	495489,5232	29068902,28	9835993,593	50104,61259	82985,80558
24	G+B	328949,574	12312047,96	1216961,292	167945,7798	17389937,17	2542609,958	NF	27497,54409
25	B	984591,7994	17888813,08	959925,333	758093,1122	27094384,95	2993565,468	102024,469	26229,4682
26	B	991493,3874	16291045,44	4908035,052	1139481,22	58931935,12	8312466,994	87860,74179	59219,52056
27	B	870810,9025	18364660,24	4102956,065	1025472,4	39710773,7	13670428,34	111355,0187	84206,68198
28	B	689037,2128	18446268,27	897117,717	1259961,219	18592087,56	2533135,024	51469,29956	35641,21241
29	B	503531,0852	15414785,08	8857846,093	601610,81	31114760,57	6131984,314	102484,1453	330838,6701
30	B	384745,9361	2208374,839	2401401,46	113871,7069	15875065,61	242998,3234	NF	32028,43636
31	B	548475,0143	15825620,7	3659376,715	378146,6168	38548270,22	2378586,522	101601,8123	110792,9879
32	B	409800,9888	11623530,11	3787472,038	261940,356	26014094,91	1575031,024	70869,32803	23357,47468

		53	54	55	56	57	58	59	60
		Methyl anthranilate 18.40	alpha-Longipinene 18.63	Clovene 18.81	Cyclosativene 18.98	Limonene dioxide 18.98	alpha-Copaene 19.17	Unknown 19.47	(Z)-Jasmone 19.63
1	H	NF	317699,4071	82799,7229	19073,21376	621665,4114	48656,7784	NF	38109,52645
2	H	NF	86209,25777	180279,0635	14169,88148	294891,177	18743,70268	NF	24507,55895
3	H	NF	196156,4358	NF	NF	331317,2215	19271,90614	NF	318149,1993
4	H	NF	217817,5523	NF	NF	461065,6168	9832,288472	NF	73526,24931
5	H	NF	160845,5386	NF	NF	324330,8898	14565,61789	NF	24199,16289
6	H	NF	148263,9556	NF	NF	388305,834	24016,55497	NF	34943,2772
7	H	NF	136790,1026	NF	NF	612653,3424	10657,48543	NF	NF
8	H	NF	70493,754	81231,47973	9507,671336	409053,9849	16419,84537	NF	17052,51387
9	G	NF	256777,2618	450784,6495	14537,10696	1174542,906	29990,64915	NF	44954,68332
10	G	NF	181129,5227	53684,72224	10562,33871	488861,5995	31246,12339	NF	33259,74969
11	G	NF	225994,5919	NF	5554,360249	266551,4149	15591,48618	NF	20766,14902
12	G	NF	185575,8856	NF	7364,989736	639319,5119	16835,53896	NF	148418,5779
13	G	NF	135501,7229	NF	9550,005091	636019,8647	12502,20345	NF	23832,68652
14	G	NF	67487,23244	42399,26489	9684,953501	492795,7925	15717,90008	NF	16521,36662
15	G	NF	111518,1753	NF	2481,745216	144834,0253	9342,711426	NF	29733,85119
16	G	NF	31004,50477	26940,19381	9538,293291	257408,9222	12884,34854	NF	24671,45731
17	G+B	2244411,458	168117,8162	271673,7236	151510,8691	669693,0619	129641,4205	155511,2699	149620,5427
18	G+B	5638261,128	176248,0938	98343,27817	140092,9982	365516,3774	114529,8288	1021267,337	194329,0893
19	G+B	5534683,899	236334,3712	27443,5239	74442,13734	298617,763	82641,66158	8314153,36	536975,8125
20	G+B	11435232,51	269101,6604	51395,18201	188997,4833	579132,1296	123441,8842	1112711,024	186911,2139
21	G+B	2514880,137	237521,2933	NF	96569,09914	1105521,095	72214,77489	1488689,32	173527,6018
22	G+B	480076,1345	118107,0246	NF	136192,1991	172749,7282	82654,70558	386547,5179	270620,7342
23	G+B	5088827,157	81102,42865	NF	102857,3034	511274,4411	49089,1978	2170856,327	294956,7766
24	G+B	2950429,619	73144,79934	39232,98133	151721,6661	324017,0546	77373,63622	562367,2593	90569,05849
25	B	2297395,326	253997,8948	99699,14821	223948,1362	706643,5808	151149,9202	367491,5187	225625,8764
26	B	3943079,224	234793,9127	45055,39061	294671,7313	431600,8309	158170,7987	3010708,992	658182,412
27	B	4750048,612	256326,1698	413397,9577	177663,0132	486960,0389	105732,7607	2461823,456	730698,3259
28	B	1830247,484	224100,8873	NF	123061,9414	482433,8672	86868,02927	323575,3197	113707,7456
29	B	1928777,251	273898,3116	NF	105832,6324	696779,3154	53922,27984	4436151,248	388714,6113
30	B	1287189,656	66649,19702	44571,30586	193047,5366	111278,513	125066,5587	1484617,108	68775,53838
31	B	4829936,874	174422,7981	35643,94672	148898,3855	441323,6994	88918,96143	2037886,573	370829,6159
32	B	2018186,173	96070,68053	39743,25411	373532,3468	130679,8392	211686,9184	1935199,184	207155,6208

		61	62	63	64	65	66	67
		Unknown 20.06	beta-Caryophyllene 20.14	alpha-Ionone 20.24	2-Naphthol, 1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydro-4a-methyl- 20.28	2-Methylbutyl benzoate 20.42	(E)-beta-Farnesene 20.81	alpha-Caryophyllene 20.86
1	H	NF	55909,44041	54418,88751	NF	188983,4644	NF	64794,51315
2	H	NF	15470,24475	50556,75831	NF	87937,88255	NF	NF
3	H	NF	9930,642832	32305,42869	NF	NF	NF	255134,1293
4	H	NF	NF	22945,84991	NF	50040,59564	NF	NF
5	H	NF	31666,40091	38807,71128	NF	120786,2154	NF	NF
6	H	NF	NF	32511,87864	NF	117124,5112	NF	NF
7	H	NF	25158,25576	25967,41558	NF	152787,9447	NF	NF
8	H	NF	46081,76912	16941,73464	NF	38301,37867	NF	NF
9	G	298862,4943	340836,6468	69459,17727	NF	162532,2902	95978,42459	615486,9677
10	G	125544,0523	159066,9874	97186,71934	NF	291485,5562	25245,8039	162158,203
11	G	NF	7936,640269	48682,07593	NF	84140,65183	19326,463	NF
12	G	NF	28393,06487	52834,28641	NF	119920,1439	15680,28892	NF
13	G	NF	9287,14114	67405,77605	NF	67444,78741	295150,7153	NF
14	G	NF	140980,4911	38950,95372	NF	88612,0455	9076,392603	82618,19547
15	G	NF	35796,53991	15667,9562	NF	86400,11258	13983,19501	26214,15399
16	G	NF	77174,26239	30585,24062	NF	100569,8198	33727,95495	73005,18938
17	G+B	815869,2901	283977,2706	459212,3525	891845,9161	1699624,643	153126,7811	505667,8601
18	G+B	5000042,71	265942,9124	587535,7782	1817484,056	2510158,976	230307,2581	276362,2794
19	G+B	33286718,35	1055549	526201,882	13603129,66	2760020,333	946807,4711	1121426,106
20	G+B	5534379,059	641657,3107	379594,1871	1661050,856	3060190,32	310361,5816	600479,3666
21	G+B	7222348,709	489150,4594	206806,4046	2012547,809	2105624,206	521777,9636	487403,0811
22	G+B	1530851,873	77275,41601	68475,72333	397344,772	894442,3111	133920,0862	45417,88199
23	G+B	10005599,87	486526,4296	127483,5268	3689718,226	1041255,698	375920,2848	496037,6792
24	G+B	2436588,082	375034,9012	110051,1889	672777,6498	1154487,53	152273,699	273245,7227
25	B	1661307,66	334285,7375	455980,3563	878521,5705	1251272,484	155786,1097	302389,8372
26	B	13745478,37	261638,3404	687179,2027	4038290,356	2208129,645	262860,5707	794259,6246
27	B	10861989,46	777510,6194	391937,3616	3595081,82	3887776,967	265005,078	910482,1248
28	B	1407832	379413,7431	337385,0513	545098,2709	1960543,721	114289,1216	310209,5869
29	B	20498496,14	685125,3659	145046,8413	7510724,609	5277671,226	977559,6877	631089,5235
30	B	5455060,5	78760,62005	104307,8403	1643101,256	479272,2954	114230,5217	33997,74274
31	B	9705978,317	379203,955	235973,5972	3454918,249	1871289,982	252600,7622	240710,9729
32	B	6004394,156	237725,8732	177510,5664	1929967,881	1392787,493	101624,5695	189782,4033

		68	69	70	71	72	73	74	75
		alpha-Isomethyl ionone 21.36	alpha-Curcumene 21.38	Cuparene 21.45	beta-Ionone 21.47	(Z,E)-alpha-Farnesene 21.60	(Z)-Nerolidol 21.98	gamma-Cadinene 22.08	Dihydroactinidiolide 22.45
1	H	386364,0283	358674,2284	NF	388574,5694	NF	30823,93176	786496,7089	90725,48223
2	H	225372,7341	159572,6635	NF	652936,4433	101950,4109	19422,79285	203451,1793	88104,32208
3	H	371286,6982	1401917,984	NF	1101300,205	88529,4872	15688,7607	247980,5145	112436,4182
4	H	87200,76856	100129,0348	NF	600814,2429	165339,9491	20731,85122	170803,7063	106211,8077
5	H	233628,847	NF	NF	742900,0066	126342,5696	13033,77905	453992,8774	128173,7222
6	H	84766,90994	127045,3676	49170,01017	455637,2636	515192,8473	11546,8074	357460,6276	154468,7671
7	H	124766,2029	20806,86972	NF	373806,8176	82714,78781	9874,244674	320184,8615	75404,05007
8	H	NF	38286,46244	10240,48751	187806,3323	NF	9927,857055	239380,4391	74265,87882
9	G	1203913,19	103071,3755	NF	645067,3067	186747,4173	32036,42703	672859,6386	96506,34859
10	G	NF	150720,1552	23175,21908	1041296,28	109577,0906	32581,15877	781891,1414	217723,6195
11	G	341242,0658	153145,6479	29767,68658	1200098,299	125653,064	19547,04414	266873,7659	110442,4353
12	G	348835,0005	128344,5716	39767,56932	1429448,664	282973,455	12351,82707	372005,595	167925,4407
13	G	610462,1382	40502,48058	NF	1367859,669	132083,413	13369,19313	274389,0985	188947,5664
14	G	236505,4225	37138,24966	26113,60833	481806,5519	203834,2052	NF	435695,2884	123702,4938
15	G	99444,30794	63501,54269	11893,34512	251045,486	68489,07298	7094,011783	192147,3154	40648,15801
16	G	66392,68277	220730,2903	18032,65892	392450,0823	194929,7785	NF	329585,5636	86708,30733
17	G+B	1053297,399	360598,5884	1277215,628	8478682,7	3388024,325	37153,28744	3056961,704	327174,8618
18	G+B	288143,9582	385179,1279	1033455,852	9016265,152	7009780,559	4279272,89	2341862,785	166735,1985
19	G+B	223541,6223	684937,7935	1916486,811	7378365,852	25781220,94	7264356,966	241307,6614	143527,1471
20	G+B	394200,4181	140489,7757	1754927,911	10123990,3	12426992,29	7422432,09	2983758,994	328436,2759
21	G+B	1061270,829	1023488,473	2065776,195	6275016,634	11312380,92	6471868,608	1165153,249	166729,9946
22	G+B	188444,5913	110098,1689	579387,3922	2912916,045	3866651,526	4279197,649	1219660,425	165793,1262
23	G+B	317955,5025	41639,03071	1048000,862	5170024,096	11535871,5	7144364,42	134863,152	129157,4054
24	G+B	NF	80586,84391	498934,793	2348313,933	4626987,172	3259895,304	998268,6078	105558,328
25	B	3061370,721	340088,9578	762520,4457	9323773,485	6236341,63	6274858,126	3026005,235	280379,8177
26	B	175061,136	2953030,884	1373272,021	13836667,69	7654803,812	5842558,227	1768753,106	326331,9447
27	B	312423,1644	2473638,731	1039954,322	10259677,33	9245398,153	8305456,292	2525587,903	317688,8612
28	B	NF	86156,61086	792570,6539	9532275,84	6299646,132	4105774,639	3704396,042	197986,0982
29	B	569807,5472	172584,1356	2693973,552	5913530,002	34208223,47	5970056,545	238248,2581	217057,2705
30	B	37384,2741	64816,48621	508830,2341	1323780,397	4078657,28	5542684,386	1479019,641	106379,9801
31	B	255720,3211	103114,8532	1258369,148	4218854,289	8463953,252	2505916,851	2880779,088	235097,1444
32	B	57184,06351	805601,619	2751731,689	4329790,203	6698883,969	20807,71841	1774086,9	119280,4038

		76	77	78	79	80	81	82	83
		alpha-Cadinene 22.54	Unknown sesquiterpene 22.58	(E)-Nerolidol 22.98	(Z)-Calamenene 23.06	(Z)-3-Hexen-1-ol, benzoate 23.14	(E,E)-TMTT 23.27	(E)-Calamenene 23.45	Allofarnesene I 23.64
1	H	93061,05027	NF	NF	NF	NF	464205,3218	NF	NF
2	H	42120,28113	NF	NF	NF	NF	45366,30705	NF	NF
3	H	58696,69639	NF	NF	NF	468818,717	99689,95885	NF	29956,34918
4	H	22723,18233	NF	NF	NF	NF	294322,6582	NF	20707,7855
5	H	52736,8025	NF	NF	NF	NF	280411,2503	NF	18981,81817
6	H	39104,44857	NF	NF	NF	NF	358652,385	10428,83675	73512,59848
7	H	32492,66768	NF	NF	NF	NF	198296,5969	NF	17404,62048
8	H	29834,08173	NF	NF	NF	NF	181678,8668	NF	15512,62152
9	G	92623,83695	NF	NF	NF	NF	332358,3749	NF	22203,06904
10	G	125931,3623	NF	NF	NF	NF	451457,8425	NF	18909,68057
11	G	38875,98684	NF	NF	NF	NF	116325,767	NF	21164,61261
12	G	40483,48325	NF	NF	NF	NF	145782,7682	7949,703343	49544,8673
13	G	39282,39527	NF	NF	NF	NF	97543,16221	NF	14741,01735
14	G	44022,43066	NF	NF	NF	NF	418264,1461	6841,61377	29931,67457
15	G	25574,58107	NF	NF	NF	NF	131444,9082	NF	10351,6737
16	G	37129,8827	NF	NF	NF	NF	150917,4973	4725,124366	27532,41068
17	G+B	261132,0041	218047,0606	1909062,222	814221,9609	3107804,647	1427968,587	289970,8797	572342,5274
18	G+B	198683,6112	520219,4435	2065290,707	686287,2226	1838278,136	2189735,145	363353,1414	1002743,513
19	G+B	175866,5561	1291447,425	1340526,535	1864044,108	4209520,524	2233383,719	1014838,058	2941391,305
20	G+B	247857,2613	478627,8842	6434376,981	1506049,005	6461363,965	2839763,309	665717,5768	2014721,582
21	G+B	139727,7031	547601,8643	898375,588	2046115,393	1803977,808	1632647,029	966842,395	2049288,456
22	G+B	122314,3096	249002,0209	1495144,667	539811,7091	1211763,476	898511,9106	233717,8998	518488,5647
23	G+B	208112,9214	741284,6974	968631,1497	923562,1587	1969432,852	1257601,288	514461,9145	1493740,714
24	G+B	95913,79471	522538,0845	1242632,423	483637,4998	1898833,375	1221775,417	243830,1027	874346,7052
25	B	268826,6078	476599,3578	11251669,17	574467,4829	5512492,469	2847955,923	198018,9066	714880,4172
26	B	192780,2498	587041,7179	4352045,188	1100360,551	7154298,283	2327441,425	578342,9935	1393516,815
27	B	271108,55	352034,8846	4964987,748	966047,4009	10820466,3	3568832,996	524590,5625	1462705,277
28	B	273450,4337	475643,6911	956092,3286	643276,2148	823632,4994	3050428,385	270258,8021	1050328,175
29	B	141731,878	2440474,553	1878494,453	3190095,759	3291522,875	2033871,84	1521381,852	4139967,121
30	B	133532,9475	636431,6842	1275688,329	534406,7537	757511,8922	1415836,33	266749,0877	690471,187
31	B	246632,3666	849260,6847	2906665,474	1173119,031	2995791,192	2771085,311	680244,6683	1467280,306
32	B	286090,5777	157877,0665	829107,5497	1494541,08	2137638,118	599696,6409	697265,016	1738408,22

		84	85	86	87	88	89	90	91
		(E)-Bergamota-2,12-dien-14-al 24.08	Allofarnesene II 24.10	T-Cadinol 24.56	(Z)-Methyl jasmonate 24.63	Unknown sesquiterpene 24.69	(Z)-Methyl dihydrojasmonate 24.74	Unknown sesquiterpene 25.54	4-Acetyl-alpha-cedrene 26.95
1	H	NF	7436,071867	69229,7908	NF	NF	855762,8953	NF	336626,8013
2	H	NF	11104,27453	NF	NF	NF	199411,1363	NF	160557,0677
3	H	NF	30340,47401	NF	NF	NF	264937,2459	NF	286356,0019
4	H	NF	15028,06835	34210,48197	30540,38525	NF	211947,4904	NF	261955,6078
5	H	NF	9934,369034	44737,86158	10904,66889	NF	248290,6672	NF	244121,264
6	H	NF	38736,7736	27135,83743	13130,79745	NF	428807,6332	NF	339471,5157
7	H	NF	8989,584729	46640,87574	9503,759327	NF	361107,9157	NF	242155,4789
8	H	NF	6584,580595	33762,08631	12046,94816	NF	306626,5898	NF	292518,695
9	G	NF	16797,99339	71217,39153	NF	NF	827672,8959	NF	576505,6537
10	G	NF	5739,452099	62899,37872	13825,83493	NF	639998,4407	NF	399819,2679
11	G	NF	7563,373668	NF	NF	NF	245106,105	NF	246074,0672
12	G	40887,81248	16769,57909	39527,77221	25843,63148	NF	231385,8136	NF	364824,3203
13	G	NF	8973,592481	34973,47622	33727,28507	NF	279199,6554	NF	397231,6437
14	G	NF	12686,96548	30535,92641	6539,277308	NF	277099,4943	NF	395913,5777
15	G	NF	4377,274154	19485,53439	NF	NF	210609,6321	NF	177260,1034
16	G	NF	10051,03662	22021,07346	9605,849122	NF	246063,8242	NF	149545,0254
17	G+B	NF	392300,0038	150401,8546	23469,69632	69139,33718	556851,4295	114994,8989	383438,3764
18	G+B	414023,5199	353092,1868	118016,6778	129707,098	252483,439	282936,5917	383066,5428	223070,7944
19	G+B	1447232,33	1088277,116	45064,19717	27793,49039	855413,3013	431957,4085	1258457,778	261180,2617
20	G+B	195881,0227	1069505,255	269392,1221	223805,0992	413304,6103	340996,5718	686231,53	483329,6565
21	G+B	519943,7914	1012054,891	36814,56329	44597,60656	606147,3017	484305,7269	976611,5857	490270,4496
22	G+B	73832,55575	177269,8661	81066,22593	19725,24322	161609,0832	231263,4879	213402,6063	264693,5938
23	G+B	651883,3486	608608,914	26122,43957	17541,14421	387718,9124	295493,0026	681141,4363	296668,6845
24	G+B	351165,0473	376209,9833	130676,6128	30100,24802	170872,663	271343,2364	253222,1025	174682,8402
25	B	625138,4236	276880,1772	190009,7537	84929,14793	150094,7141	566901,0991	204920,3341	454050,7156
26	B	679570,9652	803337,2819	125837,3553	94386,765	486990,0158	336659,5213	657873,341	239237,5201
27	B	309706,4008	527148,8637	138648,807	141715,7828	358318,5673	477820,2001	541718,7041	430186,2682
28	B	320161,9191	524060,715	211895,2098	35843,52663	154595,41	256839,9596	328721,9456	244888,1743
29	B	2414376,489	1622379,519	NF	36567,33213	1170461,871	346059,217	1896977,166	392413,3531
30	B	482287,2867	271806,571	124994,9683	16759,48707	176798,5217	284451,4539	253784,1278	224567,9937
31	B	1039999,586	560574,8765	158860,7168	56938,17375	429796,6504	402808,4968	672999,8543	404815,1355
32	B	NF	1683884,958	115014,7303	7342,848731	120503,7248	161889,167	153412,9036	137060,2345

## Risultati air entrainment piante di patata (n10), in ordine di Tempo di Ritenzione

		1	2	3	4	5	6	7	8
		1-Penten-3-ol_3.28	3-Pentanone_3.43	2-Methylbutanenitrile_3.84	Dimethyl disulfide_4.13	(E)-2-Hexenal_6.38	(Z)-3-Hexen-1-ol_6.47	(Z)-2-Penten-1-ol, acetate_7.81	Tricyclene_8.01
1	H	152548,6212	383928,2805	768546,8105	836841,3339	62056,90994	845443,1966	73401,05005	274925,0635
2	H	828984,7323	194196,643	263915,5431	680264,7363	22634,26896	1952273,141	50398,42426	115556,2102
3	H	251389,5646	NF	400438,2443	354729,0373	NF	104317,9541	5618,778225	53737,05378
4	H	238902,1204	109192,3467	242549,6873	179319,9266	6381,240402	67298,50427	NF	174487,7135
5	H	471174,8144	59348,70736	256302,3498	345020,9411	20360,22486	692622,2722	18039,64154	99537,78796
6	H	383119,6968	64181,14312	102929,2469	526025,6025	28414,23431	231170,682	30331,62504	95119,52433
7	H	435258,4148	42002,52693	353897,062	304484,2143	37287,93221	NF	NF	64856,74238
8	H	298414,1521	66298,23418	443405,4687	441880,3513	8517,034144	72024,47469	24930,79416	87461,77504
9	H	348836,6994	56212,99397	485787,2252	482928,07	11685,72359	63221,92832	28059,55826	84482,74368
10	H	375763,7325	53199,2338	494663,6191	686195,4968	16399,88717	59718,53166	NF	231106,6766
11	G	1353142,225	810439,4297	958360,4892	939316,4041	635098,8618	4810276,01	196650,1073	246600,0153
12	G	789338,4784	109203,4237	255888,781	308704,7508	14855,63903	240674,7459	21795,70821	50143,22621
13	G	909191,2791	210689,1729	350464,3619	439635,4208	16324,48886	241206,5597	31914,91033	84781,31176
14	G	345488,4208	134950,4765	206893,6165	617938,1572	8716,569278	158191,2408	18261,53823	84743,57092
15	G	739478,458	233964,6349	167978,1047	517329,773	19447,17313	610471,6533	27790,97763	126015,5592
16	G	440255,3948	110002,1505	164194,1879	537874,7325	9838,148276	246682,1528	29326,25416	122268,3704
17	G	2841673,903	549649,9274	601471,9453	1230653,176	378614,1946	3327676,175	176832,6753	63472,14119
18	G	854077,8806	352580,7537	788530,872	1028731,1	132662,6469	1465169,955	90239,14044	89252,2205
19	G	868307,7154	244878,2362	520243,2915	921783,8484	NF	362382,1349	53779,35616	97287,54786
20	G	832127,4668	150674,5763	365020,3201	815293,8133	24425,19352	558219,5106	44173,754	64619,45038
21	C	783558,106	323748,0895	221484,8126	273564,784	65518,41413	717639,3454	51680,69118	181076,1168
22	C	1277988,422	230723,7336	355947,6187	495904,7154	11294,60637	260936,0172	45103,63349	157704,9711
23	C	702978,3747	256506,9821	300983,9686	599987,9093	39413,11262	886201,9001	95187,90052	230297,1582
24	C	743664,4102	247590,7099	261146,8936	557933,3602	111329,1114	690922,6009	74128,89629	221170,3133
25	C	823204,8079	149677,0766	243324,4604	435427,0553	16295,25876	235636,5582	28586,84885	146646,9183
26	C	1260412,353	342533,8181	261965,1238	770134,2913	108470,6412	1122374,419	107622,4871	209272,3286
27	C	2075271,259	684850,9338	403556,4836	965239,1269	29502,41612	1059927,787	165896,9286	215317,796
28	C	6750831,737	1169821,497	875778,415	1392721,236	718329,2859	5962567,105	331892,5308	357735,462
29	C	2362785,266	547729,0654	630491,5205	1056702,411	176496,6901	3254099,338	186872,4916	670295,6544
30	C	3481990,911	1043853,292	562856,2892	1845438,292	300104,8184	5267448,734	339526,5805	995257,6832
31	C+G	915492,1493	296168,1176	889042,9827	609683,7908	95914,12916	2289204,803	88461,56805	701283,0783
32	C+G	1919441,949	495582,8571	309262,1766	631352,1777	61748,8161	1093871,748	53592,1628	115078,9609
33	C+G	1066038,819	168653,7787	247458,0077	235711,5432	9938,706062	486780,5441	49505,50847	59001,00594
34	C+G	674131,6062	162817,6924	229858,9092	482289,9213	27018,3201	608940,3413	38016,38828	107560,4653
35	C+G	1201812,794	558955,4272	271422,9134	1297639,199	131582,4206	1815711,183	131806,4755	291358,5135
36	C+G	720143,3627	438451,181	311047,9485	1111060,677	104261,9155	1125146,472	94490,8091	233591,6999
37	C+G	3629354,341	551671,7731	288928,169	708495,5022	90957,91505	833355,8605	128144,7514	346334,5654
38	C+G	2585807,071	496208,2724	285237,1398	872706,7196	29493,96225	2043361,31	159349,7309	333806,2498
39	C+G	3007880,851	823302,798	564780,3687	1014389,736	902047,9616	2824847,423	263088,32	508247,1855
40	C+G	3703049,949	1557878,736	407832,9484	1498387,913	373623,3208	5925478,375	468899,071	869094,4798

		9	10	11	12	13	14	15	16	17
		(Z)-3-Hexen-1-ol, acetate 10.21	(Z)- $\beta$ -Ocimene 11.01	(E)- $\beta$ -Ocimene 11.29	Guaiacol 12.36	Methyl benzoate 12.49	Linalool 12.59	(E)-DMNT 13.00	Alloocimene 13.32	(E,E)-Cosmene 13.34
1	H	2919570,282	2562791,361	10771310,51	481702,7615	590739,5906	3320912,35	10629707,25	1576009,218	2532972,653
2	H	1580017,147	977098,4301	4435531,97	156728,6217	303535,7527	1763971,64	2270479,132	314466,3171	873189,3899
3	H	394991,1324	281106,7498	236259,0815	NF	36901,86565	312336,3836	127738,1814	344530,691	2147048,436
4	H	137333,4508	451726,378	2394918,542	NF	52305,93656	308623,0836	396900,7678	220412,2351	409494,9457
5	H	1544140,123	777356,6901	3969042,567	26488,44543	131267,1921	1066095,199	727030,4103	322615,7624	658645,0895
6	H	454881,5389	723690,6492	2601243,489	70130,90391	120909,7452	1324058,223	503467,8327	265497,8084	467378,6842
7	H	606578,7849	431965,2365	2022801,172	31563,35716	76922,5004	564278,6519	471282,215	181293,154	267188,228
8	H	458098,9771	680166,983	3399509,338	50108,93203	225519,7102	1094600,335	662226,8787	296311,065	546308,7581
9	H	293139,0761	692278,0477	3595389,934	56065,00156	113063,7083	1005566,545	492415,1597	323715,1162	495469,4552
10	H	411752,7275	1535298,182	7504991,587	184165,8905	592693,0803	4604705,721	3527337,442	617254,0645	1014223,027
11	G	4182127,525	645282,6951	3565549,914	1869079,861	688349,3462	1991199,427	12833136,01	299664,0393	931109,8803
12	G	385691,7399	1002400,325	5489520,61	538093,9198	127729,151	697721,2034	878874,1912	497639,768	1007942,868
13	G	623535,9981	1483603,957	7268279,768	102252,6105	223875,9808	1235338,826	1437808,572	733464,4522	1156338,824
14	G	328350,7909	508092,1083	2503557,227	90213,71304	121083,4646	727619,327	811867,7943	224496,0743	395508,7773
15	G	826685,831	293634,5219	1434381,629	306317,3414	87163,42304	474446,139	457711,6339	178620,8598	428734,0367
16	G	1766700,054	1058155,856	4299813,239	79332,54157	182858,2747	966961,7754	523564,5672	471242,3186	641199,2235
17	G	2458087,001	1394176,693	7891896,764	856759,8578	497305,8447	1727569,609	11897282,62	872139,3423	1317253,845
18	G	1841551,67	2947645,144	14437646,21	601799,1496	1171891,239	3108054,837	13214881,54	1422236,656	2370796,946
19	G	704406,0579	1823092,972	9192957,093	420707,3987	407166,2274	2072699,897	3464222,166	944934,4342	1281108,166
20	G	666302,3632	455341,3207	2852771,515	226664,1482	124159,7565	726810,0986	1001195,645	299453,579	406022,8506
21	C	1149073,559	656128,5137	5815834,72	754795,8021	449546,6814	3802067,071	4899471,068	390573,3012	897053,3152
22	C	425460,2859	1456217,235	7478298,729	339918,1989	155069,8624	4616967,923	662660,466	798183,7093	1484558,613
23	C	1029531,503	2469986,438	11701450,08	611598,3829	404873,2715	8565646,957	1938245,545	1239014,612	2079388,078
24	C	941685,9899	1160784,545	5974621,636	209362,4414	214868,3827	1684798,165	761787,9485	607760,2383	913877,7862
25	C	508307,1712	1010155,927	5270152,523	165276,2809	397444,6402	2650404,145	794447,246	425437,4326	803875,0979
26	C	1262927,269	1756876,765	10199402,87	381929,4905	866643,3013	5870035,241	4502634,772	925790,3234	1549297,105
27	C	1505000,433	1250651,961	1376495,371	140825,1747	928214,1849	5182047,109	4510286,117	1179476,624	8231960,497
28	C	3645049,736	3307226,269	17370418,51	6582146,035	1484982,434	19419936,74	3842304,288	1847607,117	2945563,564
29	C	1583599,155	2790668,238	14580317,42	4231011,283	518054,2305	5395158,888	2911081,878	1489654,746	1980515,964
30	C	2788309,916	1981853,42	12149909,37	5853851,925	1319307,804	20653279,8	13187764,36	1426068,89	1626777,676
31	C+G	2019565,925	1910464,241	10230145,03	1115484,819	622838,6809	4759471,303	6447809,676	1110953,324	1900843,433
32	C+G	994789,1037	1923111,916	9444796,277	2641662,414	197299,6701	4828975,258	982661,0336	950253,3135	1759137,461
33	C+G	904673,2953	2122490,969	9691961,931	96543,64286	289413,6579	3263226,205	1581405,162	1014586,436	1951097,496
34	C+G	495269,8403	882569,4222	4766536,774	303703,0102	151567,2224	1635807,391	969427,7044	472278,0463	824829,1441
35	C+G	1883004,622	2349763,606	12322852,81	1021291,722	879486,0016	4010706,171	6014534,212	1294534,825	1963831,267
36	C+G	1185118,101	1848431,949	10139872,43	510228,5694	648947,3324	5366828,452	8812877,034	1199184,462	1506243,526
37	C+G	2032480,383	1738248,124	9773679,358	327875,8701	586237,896	5456403,38	2221009,357	821141,633	1327038,523
38	C+G	1697796,108	676277,8647	776784,271	652411,4312	793867,5013	3895089,987	6673654,822	1283050,985	12731106,67
39	C+G	2466011,61	1880939,84	10286289,47	3906754,151	899340,9943	9782275,702	6491586,666	1011276,526	1538669,979
40	C+G	5032360,145	1109027,343	7659943,397	5665159,416	1679538,787	7666632,518	22580709,27	1024184,498	1223290,979

		18	19	20	21	22	23	24
		allo-neo-Ocimene 13.62	(Z)-3-Hexen-1-ol, isobutyrate 13.68	(Z)-3-Hexenyl butyrate 14.67	Methyl salicylate 14.98	Eucarvone 16.43	(Z)-3-hexenyl tiglate 17.93	Bicycloclemene 18.30
1	H	673681,4925	690721,037	3499252,692	11397399,11	104629,6602	673007,2912	1288514,303
2	H	179331,0003	282776,6147	1495251,864	14191675,28	33588,66136	214655,9	98250,33418
3	H	545709,5281	NF	19997,79199	477835,852	NF	35078,20952	86278,23353
4	H	89308,39549	NF	102282,4639	401193,9809	21372,49172	140823,0055	248197,4457
5	H	129558,3522	NF	92115,79155	2447919,372	30261,38895	553655,5894	123342,6361
6	H	96799,69874	NF	NF	1825874,004	11104,85681	60455,2849	126649,5035
7	H	79953,09032	NF	72509,82649	3759161,013	2375,816688	NF	NF
8	H	113884,4453	NF	66429,48135	5404934,75	20329,8924	160960,7564	86101,94668
9	H	127727,9651	NF	113674,3634	3914105,322	19135,16422	201335,5758	88150,22836
10	H	267980,1315	71096,21618	397798,6089	25480197,54	47948,67625	168189,9912	1047550,844
11	G	143416,2427	474861,9385	4814892,498	21821425,89	25920,37265	2789531,788	1158592,026
12	G	228361,8306	NF	155566,5063	8344601,312	54404,08067	64528,46224	78174,48399
13	G	287185,7629	41489,65195	161466,5709	10684926,61	69930,30689	116933,65	167867,6998
14	G	93616,3159	34624,90888	123989,795	6151823,268	13788,18259	125319,6033	331443,1078
15	G	74670,12187	NF	64689,4624	5151157,36	13950,69562	191236,807	220519,0298
16	G	184868,1734	NF	144229,3091	3825051,227	30381,50233	279499,169	205692,4295
17	G	298783,5415	374947,4082	3778742,365	23404110,48	69009,45782	1964642,214	144216,0374
18	G	537471,6723	360514,8555	1788956,144	30408347,67	151291,3913	1076377,314	234795,8215
19	G	359165,2477	140135,7939	492891,7193	16695055,55	84954,79517	257532,9756	93868,41438
20	G	113117,4224	30269,92561	149105,9955	4697049,047	15295,21461	160429,7156	118060,0245
21	C	210223,5956	311275,7686	2176084,323	5989933,467	35734,58493	472128,4045	970949,3404
22	C	326798,4468	60512,77192	698151,7	1194733,267	70649,69756	166485,0617	288693,4654
23	C	524691,321	302601,839	2574912,639	4027471,157	145631,704	250932,3226	642717,7561
24	C	224729,4612	184420,1277	1387254,436	2946485,902	44953,94452	440338,0106	792304,598
25	C	194562,8076	122588,8541	871826,3802	6636033,811	39461,01407	185778,0319	258510,4365
26	C	349872,1903	179269,1904	3715479,716	18614184,17	90528,99505	425228,6438	713384,6422
27	C	2156053,11	236621,8056	2861224,293	2240295,949	2926,372877	375628,606	533716,8159
28	C	678115,3782	713550,7055	10855865,54	22293242,04	179088,2442	1422687,735	1412134,008
29	C	625717,0047	492423,236	3446539,708	8756323,188	117799,899	750848,8687	1413900,816
30	C	421403,0881	800964,9128	8403840,271	13221180,78	119199,1672	1242973,496	3107921,037
31	C+G	520839,5315	316410,2897	2136411,666	21175327,1	86663,78982	706662,0942	1872313,173
32	C+G	471482,606	129645,5447	1345930,641	9143812,411	72617,41096	231129,0899	448487,0577
33	C+G	426156,296	193280,872	927615,4251	2155544,367	104168,0796	131494,3315	79830,69499
34	C+G	184117,655	103051,4609	650551,9443	5485356,362	43684,50042	169618,0686	326511,5822
35	C+G	504496,1615	443652,4727	2602266,241	24615839,24	171852,9453	779065,8129	807928,7412
36	C+G	362373,8845	266646,4907	1634104,822	17153397,41	99228,23014	587709,22	503248,2043
37	C+G	358970,425	199061,3592	1756791,955	12453778,54	66701,90881	233172,2261	999945,5588
38	C+G	3255337,387	451320,6003	3104920,226	3137099,023	7726,581545	643783,8093	695411,5151
39	C+G	390103,1721	593025,1445	4203083,099	22073077,17	79472,76324	1797063,355	1602357,47
40	C+G	272828,3139	950866,6737	7834771,159	33606780,96	53303,61802	3708218,319	2526365,313

		25	26	27	28	29	30
		alpha-Cubebene 18.57	3-Buten-2-one, 4-(3-cyclohexen-1-yl)- 18.98	alpha-Copaene 19.17	Cyclohexane, 1-ethenyl-1-methyl-2,4-bis(1-methylethenyl)- 19.33	Sesquithujene 19.43	beta-Cubebene 19.47
1	H	2914198,118	84793,49821	3600812,46	303929,8605	1666283,078	255412,4679
2	H	493815,1492	515572,9363	575454,6186	15796,34632	61228,72631	55412,27428
3	H	233239,0688	NF	52513,84557	NF	NF	12572,37872
4	H	885265,7017	102424,6122	169760,0268	NF	NF	114992,7676
5	H	297357,3937	528235,2808	213337,45	NF	NF	45894,46179
6	H	211194,5635	674668,964	186583,956	NF	NF	26253,6213
7	H	131337,0809	552455,017	216249,514	NF	NF	25259,74894
8	H	227749,6641	316589,9504	236282,3785	5881,632761	NF	39649,96611
9	H	268727,5328	283491,8757	208539,8659	13060,68605	NF	43022,10347
10	H	1421055,805	486889,2274	1467291,678	90361,94492	NF	213222,3263
11	G	2318415,179	96558,90509	5754202,228	479678,4451	4579418,729	379811,7118
12	G	164739,7523	343199,4094	149222,1464	8899,142355	296823,5172	22136,78847
13	G	528767,5894	673270,8927	286086,6197	7467,13059	301647,3887	72677,12362
14	G	750281,6658	259317,1956	335045,6047	80771,80113	900600,2547	104252,4334
15	G	670577,1338	194154,4848	331600,25	31193,70967	2601723,732	102567,1428
16	G	634497,6685	492051,9281	266790,0841	70936,24348	716630,2498	100731,1613
17	G	276996,9365	349767,3988	3425158,668	55259,17654	502725,789	51312,40083
18	G	589921,5971	482115,3714	3046547,792	37381,72865	1669158,141	115259,6055
19	G	304575,9446	1025002,882	849819,4699	28192,84962	2993884,484	27093,80658
20	G	206311,9017	261834,4809	553679,2276	21650,65377	2578961,928	30418,34961
21	C	1249404,019	22327,87451	1053372,197	276919,0097	515784,7125	158735,5108
22	C	550922,2739	192978,9663	246693,2436	62286,67773	NF	72183,63259
23	C	1055200,46	300944,8254	692989,3804	193332,1376	NF	161743,2038
24	C	1509424,025	261217,2461	394905,1405	306013,5379	NF	216584,4876
25	C	741519,508	298461,7355	541162,7278	60894,3095	NF	112816,2281
26	C	917599,7832	247593,1427	1637940,87	206385,3897	NF	154405,4296
27	C	1249154,724	NF	1452850,362	69696,42921	244234,3497	65068,28396
28	C	1456628,104	695179,8585	1524393,397	472796,4597	NF	256397,8165
29	C	1830513,177	342902,2685	930878,2295	430208,8594	NF	275598,6873
30	C	3925959,297	323900,0783	3523317,353	870073,4894	NF	512344,0865
31	C+G	2040705,912	119883,6741	1972930,93	558672,4623	1357564,684	302991,4559
32	C+G	751372,0934	408985,0217	361087,7846	123787,607	976962,4152	91335,7949
33	C+G	152945,2279	353128,6616	377690,6696	NF	55876,7151	26069,69311
34	C+G	553616,0635	202321,3967	273981,4386	71501,81974	450249,5537	76925,10689
35	C+G	1578736,638	214612,3828	2172710,904	238465,8902	2119404,484	282962,9241
36	C+G	1407127,567	235225,0085	2740768,792	221888,5479	2500828,5	242203,2541
37	C+G	1359200,482	233679,8028	1137532,053	243038,8366	624162,2922	184258,586
38	C+G	1076649,474	28673,02573	1177117,052	140981,8806	1093327,886	111370,0015
39	C+G	2254235,728	385031,3585	1923443,128	482579,3362	3553193,543	345484,8391
40	C+G	3227322,575	217018,0744	8330326,191	897158,7247	3804738,024	630918,041

		31	32	33	34	35	36	37
		beta-Elemene 19.51	(Z)-Jasmone 19.63	Ylanga-2,4(15)-diene 19.82	alpha-Gurjunene 19.92	beta-Duprezianene 19.99	(E)-beta-Caryophyllene 20.14	gamma-Elemene 20.24
1	H	946798,4965	77115,58846	275097,8294	1054063,883	231782,5626	5608862,593	57254,63759
2	H	117547,6498	141314,6071	54508,02666	196126,9262	71791,51589	1238487,385	33076,10695
3	H	50117,64378	20170,06202	10560,87231	90790,87893	49414,60926	647687,9254	990,2657802
4	H	178507,8357	22465,32485	17599,09918	512587,8228	98442,71269	2867095,719	12600,30274
5	H	96053,93047	94410,28702	19130,1778	151170,0923	71235,52535	1501321,439	18718,04051
6	H	97986,66579	51087,41798	14193,18665	137323,0717	50112,30256	1294331,752	13567,97329
7	H	29139,66901	104303,1929	7696,736052	99765,97877	68315,52271	394923,135	21152,31774
8	H	79265,7219	69243,22577	27879,34716	100582,9609	42026,20455	874837,4279	20425,32893
9	H	103320,1001	34672,22016	16016,73054	179698,7714	44176,56489	1145789,199	22718,55338
10	H	419257,0808	45708,7638	101177,5629	866808,8647	206101,1332	5039545,623	23228,79495
11	G	1451432,479	209853,1395	642449,4354	680248,8139	336853,2172	6759319,816	86466,66812
12	G	52837,71324	91540,50506	14761,99767	48989,74633	134349,1808	802478,5011	33805,03192
13	G	104213,2522	53781,5571	31882,48702	231246,1442	132399,6127	1707254,303	25742,56665
14	G	221268,0637	64213,60061	23649,19009	394092,0411	105584,7646	2666665,635	14245,92172
15	G	194254,0668	44836,17029	34350,9641	403324,3136	138278,3282	2986064,375	22936,18494
16	G	236338,8578	38227,03309	17184,19826	358972,2046	76703,18124	2888970,243	24618,59736
17	G	222826,9319	134674,1619	390574,0808	83867,78323	56569,38444	1196502,743	26128,88299
18	G	298406,4779	150623,1849	321217,6944	227641,7346	88666,60897	2156374,999	26996,20962
19	G	142652,4604	98081,25144	86265,06956	126744,3145	106203,2247	1521013,771	27474,44525
20	G	108848,5795	28079,87511	48315,68332	92746,57439	135401,323	1191011,283	26863,2054
21	C	730928,6231	120440,3141	79095,84534	493427,3657	110587,4568	5475948,608	48908,97718
22	C	202513,9873	169920,8731	28184,30493	244471,7952	129891,7904	3295498,386	25984,49367
23	C	507770,9363	228773,291	83141,73328	474474,3821	258820,1132	6230651,208	43668,99411
24	C	727229,0905	186350,2069	32428,69375	824252,0063	81349,0452	7166843,352	14431,15424
25	C	260768,5865	102149,4293	36066,84291	471421,2898	96064,00951	2904865,701	20759,59724
26	C	589250,1444	278420,8305	144178,5292	472419,4379	124668,1615	5609099,351	18704,21874
27	C	449611,8103	198900,6545	269428,8332	469635,698	62922,67101	4797337,613	10825,49298
28	C	1183373,057	737464,7354	164892,9171	623918,9577	118023,3294	10453752,31	38354,94425
29	C	1090948,437	351946,1391	70382,94812	1024456,554	125747,7245	9943643,992	42307,93716
30	C	2421602,31	848276,3807	202320,5609	2421790,411	246240,2557	17009688,58	29481,42766
31	C+G	1487622,186	214526,0117	164018,4233	984563,2216	225567,215	9591658,284	98242,98951
32	C+G	378559,711	248839,5005	45369,20183	339942,3499	111912,4937	5393414,483	49834,44505
33	C+G	62846,54703	107776,1102	58501,61036	47740,90045	198326,525	1059441,822	20590,81398
34	C+G	257873,0431	84580,92138	30363,87136	211756,3195	120428,9714	2952134,053	12726,92038
35	C+G	706716,3524	155186,852	140876,3166	926399,1443	176842,9645	6745429,278	32958,44629
36	C+G	589500,6378	116550,3572	192504,2019	778262,1966	147170,2205	4910522,677	21446,38635
37	C+G	666384,0901	427660,6336	81243,04693	697618,6794	174512,094	6754869,236	43393,32131
38	C+G	585383,0407	194142,5714	125562,4148	725850,9046	93483,15394	4154723,297	9063,947297
39	C+G	1377525,085	492359,7287	128751,7784	1310490,72	221503,8048	11902803,24	50158,8114
40	C+G	2425024,136	1001043,54	534303,6441	1968143,651	313306,657	15158968,52	26733,09856

		38	39	40	41	42	43	44	45
		beta-Copaene 20.33	(E)-alpha-Bergamotene 20.42	Sesquisabinene 20.56	beta-Barbatene 20.64	beta-Guaiene 20.67	(E)-beta-Farnesene 20.81	alpha-Caryophyllene 20.86	beta-Santalene 20.93
1	H	5145795,896	4110348,978	628115,9983	143945,5777	206451,7775	11405678,89	3020633,395	1354872,88
2	H	609313,0552	255537,8383	34566,3626	183088,4638	NF	2753631,474	636712,9588	126495,6978
3	H	106042,152	131843,0344	2939,81906	553979,568	NF	155674,6721	296633,041	34467,34113
4	H	619386,4224	244301,749	29783,91801	681416,83	NF	5236624,165	1233199,913	59967,60779
5	H	350137,6395	197479,7011	8936,790095	704970,1136	NF	2446090,774	624849,9665	40867,35943
6	H	310981,8647	102170,1129	8444,984982	145804,5072	NF	1995308,328	523571,8996	60316,31732
7	H	244285,4124	157110,8426	3080,341627	768376,8937	NF	506171,779	185401,6284	21666,90141
8	H	319016,0641	172447,3525	26855,68456	103768,5914	NF	2043589,015	370006,3694	111788,6345
9	H	356621,83	235216,2965	29964,14473	105133,5575	NF	2806223,76	568260,0379	136620,6386
10	H	2001542,004	990618,2781	143932,9595	984372,0906	NF	8392017,876	2763293,634	197414,9497
11	G	8376545,434	7013897,618	1689357,088	97334,07756	231539,4182	14303935,49	4393787,943	2177411,088
12	G	243069,0466	224354,5272	131679,2998	755079,5539	NF	1358276,41	342248,6837	69303,08429
13	G	463956,5765	376093,45	150154,5895	806057,3516	NF	2787690,904	722197,9577	99674,13579
14	G	789663,6554	923304,34	494228,0527	312762,2945	34597,91299	3752247,84	1393210,238	174475,9008
15	G	713421,6652	1673654,849	1511577,698	437696,0724	NF	7097502,525	1232580,875	160141,2413
16	G	759373,5259	826163,156	397388,4638	173469,068	NF	6584441,817	1297790,482	236834,937
17	G	2629371,029	637770,5322	328338,764	144355,8026	NF	2318469,096	509131,1167	104522,0091
18	G	2500543,834	1662338,561	1109894,192	230332,2782	NF	6017338,452	1062421,591	238917,9003
19	G	844839,3994	2203298,931	2009100,804	92617,89595	NF	3899760,95	837262,9043	191401,0196
20	G	603867,2259	1843092,972	1662318,974	62881,94063	NF	3221184,802	553108,5458	91728,3765
21	C	2268432,63	2423571,299	241751,1306	77905,41357	66600,06957	8361028,185	3267876,695	1018044,767
22	C	631539,3024	146225,1434	20318,31849	765023,8011	NF	2515863,83	1426464,566	70001,39523
23	C	1715583,464	497352,1873	48768,86851	1863904,112	NF	6278728,362	3126511,321	167108,8003
24	C	2133235,565	1051073,635	94529,52548	473737,5891	86168,99135	10043582,55	4418495,205	437506,8577
25	C	933857,3292	318280,9571	46471,14863	547600,4259	NF	6182844,174	1370385,995	135862,6313
26	C	2410361,794	1099875,161	125122,426	361746,6317	43550,31195	8120133,915	3121078,419	369498,2663
27	C	1386896,779	831233,4219	27159,66339	174282,8963	16142,74716	1388967,204	2022487,105	286980,4053
28	C	3989257,268	2557626,358	234377,1341	244210,0388	66123,88162	13723876,98	6826605,924	1289055,449
29	C	3496881,735	2708711,066	256719,8337	77121,9608	105903,2618	12440562,98	6534421,713	1323011,908
30	C	9937224,745	6734876,657	745911,7099	137808,2104	155492,3032	23082317,34	12605091,67	2920677,131
31	C+G	4326249,39	3004809,574	747456,2054	596042,8486	166535,3863	17157626,39	6502776,696	1250834,296
32	C+G	1217505,646	865236,3379	317371,0395	454123,0689	NF	4308320,782	2597012,344	183254,8845
33	C+G	392583,6753	210534,4074	27651,27102	1588575,608	NF	1365308,339	402033,1444	50433,22287
34	C+G	827326,2989	703200,316	267654,701	622843,9785	NF	4288902,316	1389907,349	246364,8418
35	C+G	3445945,026	4032267,041	1414231,476	372882,3786	62770,26559	11715620,58	3809714,125	1022240,309
36	C+G	3371582,765	3867395,584	1424629,078	112990,535	61908,51038	11226960,89	2576804,005	805947,7675
37	C+G	2628832,099	1647166,287	434661,5622	809837,889	48699,03406	6675046,285	3464194,263	340111,7294
38	C+G	1405900,576	1478698,968	196379,5149	325048,7713	27973,57971	2241445,32	1924721,96	415240,1617
39	C+G	4793605,044	6012576,506	2462600,93	185750,6399	91319,86604	16392032,83	7922048,393	1556605,509
40	C+G	14067597,88	10314722,87	2799172,964	135367,1262	171325,0416	23932484,73	9539127,997	3539035,58

		46	47	48	49	50	51	52
		Bicyclosesquiphellandrene 21.05	(E)-Cadina-1(6),4-diene 21.25	gamma-Muurolene 21.30	alpha-Isomethyl ionone 21.33	alpha-Curcumene 21.38	Germacrene D 21.41	(E)-beta-Bergamotene 21.46
1	H	5035759,338	229767,1975	3191657,03	662169,5029	434313,5668	1306000,765	4779029,966
2	H	819391,8153	33482,18568	476568,3633	413293,9113	51115,34476	346013,4329	499124,5451
3	H	167306,7243	2482,521568	109866,7635	58425,45747	25092,97527	NF	90105,04925
4	H	916498,0857	39833,02358	474786,1107	50270,8136	38978,79365	856792,3174	248182,4934
5	H	478859,0266	12288,8866	197039,6454	173753,2821	57586,38973	467096,7889	128594,8553
6	H	368236,053	8277,282561	172103,5313	660045,6554	20477,32687	400985,1985	207831,6604
7	H	247173,4019	12024,5302	95055,51223	5936521,591	34406,87845	116719,8897	107994,0882
8	H	320938,7058	14936,41604	168679,5999	701432,1536	39897,0138	326364,5536	438060,2886
9	H	414326,9974	7925,826129	185623,0335	336127,518	36501,04227	329354,0343	626599,602
10	H	1749463,691	46364,58601	954726,352	197657,5584	132937,5855	1552012,084	1009667,178
11	G	5280856,873	181832,2077	4629755,431	878032,7912	589873,7374	3026189,25	6647410,34
12	G	335057,201	NF	149017,9443	556552,0214	49379,22656	235905,8224	160527,7467
13	G	617777,4128	19867,46425	318705,9592	227964,9814	68687,37261	499366,6958	314249,0591
14	G	897684,7492	28512,59089	525539,4599	63359,09514	106164,9229	974901,3625	733540,3661
15	G	898842,1249	27108,02561	575424,5528	106844,6592	155709,4747	830010,2239	742092,6253
16	G	686753,955	17321,14225	433958,7495	595140,0282	128542,0141	885844,0805	851103,1975
17	G	405903,6067	8569,935511	851344,9051	3757294,22	72683,32089	379261,7183	343044,0497
18	G	609195,6025	18063,11156	971800,0163	679335,82	141368,0066	814165,2199	914929,2388
19	G	581615,7503	6565,510619	508643,7212	478540,4186	139462,8373	377097,0717	895765,6896
20	G	336076,1986	4033,513325	401306,6636	199893,0424	123215,5194	420321,1602	447641,2938
21	C	2041065,087	45561,96811	1016837,1	377752,5316	155609,1804	1371019,26	2549542,966
22	C	641438,2619	16953,23599	270788,789	205116,6349	36202,47799	684300,8573	203547,7007
23	C	1159357,557	33805,34286	580844,8216	142691,2007	81239,27326	1837365,265	613188,1047
24	C	2272275,035	63644,5089	1024906,151	84663,72033	91600,22272	2392223,452	1001130,397
25	C	843736,1143	29610,8072	451061,2067	89020,99585	53182,86136	900854,5928	632315,5776
26	C	1282724,493	37382,0742	839356,1776	216849,7306	107519,5387	1966930,108	1255955,859
27	C	1046072,486	10324,31721	736744,0139	1573283,279	175361,8194	NF	801727,6565
28	C	2299028,379	49333,12143	1106141,811	1340031,448	208385,1326	3122065,055	2829926,021
29	C	2537621,826	69317,35528	1016256,195	393282,2836	228051,0022	3446821,339	3997622,949
30	C	4380142,848	128771,29	2388416,283	197606,8558	469036,2489	7987698,201	9219011,698
31	C+G	3982645,888	150599,4851	2609643,492	841090,6197	366445,6068	4107060,746	3208770,663
32	C+G	1344670,699	20945,9829	596200,4262	407950,9169	76087,31673	1205105,214	526208,2688
33	C+G	272009,4743	9352,028343	152135,9066	192682,3482	35864,68327	187143,0027	76832,65064
34	C+G	819082,2586	22227,53469	385495,0632	71926,86708	73829,02308	1280305,102	690113,4104
35	C+G	1712724,453	50322,66312	1343409,754	125752,3896	224257,422	1914698,087	3112485,193
36	C+G	1830462,08	58637,58521	1523969,245	195046,5699	267345,5383	1468432,934	2989818,77
37	C+G	1490856,026	43167,8765	751835,8696	1461651,131	159399,4471	2987852,721	1345738,656
38	C+G	1303483,62	11069,33366	789206,7312	251735,5405	268646,979	NF	1346145,906
39	C+G	2746151,21	55101,8544	1668558,187	327522,8107	381354,3429	5638555,953	4374018,68
40	C+G	4211378,188	108790,8445	4050443,975	195933,3828	675334,8044	8011045,423	9107767,135

		53	54	55	56	57	58
		alpha-Selinene 21.54	alpha-Zingibere 21.61	Bicyclo[4.4.0]dec-1-ene, 2-isopropyl-5-methyl-9-methylene- 21.65	Germaacrene B 21.72	alpha-Muuroleone 21.79	(E,E)-alpha-Farnesene 21.86
1	H	185509,401	4107459,248	4923592,466	3139278,522	5624802,63	542031,8942
2	H	15232,28275	247921,6151	760666,1774	255712,3502	1095158,68	709345,506
3	H	2171,33339	NF	78312,94459	48874,04997	235357,5346	91528,07654
4	H	10333,78004	211080,8741	797025,5681	703993,9746	1317742,821	183768,5023
5	H	5298,555696	NF	276958,0457	305307,5173	503958,8959	420099,3236
6	H	4984,64475	62403,88524	229642,1245	276194,5903	429965,415	354909,0653
7	H	NF	NF	135095,8044	63745,99095	295600,8561	405616,5306
8	H	NF	103122,3378	205634,0294	207866,6818	357724,7435	322459,1965
9	H	NF	138471,3179	253953,6608	194504,8986	440626,1983	354514,299
10	H	19072,73092	611826,9876	1330197,803	1385664,881	2171659,025	848274,8633
11	G	280536,9656	4152726,145	3659960,735	4081937,362	6315593,283	1282726,048
12	G	9801,797622	95619,26379	201537,9668	177272,7256	356582,8158	359860,995
13	G	8775,875322	234166,4072	514945,3078	374546,0382	825504,7017	533314,8579
14	G	13051,71328	635241,0353	719685,5366	783043,7939	1212024,818	393967,3782
15	G	10554,29492	563527,902	553724,7678	526413,6279	1017541,7	302972,2736
16	G	12191,09058	479121,7516	547744,0327	549170,5184	995474,3649	314388,9806
17	G	77340,03618	238055,0744	301281,6592	278915,8366	661723,4617	1021806,097
18	G	66934,26103	675344,0434	442998,4847	483997,7256	995065,8238	1201928,877
19	G	19992,64149	525743,6865	260327,9633	277397,5405	765763,8393	509278,2455
20	G	9112,853759	343402,8888	156589,9892	248317,225	469553,6189	436698,1989
21	C	73266,50783	1361671,477	1561853,117	2302707,513	1964114,714	2053374,199
22	C	19122,58058	71312,57917	439155,9064	619102,2686	586439,9458	383248,6257
23	C	31965,97865	314462,2841	855391,4917	1844091,686	1300505,814	1747281,626
24	C	39571,53446	664627,9624	1558500,478	2071053,858	2354865,082	476492,2239
25	C	12612,21644	276995,7455	626692,9672	733603,5671	914690,1365	466602,4564
26	C	33848,94865	774742,4639	831674,7019	1671242,939	1258957,924	3598401,971
27	C	16091,9947	34703,43319	440123,1807	441510,423	996386,7232	86801,11016
28	C	53057,04473	968480,2135	1126723,057	3709640,608	1472419,909	4504924,262
29	C	47021,4633	1500710,811	1252145,218	3397042,304	1426699,011	2314431,754
30	C	190969,5561	4133695,593	2385544,356	8772156,481	3513056,857	4850745,687
31	C+G	130787,3955	2118982,01	3306034,98	4648634,963	5966496,678	1704434,992
32	C+G	56969,61	236600,6421	844044,7899	1092395,56	1151038,19	489390,1147
33	C+G	11069,48556	NF	169277,2266	215006,4364	327174,8563	550253,6842
34	C+G	21311,25628	331266,2649	586756,9817	953689,3588	805522,6605	468591,2555
35	C+G	46519,77904	1523995,182	896349,5923	1876920,169	1865200,454	2116410,069
36	C+G	67435,50716	2283592,827	1305661,221	1226687,597	2516313,889	1475443,574
37	C+G	33174,21076	939995,7895	883958,83	2659273,44	1306524,725	2221100,282
38	C+G	26696,23861	111760,993	667935,8599	533792,6063	930146,4525	70322,46942
39	C+G	81421,88612	2590674,968	1606163,834	5112849,516	2534420,836	4844778,338
40	C+G	335548,0063	5607573,479	1907011,527	7668070,745	3912689,09	4067254,537

		59	60	61	62	63	64	65	66
		(Z)-Nerolidol 21.92	beta-Curcumene 21.98	gamma-Cadinene 22.07	beta-Sesquiphellandrene 22.22	delta-Cadinene 22.25	Cadina-1,4-diene 22.45	alpha-Cadinene 22.54	Unknown sesquiterpene 22.58
1	H	670107,0898	3925649,297	3304238,854	7248289,594	7184962,841	176634,5336	3030389,625	396770,8457
2	H	128269,487	160308,7444	716478,1758	1312387,024	1684728,96	35756,67074	646900,4457	50398,15133
3	H	20576,20326	13017,23839	157513,201	79410,53957	121726,0661	2635,142291	109400,4852	10389,65075
4	H	272405,1148	70982,36628	959074,4303	1157356,583	2019568,928	28011,98108	804259,1131	57557,22444
5	H	123926,8309	NF	273383,9234	361158,2635	688296,1872	10164,37571	262766,7319	16453,84203
6	H	119128,5192	NF	236451,0669	397311,4267	683399,8665	9646,048482	230269,5534	15411,88
7	H	NF	NF	120573,9645	NF	334000,5229	4938,701753	146595,1872	NF
8	H	100764,4354	60889,63307	216243,6209	669497,4697	455863,2505	10613,54151	197080,8164	31441,09242
9	H	175210,3515	59921,93959	284582,1053	1096529,397	697640,8413	11454,00741	271378,1564	45937,97714
10	H	322998,2975	248063,5406	1220646,924	3023505,175	3159953,234	42080,70007	984166,6154	91323,87154
11	G	1164022,522	7163303,637	4447350,363	9632999,76	7171328,385	180855,9884	3820368,122	641929,2469
12	G	56943,85729	374592,6677	155310,8462	365260,4675	364667,1933	9202,400861	157824,2159	12571,75292
13	G	91537,34592	334823,683	454600,4999	1089069,568	1063779,713	16650,11713	379444,0767	34743,01577
14	G	165834,4885	915613,2856	751498,8038	1934459,019	1838865,36	27275,50462	549537,1918	51051,21694
15	G	204371,7212	2560485,833	756486,3188	1959993,294	1503834,562	24806,30976	531858,9548	78517,52471
16	G	311297,1413	693176,248	642464,8543	1879372,274	1612870,228	22503,46309	595560,9664	137671,9568
17	G	113878,5861	517712,9516	239817,573	883965,0252	608982,2005	10914,08761	201100,4603	38260,33607
18	G	231479,412	1538073,979	445539,5929	1942491,762	1214211,407	17709,90957	371949,265	97380,2762
19	G	177006,966	2689149,242	388533,5135	1873048,756	968506,4955	12181,93986	277719,2137	115444,002
20	G	177592,2349	2427869,226	254595,6536	1173226,556	638163,5729	9249,988586	186659,7758	70298,9738
21	C	518523,6792	716976,3335	1384616,718	3173389,12	2659988,958	50646,08384	1112895,441	161926,3425
22	C	188701,11	387540,4391	383919,5173	540277,3099	726766,8242	16309,4755	325497,5856	39488,42804
23	C	338296,2743	124255,614	831389,206	1501887,385	1678589,756	32207,40741	603812,9094	54248,26765
24	C	732274,3544	195471,3497	1735399,682	2680379,436	3486071,731	57943,28443	1284877,395	119800,8614
25	C	291559,5214	108540,3683	630089,2541	1406881,063	1602792,6	24954,95211	529138,9283	68959,6019
26	C	364609,5828	213804,3847	956731,7722	2707905,981	1746983,7	35640,9486	684164,9041	80206,38188
27	C	193436,5202	70811,16559	618142,8611	641577,4987	534896,4097	8635,112404	408559,0048	44612,91622
28	C	878879,6618	321421,2688	1076053,973	4818327,582	2323944,376	41331,92887	915623,955	239962,7722
29	C	700461,3335	303591,3265	1227392,102	4284070,382	2458932,826	49391,12987	998383,7395	178231,7049
30	C	1933700,095	1250715,337	2527762,741	9721671,953	4928767,326	110125,2062	1965103,34	412817,7245
31	C+G	1133904,587	1926479,923	3395800,117	5651082,563	6739756,486	123506,877	2883409,207	287061,4636
32	C+G	219137,9995	1216947,014	788263,7135	1092449,967	1427136,852	31558,86059	547692,1605	79856,53983
33	C+G	103961,0089	83408,17218	158051,0533	203398,7368	298432,5813	5730,965424	139878,3062	4478,235733
34	C+G	217268,2852	481000,4953	607324,0679	1315857,631	1091392,954	23089,53891	488066,1116	76691,18984
35	C+G	423582,5266	2152941,036	1116627,874	4988495,855	3011725,96	45238,67649	926143,5326	238345,4927
36	C+G	457470,7074	2716863,059	1676010,307	5475919,937	3900296,06	49971,7215	1305604,846	298281,579
37	C+G	403955,7786	723933,1399	818034,7452	2401208,078	1967337,526	26759,41372	676586,2984	95864,7281
38	C+G	207081,4312	370133,2306	611513,0894	807274,9965	697101,046	10366,457	390010,0251	41024,24532
39	C+G	909903,5723	3717353,695	1628553,585	6344373,957	3462279,632	59684,783	1209191,085	330806,2553
40	C+G	1593180,448	4568529,528	2436005,007	12172864,8	5219322,428	101058,1373	1788596,074	568366,1076

		67	68	69	70	71	72	73
		alpha-Calacorene 22.65	(E)-Nerolidol 22.98	gamma-Calacorene 23.06	(Z)-3-Hexen-1-ol, benzoate 23.14	Palustrol 23.19	(E,E)-TMTT 23.27	β-Caryophyllene oxide 23.48
1	H	588938,4912	544267,172	2477311,278	1628044,351	833855,5899	580548,2415	866352,5895
2	H	123095,8509	154997,6703	684716,5364	697769,7525	453704,4184	233294,4751	422135,4484
3	H	22506,42354	NF	68230,05955	NF	76254,58783	NF	12540,10504
4	H	112092,4598	66524,68415	612755,8317	269634,968	473978,2431	12165,67578	902298,3855
5	H	37566,3338	46181,24103	255558,6962	184962,3858	252685,9536	23669,43184	445318,1372
6	H	29267,29092	36115,36558	199490,5128	91071,43557	194082,0238	15740,10446	321016,1825
7	H	21433,36243	94471,32593	78468,35633	412815,6851	192385,2893	18500,32807	318033,6651
8	H	39803,28497	117105,4407	199760,6194	298018,0095	197526,205	32647,52475	281464,716
9	H	40269,83286	77258,9129	259849,996	106004,8293	256358,501	22917,47962	252020,07
10	H	180085,4138	359952,0765	1078621,987	573479,4742	759192,543	693056,9268	1457134,177
11	G	613317,0238	997006,6498	3022231,333	1700391,567	886950,0953	1037003,171	731540,6279
12	G	35011,27747	71193,4954	176434,3102	287501,5019	169660,9211	47793,00928	248418,4501
13	G	75676,28171	65814,76847	558211,1769	461295,543	384235,2922	85489,92902	557420,2802
14	G	100374,3395	85105,47449	584404,5871	437094,5744	330993,7312	85970,80668	574659,1252
15	G	84965,09792	73692,35853	529658,405	151802,5714	412898,7785	37922,48008	572220,0511
16	G	102205,6874	43758,32949	577172,8226	212572,7905	397245,452	32660,81785	471545,0627
17	G	56868,01988	1004348,06	302704,3375	1681579,289	173735,6908	745066,6251	266614,055
18	G	72041,85792	757397,9656	542194,8727	2299966,238	277260,6695	946155,2993	540463,608
19	G	71939,03569	137287,0051	529241,2585	831959,3831	250881,6065	251590,8751	374140,0498
20	G	46544,1479	102588,2159	286722,3247	193299,0148	163384,861	100357,0124	134831,979
21	C	158442,3135	586821,9257	901047,793	1828009,211	273487,0207	205505,6709	250193,282
22	C	53701,62322	86587,00681	279484,292	588763,2512	243831,1272	20272,61139	447670,647
23	C	119562,2436	166509,1187	769584,3766	1055021,911	444315,4878	77680,8679	940120,3129
24	C	197348,9627	160307,0303	1169961,393	701066,3526	589519,8073	49879,22316	936528,7773
25	C	80274,72811	174669,0143	474276,7147	726115,4943	345730,083	72747,9866	690365,6621
26	C	88587,78567	1093158,794	516665,65	4888415,691	357825,3822	376115,1207	541882,4135
27	C	87516,76224	307714,9398	317014,2453	1449841,009	207936,0763	20469,3694	240293,5742
28	C	134864,8132	1060758,962	840204,2697	8968736,777	476329,1999	233952,8995	867994,9344
29	C	91299,41916	613648,3619	583527,3482	3067005,264	386403,1291	114573,5351	924725,9043
30	C	205185,4558	1540961,139	974933,1677	7988899,236	611376,3478	1128712,395	1347060,83
31	C+G	517684,1049	431573,4103	2623892,103	1671775,114	775904,5615	479843,5627	907192,7365
32	C+G	115163,6554	158111,48	611378,8081	686847,7958	314454,8409	68909,04217	415751,8724
33	C+G	32564,45084	79211,38373	175509,2086	634326,9959	157430,7885	43544,75456	221872,9329
34	C+G	78691,65108	147480,3305	470511,2863	466149,3571	260950,3144	57327,51135	410658,9473
35	C+G	124655,1315	485035,9399	808924,4968	3215358,289	462335,3074	503541,2303	736694,0201
36	C+G	213291,3113	735752,1038	1326259,623	2639902,202	585811,7537	622576,1036	690609,5949
37	C+G	86501,0491	649876,9656	451610,4974	1735134,959	306167,0483	134947,1906	884717,0883
38	C+G	74644,38126	352644,4877	171233,5899	1031062,088	160316,9063	33291,60169	238055,3398
39	C+G	175197,3216	739409,4875	1071787,605	4122987,002	415683,3656	391929,2726	1018408,115
40	C+G	234982,3504	3742765,966	1243593,664	4135389,773	642115,1491	1921233,274	1608128,959

		74	75	76	77	78	79	80	81
		Ledol 23.87	Cubenol 24.08	Unknown 24.19	beta-Cedren-4-one 24.44	T-Cadinol 24.55	alpha-Muurolol 24.65	alpha-Amylcinnamaldehyde, (E)- 24.66	alpha-Cadinol 24.84
1	H	1060084,63	68183,56623	318598,4998	146010,5738	2249360,914	155885,0315	60425,29931	388061,2582
2	H	1013143,56	23215,82056	75407,10521	23156,22022	923707,3287	142642,3042	144647,3801	249168,6109
3	H	150997,176	NF	27149,00986	NF	71858,27402	10056,40335	18072,00644	18434,9593
4	H	796886,132	15805,61643	78203,5388	NF	813230,245	85054,75582	49301,25062	186092,372
5	H	532110,094	NF	34270,97307	NF	189175,1189	50037,52617	150377,3026	79374,76293
6	H	432598,907	10371,05242	27246,07683	NF	157258,1403	42449,7019	120528,086	67816,66903
7	H	452787,335	19956,97028	9651,88001	NF	139902,3407	38768,96636	200678,5469	124631,8807
8	H	523392,723	NF	24205,81722	NF	173126,4412	31270,20381	121408,2233	73636,69003
9	H	501009,172	NF	30447,63271	NF	196245,0284	20077,83746	111927,5856	93437,20147
10	H	1013015,69	32628,15665	137493,1087	36079,55575	842033,0768	54074,77372	114889,9147	144060,476
11	G	1331105,68	58650,0617	346827,6825	350839,0523	2445382,973	197314,1689	74294,04155	433993,4971
12	G	504708,337	14412,73933	22207,57447	NF	300871,4658	87022,52243	141237,6469	144493,0635
13	G	860452,812	11705,55547	51629,52735	NF	383046,0154	100358,6054	178812,5874	116690,6422
14	G	588633,045	12431,61683	72031,14259	13478,82857	570128,8745	58592,4895	63004,80841	108719,3968
15	G	793230,358	6384,539687	67410,32088	NF	494802,9257	55316,19092	77894,33053	118928,3622
16	G	752989,161	14153,32044	70659,21018	8001,257051	417737,1137	56520,37439	104890,024	113736,7785
17	G	487309,302	NF	29070,55476	188639,2711	285160,0585	88642,50899	112099,7386	97510,92744
18	G	558522,019	NF	54869,3606	173726,9771	276159,4428	44085,37272	140394,1781	115839,4829
19	G	644556,174	16152,68254	53576,18677	34634,61754	197540,6242	41930,54832	221182,4266	102533,8339
20	G	390385,346	NF	34564,09761	12796,33252	107854,4339	17250,38193	86662,6852	74184,25865
21	C	409298,741	15119,97676	98046,6668	40030,3366	753694,2714	75851,03155	27554,84553	178464,4165
22	C	553002,342	10989,69331	35086,01763	NF	476897,8434	95935,32492	73009,66857	145176,52
23	C	744442,231	18103,70463	74883,65204	47354,45013	507152,815	82935,02935	81818,72506	116005,0754
24	C	1048810,05	25772,606	151829,9408	19319,25301	1075504,791	105068,1253	78454,37586	155188,4486
25	C	709269,184	13426,63174	65249,42554	16492,40061	582211,4882	70191,99062	62723,37478	153701,4682
26	C	709696,129	14026,45765	67621,69004	83521,51891	523694,1643	48861,61346	58257,45737	94159,27848
27	C	343856,638	3431,013054	133373,3776	NF	239972,4876	21419,26535	14238,34941	62474,36891
28	C	891500,905	14990,28832	118858,1792	74495,0969	517525,8545	59314,07445	200966,4522	179689,667
29	C	850075,785	22533,93834	80620,72562	30785,43921	714045,1916	54519,0799	99518,73014	140483,8501
30	C	1072702,77	33703,99793	155102,1594	96591,66567	1022762,332	97275,33357	88360,26247	139635,548
31	C+G	1178617,1	47801,33822	336073,5386	96942,46054	2124081,633	202313,6811	78790,40136	508326,059
32	C+G	763268,256	26025,42706	84858,21067	17211,71975	882776,0341	213625,2179	138181,3853	258230,3312
33	C+G	395351,646	NF	22997,74385	23512,28799	149431,5908	58794,93763	111696,9705	67796,78812
34	C+G	550318,329	NF	50355,85644	16550,93875	382443,3725	38309,23917	60056,54261	71232,7044
35	C+G	979052,964	16902,71061	113278,4078	72248,64392	642120,5559	73175,77873	77369,52594	151619,3145
36	C+G	1065600,58	28003,70187	155411,0539	109426,6618	1095059,323	113879,5458	38171,37717	260778,1283
37	C+G	515531,805	6262,657372	56508,43908	37661,16062	519981,1205	56693,04873	68541,74713	116172,9648
38	C+G	256480,654	4546,799782	124630,3462	NF	166321,3732	18773,28794	10874,95872	34157,22626
39	C+G	899775,196	21391,56146	129569,2166	70424,22986	850145,2045	71740,3862	124192,1108	181307,6603
40	C+G	1394362,72	37276,54427	175332,3103	272891,8266	1170559,613	190397,1032	67775,18373	194206,5599

		82	83	84	85
		Unknown sesquiterpene 25.27	Caryophyllene acetate 25.68	alpha-Hexylcinnamaldehyde, (E)- 26.47	4-Acetyl-alpha-cedrene 26.95
1	H	290578,1312	47588,33368	65477,72221	169291,1095
2	H	58637,32407	199033,7123	159346,7582	570866,9172
3	H	NF	7439,024805	15776,11454	49873,05533
4	H	17593,52091	25974,12819	60758,32657	209672,3246
5	H	34182,64439	34844,79967	179363,3877	411336,5005
6	H	23640,53716	117681,4515	138246,1111	412070,6778
7	H	34273,6405	1169853,322	242830,6928	1115068,092
8	H	43123,36761	180913,7506	128216,2709	518418,745
9	H	33446,14833	99473,93725	136989,0832	490130,2962
10	H	102074,7888	63088,42597	186518,4976	589985,4231
11	G	698850,7045	70094,18884	46937,77514	216977,276
12	G	26669,39157	195135,8846	144571,5625	516275,9345
13	G	44697,18944	116933,7682	211184,6186	615710,8107
14	G	22577,93418	35592,49573	90030,71538	279671,1979
15	G	32643,85232	22393,2319	110231,6235	284554,8858
16	G	33226,18674	87323,42964	125223,2313	370875,6123
17	G	468014,7383	503820,3502	141564,121	601105,3297
18	G	396415,7205	211711,4894	150772,3436	596692,5373
19	G	108075,924	190371,3485	253221,9124	843333,7597
20	G	53235,53428	53127,72515	115727,5648	432646,263
21	C	65274,69296	21069,92656	22796,90906	71716,07663
22	C	36210,64712	93547,96146	86181,30116	343387,2234
23	C	93994,74694	87219,72598	120031,3583	456586,1043
24	C	30663,5145	33369,79995	101049,1857	326531,49
25	C	44964,31991	11125,08359	98684,8482	242327,8796
26	C	171342,6291	32778,92858	72422,18005	221962,3599
27	C	NF	48670,83932	19283,34283	75231,53234
28	C	170339,3615	290288,9464	198999,4523	769603,2448
29	C	69171,68308	75961,03883	131586,0902	466426,4849
30	C	185734,0018	69891,24757	139114,2349	543116,6132
31	C+G	151087,5247	61925,0752	68040,61862	203964,1036
32	C+G	55064,67049	168090,5289	137095,8769	492801,7197
33	C+G	77172,97811	89852,64617	150754,656	474955,1541
34	C+G	37204,32043	41845,56689	78150,30492	253993,0203
35	C+G	137267,3413	22500,66698	106068,325	315712,4705
36	C+G	201560,8205	24916,89653	68342,30248	221592,6122
37	C+G	93388,73174	242093,4486	98138,90773	458391,0781
38	C+G	NF	15403,2912	13406,07128	48879,10644
39	C+G	127512,1428	82317,82059	138456,2395	491522,9051
40	C+G	583605,7318	44445,01821	102466,8101	353006,3932