



UNIVERSITA' DEL PIEMONTE ORIENTALE

Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica

Dottorato in Scienze Ambientali (Acque Interne e Agroecosistemi)

XXVIII CICLO

**Fattori ambientali e comportamentali che influenzano
il ciclo vitale in due specie polimorfiche di libellule,
Ischnura elegans e *Ceriagrion tenellum***

Dottoranda: Erica Subrero

Tutor: prof. Marco Cucco

Coordinatore: prof. Giorgio Malacarne

Anno Accademico 2014-2015

Dedico questa tesi di dottorato ai miei genitori e al mio compagno
che tanto mi hanno supportato e sopportato in questi anni

INDICE

OBIETTIVO DELLO STUDIO	1
Biologia degli Odonati	7
CAPITOLO 1 - IL POLIMORFISMO NELLA SPECIE <i>ISCHNURA ELEGANS</i>	27
- Riassunto	28
- Introduzione	29
- Materiali e Metodi	33
- Scheda della specie	33
- Area di studio	35
- Metodo di campionamento	37
- Scelta del partner	39
- Crescita e sopravvivenza della prole	40
- Statistica	43
- Risultati	44
- Abbondanza dei morfotipi in campo	44
- Scelta del partner	49
- Parassiti	53
- Tasso di schiusa, crescita e sopravvivenza della progenie	57
- Discussione	60
- Bibliografia	67

CAPITOLO 2 - IL POLIMORFISMO NELLA SPECIE

<i>CERIAGRION TENELLUM</i>	77
- Riassunto	78
- Introduzione	79
- Materiali e metodi	81
- Scheda della specie	81
- Area di studio	83
- Metodo di campionamento	84
- Statistica	85
- Risultati	88
- Discussione	93
- Bibliografia	96

CAPITOLO 3 - EFFETTO DEGLI INSETTICIDI DIFLUBENZURON E ALFA-

CIPERMETRINA SU SPECIE NON TARGET: *ISCHNURA ELEGANS* E *DAPHNIA*

<i>MAGNA</i>	101
- Riassunto	102
- Introduzione	103
- Materiali e metodi	109
- Insetticidi utilizzati	109
- Modello di allevamento di <i>Ischnura elegans</i>	111
- Statistica	114
- Risultati - <i>Ischnura elegans</i>	115

- Confronto tra la prole dei due morfotipi _____	115
- Confronto tra i livelli di concentrazione degli insetticidi _____	117
- Risultati - <i>Daphnia magna</i> _____	122
- Discussione _____	125
- Bibliografia _____	130
CONCLUSIONI _____	139

OBIETTIVI DELLO STUDIO

Il progetto di ricerca si inserisce nell'ambito degli studi sulle strategie alternative di riproduzione ovvero strategie di accoppiamento utilizzate da maschi o femmine che differiscono dalla strategia prevalente del sesso. Questo studio persegue l'obiettivo di meglio comprendere i meccanismi che regolano il mantenimento del polimorfismo femminile degli Odonati.

Strategie alternative sono presenti in molti dei principali taxa e possono includere significative differenze comportamentali, morfologiche, fisiologiche o relative al ciclo vitale (Gray & McKinnon, 2007; Gross, 1996).

Spesso i maschi ricorrono a più di una tattica per accedere alle femmine (Austad, 1984; Caro & Bateson, 1986; Gross, 1996; Shuster, 1989; Widemo, 1998); tipicamente alcuni maschi adottano una tattica territoriale allo scopo di monopolizzare l'accesso alle femmine, mentre altri maschi utilizzano una strategia "furtiva" che prende il nome di *sneaky* nella quale essi provano ad accoppiarsi senza difendere una risorsa (Gross, 1996).

La teoria dei giochi evoluzionistica ha fornito due principali ipotesi al fine di spiegare il mantenimento delle strategie alternative di riproduzione:

- Evolutionary stable strategy (ESS): il mantenimento è portato da una selezione dipendente dalla frequenza (Maynard Smith, 1982).
- Strategia condizionale: ipotizza che la tattica adottata da un individuo dipenda da aspetti, ambientali o fisiologici, relativi alla sua condizione (Dawkins, 1980; Gross, 1996).

Una strategia condizionale nella quale un individuo può scegliere la tattica più favorevole in base alla sua situazione ambientale o fisiologica dovrebbe essere avvantaggiata; effettivamente molti studi supportano l'idea che se gli individui differiscono nella condizione, ed il vantaggio di ogni tattica dipende dalla condizione, allora gli individui dovrebbero continuare ad evolvere strategie condizionali (Hammerstein, 1981; Parker, 1974; Selten, 1980).

Questa intuizione è supportata da numerosi risultati empirici; fra gli esempi più comuni sono annoverati dimorfismi maschili in scarabei del genere *Onthophagus* (Eberhard, 1982; Emlen, 1994) tattiche alternative di accoppiamento in damigelle della

famiglia Calopterigidae (Forsyth & Montgomerie, 1987; Plaistow, 1997; Plaistow *et al.*, 1996), strutture di difesa inducibili negli invertebrati (Harvell, 1986), le caste sociali negli Imenotteri (Holldobler & Wilson, 1990; Wheeler & Nijhout, 1983; Wilson, 1971) e i polimorfismi stagionali nelle farfalle (Hazel & West, 1982; Shapiro, 1976).

Tuttavia esistono anche studi a supporto dell'ESS in cui è verificato che le strategie sono geneticamente determinate; tra questi uccelli (Lank *et al.*, 1995), lucertole (Sinervo & Lively, 1996), isopodi (Shuster *et al.*, 1991a-b), pesci (Ryan *et al.*, 1992) e insetti (Tsubaki *et al.*, 1997), anche se solo pochi di questi studi hanno dimostrato che le strategie alternative sono mantenute dalla selezione dipendente dalla frequenza (Gigord *et al.*, 2001; Sinervo & Lively, 1996).

Inoltre questa ricerca si pone l'obiettivo di valutare gli effetti di variabili ambientali esterne sui due morfotipi, sottoponendo le larve di *Ischnura elegans* a diverse concentrazioni di due insetticidi comunemente usati in ambiente risicolo; inoltre gli effetti relativi alle larve derivanti dai due morfotipi sono confrontati con quelli di un'altra specie non target, la *Daphnia magna*, per la quale esiste un test tossicologico standard (ISO 6341:2012).

I contaminanti ambientali sono presenti a livelli subletali in gran parte del mondo industrializzato (Stoks *et al.*, 2015) e rappresentano un'attuale problematica negli ambienti agricoli; negli ultimi 50 anni i territori dedicati all'agricoltura sono aumentati a livello globale del 10% (Kohler & Triebkorn, 2013) causando un conseguente aumento dell'utilizzo di pesticidi. Recenti studi (Beketov *et al.*, 2013) hanno dimostrato che l'utilizzo di pesticidi in agricoltura, sebbene a concentrazioni permesse dalla legislazione, ha causato una perdita del 42% in termini di abbondanza di specie e famiglie nei fiumi europei. Inoltre è stato provato che queste sostanze minacciano l'integrità ecologica e la biodiversità di quasi la metà dei corpi idrici europei (Malaj *et al.*, 2014).

Per questi motivi diventa indispensabile mantenere la biodiversità in ambiente agricolo effettuando studi in questo campo che aiutino la legislazione attuale ad integrarsi con le necessità ambientali e sviluppare una sostenibilità agronomica (Swift & Anderson, 1994; Matson *et al.* 1997).

Le risaie svolgono un'importante funzione di zone umide artificiali e sono alla base di alti livelli di biodiversità che coinvolgono numerosi livelli della catena trofica essenziali

per la produttività agricola (Jinguji *et al.*, 2013); è stato, infatti, dimostrato che l'impatto dei parassiti del riso è spesso ridotto a livelli trascurabili quando le comunità di predatori naturalmente presenti sono conservate attraverso una riduzione dell'uso di pesticidi (Way & Heong, 1994; Settle *et al.*, 1996; Schoenly *et al.* 1998).

In questo contesto acquisiscono importanza rilevante gli invertebrati acquatici che risultano fondamentali nella catena alimentare e occupano diversi livelli trofici; questa caratteristica li rende importanti vettori dei contaminanti attraverso la catena trofica (Buckland-Nicks *et al.*, 2014), rappresentando una basilare risorsa nutritiva per pesci (Paterson *et al.*, 2006) e uccelli (Edmonds *et al.*, 2012; Panyi, 1994).

BIBLIOGRAFIA

Austad S., 1984. A classification of alternative reproductive behaviors and methods for field testing ESS models. *American Zoologist* 24:309-319.

Caro T.M., Bateson P., 1986. Organisation and ontogeny of alternative tactics. *Animal Behaviour* 34:1483-1499.

Dawkins R., 1980. Good strategy or evolutionarily stable strategy. *Sociobiology: beyond nature/nurture*:331-367.

Eberhard W.G., 1982. Beetle horn dimorphism: making the best of a bad lot. *American Naturalist* 119:420-426.

Emlen D.J., 1994. Environmental control of horn length dimorphism in the beetle *Onthophagus acuminatus* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Proceedings of the Zoological Society of London* 256:131-136.

Forsyth A., Montgomerie R.D., 1987. Alternative reproductive tactics in the territorial damselfly *Calopteryx maculata*: sneaking by older males. *Behavioral Ecology Sociobiology* 21:73-81

Gigord L., Macnair M., Smithson A., 2001. Negative frequency- dependent selection maintains a dramatic flower color polymorphism in the rewardless orchid *Dactylorhiza sambucina* (L.) *Proceedings of the National Academy of Science USA* 98:6253-6255

Gross M.R., 1996. Alternative reproductive strategies and tactics: diversity within sexes. *Trends in Ecology and Evolution* 11:92-98

Hammerstein P., 1981. The role of asymmetries in animal contests. *Animal Behaviour* 29:193-205

Harvell C., 1986. The ecology and evolution of inducible defenses in a marine bryozoan: cues, costs, consequences. *American Naturalist* 128:810-823.

Hazel W.N., West D.A., 1982. Pupal colour dimorphism in swallowtail butterflies as a threshold trait: selection in *Eurytides marcellus* (Cramer). *Heredity* 49:295-301.

- Holldobler B., Wilson E., 1990.** The ants. *Harvard University Press* - Cambridge, Massachusetts:
- Lank D., Smith C., Hanotte O., Burke T., Cooke F., 1995.** Genetic polymorphism for alternative mating behaviour in lekking male ruff *Philomachus pugnax*. *Nature* 378:59-62.
- Maynard Smith J., 1982** Evolution and the theory of games. *Cambridge University Press*, Cambridge
- Parker G., 1974.** Assessment strategy and the evolution of fighting behaviour. *Journal of Theoretical Biology* 47:223-243.
- Plaistow S.J., 1997.** Variation in non-territorial behaviour in male *Calopteryx splendens xanthostoma* (Charpentier) (Zygoptera: Calopterygidae). *Odonatologica* 26:171-181.
- Plaistow S.J., Siva-Jothy M.T., 1996.** Energetic constraints and male mate- searching tactics in the damselfly *Calopteryx splendens xanthostoma* (Charpentier). *Proceedings of the Royal Society of London B* 263:1233-1238.
- Ryan M.J., Pease C.M., Morris M.R., 1992.** A genetic polymorphism in the swordtail *Xiphiphorus nigrensis*: testing the prediction of equal fitnesses. *American Naturalist* 139:21-31.
- Selten R., 1980.** A note on evolutionarily stable strategies in asymmetric animal conflicts. *Journal of Theoretical Biology* 84:93-101.
- Shapiro A., 1976.** Seasonal polyphenism. *Evolutionary Biology* 9:259-333.
- Shuster S., 1989.** Male alternative reproductive strategies in a marine isopod Crustacean (*Paracercis sculpta*): the use of genetic markers to measure differences in fertilisation success among a, b, and c males. *Evolution* 43:1683-1698.
- Shuster S.M., Wade M.J., 1991a.** Female copying and sexual selection in a marine isopod crustacean, *Paracerceis sculpta*. *Animal Behaviour* 42: 1071-1078.
- Shuster S.M., Wade M.J., 1991b.** Equal mating success among male reproductive strategies in a marine isopod. *Nature* 350:608-610.

Sinervo B., Lively C., 1996. The rock-paper-scissors game and the evolution of alternative male strategies. *Nature* 380:240-243.

Tsubaki Y., Hooper R.E., Siva-Jothy M.T., 1997. Differences in adult and reproductive lifespan in the two male forms of *Mnais pruinosa costalis* (Odonata: Calopterygidae). *Researches on Population Ecology* 39:149-155.

Wheeler D., Nijhout H., 1983. Soldier determination in *Pheidole bicarinata*. Effect of methoprene on caste and size within castes. *Journal of Insect Physiology* 29:847-854.

Widemo F., 1998. Alternative reproductive strategies in the ruff, *Philomachus pugnax*: a mixed ESS? *Animal Behaviour* 56:329-336

BIOLOGIA ED ECOLOGIA DEGLI ODONATI

Il termine Odonati fu pensato dall'entomologo danese Fabricius nel 1793 per indicare l'intero ordine di questi insetti, ed è una contrazione di Odontognati, ovvero insetti dalle mandibole dentate.

Sono presenti in quasi tutto il mondo, ad esclusione solo dell'Antartide e di alcune isole Artiche; sono molto abbondanti nelle regioni tropicali e il loro numero decresce spostandosi verso i poli. Si trovano solitamente vicino a laghi, stagni, fiumi e in generale in prossimità di corpi idrici, ma gli ambienti di acque ferme sono quelli che ospitano il numero maggiore di specie. Lo sviluppo di questi insetti avviene nella maggior parte degli ambienti acquatici, ma alcune specie necessitano ambienti particolari come le zone salmastre e corpi d'acqua temporanea.

Le libellule adulte si distinguono facilmente dagli altri insetti per il loro lungo addome, formato da segmenti ben riconoscibili, le due paia di ali fitte di venature, i grossi occhi e le antenne molto ridotte. Sono attivi principalmente durante le ore centrali del giorno e hanno un volo agile e veloce.

Le specie attualmente conosciute di Odonati nel mondo sono circa 5900, di cui circa 120 sono presenti in Europa e 93 si riproducono in Italia. Sono suddivise in tre sottordini:

- **Anisotteri (Anisoptera)** - gli adulti, chiamati comunemente Libellule, hanno le ali anteriori e posteriori con forme diverse, gli occhi sono grandi e formano, toccandosi, una massa globosa, simile a un "casco". Quando sono in posizione di riposo tengono le ali distese ai lati del corpo e sono grandi volatori. Le larve sono tozze e robuste; l'addome è più largo al centro e ristretto alle due estremità, più o meno depresso dorso-ventralmente e terminante con una breve piramide caudale appuntita. La respirazione è affidata alle branchie rettali interne. Le larve vivono solitamente infossate nei sedimenti o sedentarie sulla vegetazione sommersa e si muovono a scatti espellendo con forza acqua dal retto (propulsione a reazione).

- **Zigotteri (Zygoptera)** - gli adulti, noti comunemente come Damigelle, hanno le ali anteriori e posteriori simili nella forma. La testa è rettangolare con gli occhi sono posti ai due lati della testa e le ali a riposo sono chiuse, adagiate lungo l'addome. Sono più piccoli

e di struttura corporea più delicata rispetto ai grossi Anisotteri ed hanno volo molto più lento e poco potente, detto “sfarfallante”. Le larve sono slanciate con addome sub cilindrico che si restringe nella parte terminale la quale porta tre lamelle tracheobranchiali, molto lunghe e fogliacee, utilizzate principalmente come pinna caudale; la respirazione è, infatti, essenzialmente rettale e cuticolare.

- **Anisozigotteri (Anisozygoptera)** - hanno le ali anteriori e posteriori uguali nella forma come negli Zigotteri ma nell’aspetto ricordano un Anisottero. Al mondo sono conosciute solo due specie del genere *Epiophlebia*, una in Giappone e una nella regione dell’Himalaya.



I FOSSILI

Le libellule appartengono ai Paleoptera, il più antico gruppo d'insetti alati risalente al periodo del Carbonifero (250-300 milioni di anni fa) caratterizzati dall'aver larve acquatiche e ali con venature molto complesse.

Gli antenati delle libellule, i Protodonata, sono tra i più grandi insetti alati mai esistiti; l'apertura alare della famiglia estinta dei Meganeuridae raggiungeva i 70 cm, portando questi insetti ad essere le più grandi creature volanti del loro tempo. Queste libellule ancestrali assomigliavano ai moderni Odonati ma c'erano importanti differenze nella struttura alare; in particolare non era presente il *nodo*, posto nelle moderne libellule circa a metà tra l'attaccatura dell'ala e l'apice, e lo *pterostigma*, singola cella alare colorata presente vicino all'apice dell'ala, era assente.

Tuttavia ben poco si sa sulla morfologia dei Protodonata se non ciò che è arrivato ai giorni nostri sotto forma di fossili.

Nessuno studio ha potuto finora accertare cosa innescò la comparsa di questi insetti giganti né quale sia la causa dell'estinzione. Una possibile ragione potrebbe essere relazionata ai cambiamenti delle condizioni atmosferiche; la respirazione degli insetti è infatti basata sul principio della diffusione per cui l'aumento di ossigeno contenuto nell'aria verificatosi durante il Carbonifero avrebbe potuto favorire lo sviluppo di questi organismi. Il successivo declino del 20% del livello di ossigeno avrebbe quindi potuto causare l'estinzione dei Protodonati. Un'altra teoria prevede invece che i Protodonata siano diventati facile preda dei Rettili in rapida evoluzione.

Il primo insetto che è stato riconosciuto come libellula fossile risale al Permiano, 250 milioni di anni fa, e molte delle moderne famiglie era già presenti in quel periodo. I ritrovamenti fossili mostrano che le libellule erano molto più diversificate rispetto ad oggi.



L'ACCOMPIAMENTO

L'accoppiamento inizia con movimenti ritualizzati del maschio finalizzati ad attirare la femmina, per trattenerla poi con le zampe e afferrarla nella parte posteriore della testa con i cerci, formando il cosiddetto tandem. A questo punto il maschio inarca l'addome, stimolando la femmina a fare lo stesso per unire l'orifizio genitale al suo organo copulatore. Se la femmina si dimostra recettiva risponderà flettendo l'addome per far coincidere il proprio poro genitale con quello del maschio assumendo così la tipica posizione a "cuore". La femmina può però decidere di non accoppiarsi in quanto non è obbligata a inarcare l'addome per copulare.

Alcuni Zigotteri, il cui rapporto sessuale dura da pochi minuti a più ore, si accoppiano mentre sono posati e solo occasionalmente in volo, mentre gli Anisotteri, il cui accoppiamento dura solo pochi secondi o al più alcuni minuti, trascorrono la maggior parte dell'accoppiamento in volo e si posano solo raramente. Il maschio può, prima di trasferire il suo sperma nell'apparato genitale femminile, rimuovere quello deposto da altri maschi nell'accoppiamento precedente, in modo da avere la certezza che le uova fecondate e deposte genereranno figli suoi; per lo stesso motivo durante la deposizione delle uova il maschio spesso sorveglia la femmina proteggendola da altri maschi e assicurandosi così che le sue uova vengano deposte prima che la sua compagna si accoppi nuovamente. A volte il maschio è anche utile come ancoraggio per la femmina, che depone in suoli fangosi.



SVILUPPO E MATURAZIONE

Gli Odonati depongono le uova con due modalità: gli Zigotteri e le specie appartenenti alla famiglia Aeshnidae depongono all'interno dei tessuti di vegetali morti (*deposizione endofitica*), mentre i restanti Anisotteri depongono le uova libere in acqua (*deposizione esofitica*).

Le dimensioni delle uova variano da 480×230µm a 700x 600µm, possono avere diverse forme a seconda del substrato in cui vengono deposte e solitamente sono di colore marrone scuro o grigio. La schiusa dell'uovo può avvenire in un tempo variabile da tre settimane a vari mesi dopo l'ovideposizione; in quest'ultimo caso le uova svernano nel luogo di deposizione e schiudono in primavera. Lo sviluppo larvale, durante il quale possono avvenire dalle 10 alle 15 mute, può essere interrotto da una diapausa, cioè un arresto dell'accrescimento che permette alla larva di ritardare la muta immaginale fino all'arrivo della stagione propizia. La durata del ciclo vitale è estremamente variabile, in alcuni casi anche all'interno di popolazioni della stessa specie. In molte specie (maggioranza degli Zigotteri e alcuni Anisotteri), chiamate *univoltine*, l'immagine sfarfalla l'anno successivo alla deposizione delle uova; all'interno di popolazioni univoltine ci può essere una frazione *semivoltina* la quale, non riuscendo a completare in tempo lo sviluppo larvale, entra in diapausa e sverna una seconda volta, sfarfallando poi precocemente.

Alcune specie di Anisotteri, detti *poliannuali*, presentano cicli anche di 2 o 3 anni, specialmente se in condizioni climatiche alpine. L'adulto del genere *Sympecma* della famiglia Lestidae è svernante. Le larve vivono nei più svariati tipi di acque: laghi, stagni, paludi, torbiere, pozze, vasche, torrenti, ruscelli e canali. In generale tutte preferiscono però acque tranquille, con vegetazione abbondante e fondo melmoso, anche se alcune specie richiedono acque correnti e altre acque salmastre. Il nutrimento delle larve consiste nei primi stadi di minutissimi Crostacei, Copepodi e Cladoceri mentre negli stadi più avanzati esse cacciano qualunque preda che sia di dimensioni adatte; alcune grosse larve di Anisotteri riescono a catturare persino piccoli vertebrati come girini e avannotti.



METAMORFOSI

La larva, raggiunto l'ultimo stadio di maturazione, comincia ad abbandonare l'acqua per intervalli di tempo sempre più lunghi, respirando progressivamente tramite gli stigmi toracici; infine ne esce definitivamente e si arrampica su un supporto che, nel caso degli Anisotteri, date le dimensioni notevoli delle larve, deve essere piuttosto rigido.

Scelto il supporto adatto, iniziano le fasi dello sfarfallamento, simile in tutte le specie: la cuticola subisce disseccamento e quindi si rompe dorsalmente all'altezza del torace permettendo alla testa di emergere, seguita dal torace con le zampe, e, infine, dai primi segmenti addominali. L'individuo neo sfarfallato dopo essersi liberato dalla vecchia cuticola inizia a distendere le ali, che si trovavano ripiegate nelle pteroteche; contemporaneamente, grazie alla contrazione dei muscoli e all'ingestione di aria, anche l'addome si distende completamente, raggiungendo la sua dimensione definitiva. Tutto il periodo della metamorfosi dura da qualche minuto a circa due ore e generalmente ha luogo nelle prime ore del giorno, anche se in qualche specie avviene di notte; questa fase rappresenta la più delicata per tutti gli Odonati, che, per il tempo necessario a raggiungere la dimensione finale, sono totalmente vulnerabili e quindi facilmente oggetto di predazione da parte di formiche, ragni e altri Insetti.



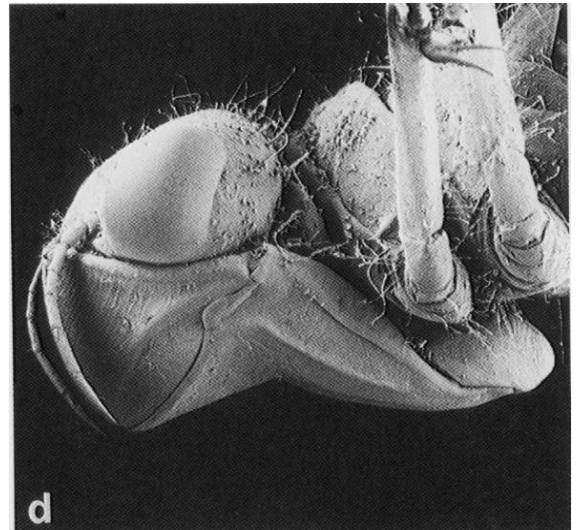
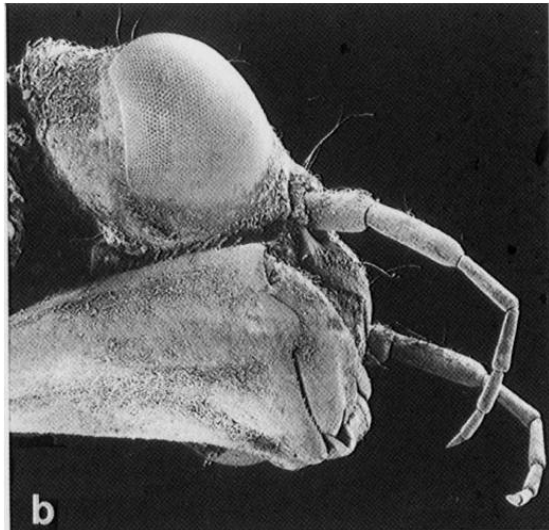
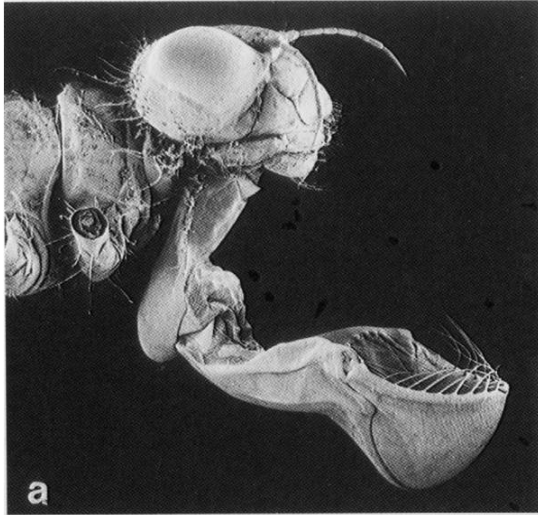
MORFOLOGIA DELLA LARVA

Le larve, sempre acquatiche, sono distinguibili da quelle degli altri Insetti per il labbro inferiore profondamente modificato in un efficiente organo articolato prensile che in molte specie nasconde buona parte del capo e viene perciò chiamato maschera. Essa è costituita da un mento, inserito ventralmente dietro alla bocca e rivolto all'indietro, sul quale si articola un premento, rivolto in avanti e portante all'estremità due palpi labiali. I palpi labiali sono i veri organi di presa e funzionano come le ganasce di una tenaglia; ognuno di essi è composto di un primo articolo ben sviluppato, con margine distale da quasi liscio a molto dentato a seconda della specie, e da un secondo articolo spiniforme, molto lungo e sottile. La maschera, anche quando è munita di robusti denti, svolge solo la funzione di cattura della preda; la masticazione è affidata, invece, alle potenti mandibole e alle mascelle. Si distinguono due tipi di maschera: - concava: presente solo in alcune famiglie di Anisotteri, atta alla cattura di piccole prede; - piatta: presente negli Zigotteri e nelle famiglie Aeshnidae e Gomphidae, permette la cattura di prede di maggiori dimensioni. Tutte le larve sono predatrici e attuano la caccia d'appostamento: seminfossate o immobili sul substrato attendono che la preda sia a tiro per estroflettere in avanti la lunga maschera.

Il corpo può essere glabro o peloso, presenta colorazione di solito scura ma variabile nelle diverse specie in base al tipo di substrato in cui vivono e si divide, come nell'adulto, in tre parti: capo, torace e addome. Il capo presenta una forma approssimativamente pentagonale o rettangolare, è poco mobile ed è articolato al torace grazie ad un collo corto e largo. Gli occhi, composti, sono molto grandi e posti ai lati della testa, in posizione frontale. Il torace non è molto sviluppato e i singoli segmenti non si trovano in posizione inclinata come nell'adulto. Su di esso, a partire dalla terza o quarta muta, si trovano le *pteroteche*, che contengono gli abbozzi alari. Le zampe sono composte di più segmenti, analogamente agli adulti, ed hanno funzione deambulatoria o fossoria, mai natatoria o raptatoria.

L'addome è composto, come nell'adulto, da 10 segmenti più l'undicesimo vestigiale, è sottile e nella sua parte terminale si trovano le appendici anali, con funzione respiratoria e di movimento.





MORFOLOGIA DELL'ADULTO

Gli Odonati rappresentano un gruppo morfologicamente piuttosto omogeneo, anche se i vari sottordini presentano caratteri nettamente distinguibili. Il corpo degli adulti è diviso, come negli altri insetti, in capo, torace e addome. La struttura più vistosa del capo sono gli occhi composti, formati da migliaia di ommatidi; questo è più largo del torace, assai mobile e molto grande, diverso come forma nei due sottordini: globosa negli Anisotteri e trasversa negli Zigotteri. La testa ospita anche le antenne, molto ridotte, tre ocelli disposti a triangolo e le parti boccali, composte.

Il torace è estremamente specializzato ed è formato da due parti: il protorace e lo pterotorace. Il primo è molto ridotto e a esso sono articolate la testa e il 1° paio di zampe, mentre il secondo è molto sviluppato e porta le ali e le zampe medie e posteriori. Il torace delle libellule presenta una conformazione per cui l'inserzione delle zampe viene a essere spostata cefalicamente e quella delle ali caudalmente; questa particolare morfologia, che prende il nome di obliquità, sposta il baricentro della libellula in volo verso l'avanti, permettendole di sopportare urti contro le prede, durante la loro cattura in aria, senza sbilanciarsi eccessivamente e senza modificare in modo marcato la traiettoria. Le zampe sono ben sviluppate, rivolte in avanti e composte di più segmenti: femore, tibia, tarso e unghie. Sono simili nella costituzione in tutte le specie, ma variano nella lunghezza, nella forma e nel colore. Non servono per la locomozione ma per aggrapparsi ai supporti e per catturare e trattenere le prede in volo.

Le ali sono grandi, composte di una membrana chitinoso, generalmente trasparenti, ma talvolta colorate o macchiate; presentano una ricca venulazione longitudinale e trasversale che racchiude piccole concamerazioni dette celle. Tali venature, che costituiscono un importante criterio di classificazione, variano a seconda delle famiglie, dei generi e delle specie. L'addome, mobile, sottile e di solito molto lungo, è formato da 11 segmenti detti "uriti", dei quali i primi 10 sono ben distinguibili, mentre dell'undicesimo sono presenti solo le vestigia. Termina con delle strutture dette cerci, somiglianti a una sorta di tenaglia, con la quale il maschio trattiene la femmina durante l'accoppiamento. Lo sbocco genitale nel maschio si trova nel 9° segmento ma, fatto unico nel regno animale, l'apparato copulatore è situato nel 2° e 3° urite. Nella femmina l'addome è generalmente più corto e dilatato e gli organi genitali sono nell'8° e 9°

segmento. Le femmine delle specie più primitive sono dotate di un ovidepositore molto grosso che permette l'inserzione delle uova nei vegetali vivi o morti e che può essere scambiato per un pungiglione.





FASI DI VITA

Dopo la metamorfosi si possono riconoscere tre differenti fasi nella vita dell'adulto:

- Periodo pre-riproduttivo: l'insetto appena sfarfallato deve passare attraverso un periodo di maturazione; un giovane appena sfarfallato è detto immaturo e si riconosce facilmente dal tegumento non ancora ben indurito e dalla colorazione non ancora definitiva.

La durata del periodo pre-riproduttivo, influenzata dalla temperatura, è in media di 20 giorni, variando nelle differenti specie da 2 a 60; di solito è più breve nel maschio che nella femmina. In questa fase di maturazione avvengono profonde modificazioni nella colorazione del corpo, nell'accrescimento dei muscoli toracici e nelle ali. Gli individui immaturi di solito si spostano dai luoghi di sfarfallamento non appena le ali diventano sufficientemente resistenti. Gli ambienti che sono occupati in questo periodo dagli immaturi sono lontani dal corpo idrico dal quale sono emersi; sono zone ricche di vegetazione, come erbe alte o aree vicine ad ambienti boscati. Qui il giovane immaturo trova protezione da predatori potenziali e cibo e durante questo periodo è possibile che gli adulti formino aggregazioni di più individui. Terminata questa fase l'esemplare, ormai maturo, fa ritorno agli ambienti acquatici e inizia la ricerca di un territorio adeguato alle sue esigenze e alla sua riproduzione.

- Periodo riproduttivo: è il periodo più frenetico della vita dell'adulto, contraddistinto nel maschio da continue lotte per difendere il territorio conquistato, al fine di accoppiarsi con più femmine possibili. Per le femmine è la fase di stress più elevato, in quanto continuano ad accoppiarsi e successivamente a deporre le uova.

- Periodo post-riproduttivo: questo periodo, quando esiste, ha sempre scarso significato biologico. In questa fase i maschi non attuano più nessun comportamento territoriale e scompaiono quasi totalmente anche l'aggressività verso i propri conspecifici.

ECOLOGIA

Regime e comportamento alimentare

La formidabile potenza di volo e la vista straordinaria fanno sì che le libellule siano cacciatori alati senza pari; le dimensioni delle prede che catturano sono assai variabili, ma sempre proporzionate alla corporatura e alle parti dell'apparato boccale. Le prede vengono catturate secondo due differenti modalità di caccia:

- all'agguato: la libellula resta posata su un supporto e, avvistata la preda, le si avventa contro, la cattura con le zampe e ritorna al suo posatoio per consumarla;
- in volo: la libellula attacca e divora le sue prede, che sono normalmente di piccole dimensioni, in volo e senza necessità di posarsi.

La dieta, anche se composta di insetti dei più svariati ordini, consiste per la maggior parte di Ditteri (tra i quali i Chironomidi e i Culicidi sono ben rappresentati), Tricotteri ed Efemerotteri; a volte vengono divorate anche libellule di taglia inferiore. La maggior parte delle prede pesa meno di 1 mg, ma molte specie di libellule catturano prede che arrivano a pesare anche più del 60% del loro peso corporeo. La caccia viene effettuata a vista: grazie agli occhi composti molto grandi e all'estrema mobilità del collo le libellule riescono a vedere in tutte le direzioni e ad avvistare una preda nel raggio di circa 20 metri.



Predatori

Le libellule adulte sono vulnerabili soprattutto durante la metamorfosi, quando non sono ancora in grado di volare e diventano delle prede per varie specie di uccelli. Altri pericoli sono rappresentati dalle formiche e dai ragni. Le prime predano le libellule durante la metamorfosi, mentre i ragni riescono a catturare gli adulti quando sono posati o in accoppiamento.



PERCEZIONE SENSORIALE

Tutti gli adulti degli Odonati presentano piccole antenne, composte da 7 segmenti ciascuna, che provvedono alla percezione di una ristretta gamma di informazioni tattili e olfattive; è ad esempio dimostrato che le antenne sono essenziali nell'individuazione della preda (Piersanti *et al.*, 2014).

La maggior parte delle attività degli Odonati è però essenzialmente basata sulla vista, eccezionalmente sviluppata in questi insetti; l'occhio delle libellule è infatti il più grande tra gli insetti e grazie alla posizione sulla testa permette a questi insetti di vedere frontalmente, lateralmente e posteriormente anche allo stesso tempo.

Come molti altri insetti gli Odonati presentano occhi composti, formati ognuno da numerose faccette chiamate *ommatidi*; ogni ommatidio è composto da una prima lente superficiale e da una seconda lente conica subito dietro. Ogni ommatidio percepisce i raggi paralleli al suo asse e si compone una visione a mosaico; più numerosi sono gli ommatidi più nitida sarà l'immagine che essi compongono.

Gli ommatidi non sono ugualmente distribuiti sulla superficie dell'occhio, ma risultano più grandi e numerosi nella parte superiore rispetto alla parte inferiore; questo significa che le libellule sono in grado di distinguere maggiori dettagli e movimenti di fronte e sopra di loro ed è la principale ragione per cui gli Odonati approcciano da sotto e da dietro prede, partner e rivali.

Sulla superficie dell'occhio delle libellule sono visibili uno o più macchie nere chiamate *pseudopupille*, corrispondenti alla parte dell'occhio allineata con l'osservatore, all'altezza delle quali la luce viene totalmente assorbita e neanche una minima parte viene riflessa. Maggiore è la dimensione delle pseudopupille maggiore è il potenziale visivo di quella sezione dell'occhio.

Gli Odonati possiedono un'eccellente visione dei colori, caratteristica attendibile considerata l'elevata gamma di colorazioni di questi insetti, e sono in grado di percepire la luce ultravioletta, capacità che li rende in grado di individuare la luce riflessa dalla superficie dell'acqua.

Sul capo le libellule presentano tre occhi semplici composti da una sola lente denominati *ocelli* e posti a triangolo con il vertice orientato verso l'alto. Gli ocelli, i cui nervi sono direttamente connessi con i muscoli alari, sono molto sensibili all'intensità

della luce e forniscono all'insetto importanti informazioni sull'assetto di volo; infatti in caso di oscillazioni durante il volo la quantità di luce cambia in seguito a variazioni della linea dell'orizzonte.



VOLO

Le libellule sono tra i più veloci e maneggevoli insetti volatori tanto che alcuni tra i più grossi Anisotteri possono rimanere in volo per un tempo che può raggiungere anche alcune ore, senza mai posarsi e compiendo attività come la cattura delle prede, il corteggiamento, l'accoppiamento e la deposizione delle uova. E' stato calcolato che i Protodonati avrebbero avuto bisogno di mantenere i 69 Km/h per rimanere in volo: i moderni Aeshnidae hanno una velocità massima di circa 36 Km/h mentre le damigelle di circa 10 Km/h. Gli Odonati devono la loro velocità di volo a muscoli alari molto sviluppati fermamente attaccati da una parte alle pareti del torace, dall'altra alla base delle ali; le ali possono muoversi a circa 30 battiti al secondo, ritmo che, paragonato a quello di altri insetti, è in realtà abbastanza lento e non sufficiente a produrre un ronzio udibile.

Le libellule muovono le ali indipendentemente l'una dall'altra e in questo modo possono compiere cambi di direzione e velocità immediati; inoltre possono volare all'indietro altrettanto agilmente e sono in grado di fare *hovering*, ovvero librarsi a mezz'aria senza avanzare o retrocedere, e planare. Le ali delle libellule non sono superfici piane; infatti le venature sono poste su piani differenti e per questo sono così robuste; inoltre il nodo e lo pterostigma le rendono stabili e resistenti. Gli Anisotteri sono volatori eccellenti e si spostano attivamente mentre gli Zigotteri hanno un volo meno potente e passivo, ed è spesso grazie alle correnti d'aria che riescono a compiere grandi spostamenti.

CAPITOLO 1

Il polimorfismo nella specie

Ischnura elegans

RIASSUNTO

Negli Odonati il polimorfismo femminile si manifesta comunemente e implica la presenza di due o più morfotipi femminili, con differenti colorazione e comportamento. Per spiegare questo fenomeno sono state proposte diverse ipotesi basate sulla frequenza dei morfotipi, sulla densità di popolazione, sulla presenza di parassiti e sulle strategie riproduttive.

In questa ricerca è stata studiata la specie *Ischnura elegans* (Odonata: Coenagrionidae) la quale presenta una femmina androcroma (*forma typica* o tipo A) e due femmine ginocrome (*infuscans* o tipo B e *infuscans-obsolata* o tipo C).

Durante la stagione riproduttiva sono stati raccolti dati di popolazioni naturali relativi alle dimensioni di maschi e femmine adulte, alla presenza di parassiti e al comportamento in fase di accoppiamento. Inoltre gli individui marcati sono stati utilizzati per effettuare test di scelta in laboratorio e sul campo nonché per avviare un allevamento allo scopo di confrontare la crescita e la mortalità delle larve prodotte da femmine di diverso morfotipo.

I risultati ottenuti indicano che i maschi mostrano una preferenza per la femmina ginocroma del tipo B, nonostante una maggiore frequenza nella popolazione della femmina androcroma. Questa preferenza è stata osservata anche nell'ambito dei test di scelta effettuati. I maschi e le femmine androcrome osservate in fase di accoppiamento mostrano dimensioni maggiori rispetto agli individui non accoppiati. Infine le femmine androcrome risultano più parassitate rispetto alle femmine ginocrome.

Per quanto concerne la parte di studio svolta in laboratorio i risultati indicano che la crescita delle larve prodotte da femmine del tipo A o del tipo B è simile, ma la mortalità della prole del tipo B è maggiore.

I risultati di questa ricerca suggeriscono che la minore mortalità della prole delle femmine androcrome potrebbe controbilanciare il maggior grado di parassitismo e il ridotto successo riproduttivo di questo morfotipo e sottolineano l'importanza di considerare l'intero ciclo vitale negli studi relativi al polimorfismo negli Odonati.

INTRODUZIONE

Il polimorfismo si verifica quando due o più morfotipi coesistono nella stessa popolazione (Gray & McKinnon, 2007). Nelle libellule e nelle damigelle è comunemente presente il polimorfismo femminile, che si verifica in più di 100 specie nella regione Olartica; si riscontra facilmente nelle specie appartenenti alla famiglia Coenagrionidae, in particolare nel genere *Ischnura* (Fincke *et al.*, 2005; Hammers & Van Gossum, 2008).

In molti Coenagrionidae la colorazione dell'addome e del torace varia nelle femmine sessualmente mature (Walker, 1953; Dunkle, 1990); le femmine di colore simile ai maschi conspecifici prendono il nome di androcrome, mentre i morfotipi che presentano colorazioni differenti vengono chiamate femmine ginocrome (Miller & Fincke, 1999).

La variazione ontogenetica delle damigelle del genere *Ischnura* è comune e svolge il ruolo di indicatore dello stato della maturità sessuale (Corbet, 1999; Takahashi & Watanabe 2011). Il colore degli individui subisce diverse variazioni prima di raggiungere quello finale insieme alla maturità sessuale entro una settimana dallo sfarfallamento (Cordero 1990).

Numerosi studi sono basati sul fatto che i diversi morfotipi coesistenti nelle specie polimorfiche perseguono differenti strategie riproduttive e sono state proposte diverse ipotesi per spiegare il mantenimento del polimorfismo femminile in questi insetti.

La "*Reproductive Isolation Hypothesis*" (Johnson, 1975) assume che più specie polimorfiche coesistono e che in questa situazione le femmine androcrome si accoppiano raramente con maschi di specie diverse mentre le femmine ginocrome sono spesso coinvolte in accoppiamenti con maschi eterospecifici; il vantaggio delle femmine androcrome sarebbe compensato da una maggior pressione predatoria in quanto la loro colorazione risulta meno mimetica con l'ambiente.

La "*Male mimicry Hypothesis*" (Robertson, 1985) è basata sul fatto che gli accoppiamenti delle specie del genere *Ischnura* sono particolarmente lunghi ed energeticamente dispendiosi e che un solo avvenimento potrebbe essere sufficiente a fecondare tutte le uova che una femmina può produrre; in base a queste considerazioni le femmine androcrome risulterebbero avvantaggiate dalla loro colorazione che "inganna" i maschi, risparmiando così accoppiamenti non necessari. Anche in questo caso il

vantaggio sarebbe controbilanciato da un maggiore rischio predatorio legato alla colorazione più evidente.

Un'altra ipotesi si basa sulle variazioni del successo riproduttivo legate alla densità di popolazione e alla sex-ratio (Hinneking, 1987) e prende in nome di "*Density-dependent Hypothesis*"; secondo questa teoria in situazioni di alte densità e quando la sex-ratio è sbilanciata verso i maschi le femmine androcrome sono avvantaggiate perché subiscono meno frequentemente le molestie dei maschi che si vogliono accoppiare, mentre a basse densità di maschi sono soggette ad un minor successo riproduttivo ed alcune non riuscirebbero ad accoppiarsi neanche una volta. La situazione risulta opposta per le femmine ginocrome. Secondo questa teoria la sopravvivenza delle femmine sarebbe la stessa, indifferentemente dalla colorazione, ma l'esistenza di variazioni cicliche temporali nella densità di popolazione permetterebbe ai differenti morfotipi di raggiungere un equilibrio evolutivo (Cordero-Rivera & Andrés, 1996).

Altre ipotesi più recenti si concentrano sulla parte etologica di questo fenomeno e sono spesso limitate ad una o a poche specie. In base alla "*Learned Mate Recognition Hypothesis*" la scelta del partner sessuale da parte del maschio sarebbe influenzata dalla frequenza dei morfotipi femminili; questo si traduce in una minore possibilità di accoppiamento per il morfotipo meno frequente in quanti i maschi "imparerebbero" a riconoscere il tipo femminile più numeroso (Sirot *et al.*, 2003; Miller & Fincke, 1999; Van Gossum *et al.*, 2001a; Hinneking, 1987; Van Gossum *et al.*, 2001b).

La "*Female Aggression Hypothesis*" assume invece che i maschi eviterebbero le femmine androcrome in quanto più aggressive delle femmine ginocrome; i maschi quindi, in base a questa teoria, sono in grado di distinguere le femmine androcrome dagli altri maschi ma sono meno disposti ad accoppiarsi con loro perché esse attaccano più facilmente rispetto alle ginocrome (Sirot *et al.* 2003). Infatti, nonostante gli attacchi delle femmine nei confronti dei maschi non siano frequenti negli Odonati, possono talvolta portare a conseguenze fatali (Sirot *et al.* 2003; Cordero 1992; Utzeri, 1980).

Secondo la "*Female Receiver Hypothesis*" la colorazione simile a quella maschile conferirebbe alle androcrome un vantaggio nella competizione tra femmine; in particolare le femmine sarebbero maggiormente incentivate ad abbandonare il sito scelto per la deposizione delle uova se avvicinate da una femmina androcroma piuttosto che da una ginocroma (Sirot *et al.* 2003; Amundsen 2000).

La “*Male Harassment Hypothesis*” (Gosden & Svensson, 2007) propone che i morfotipi femminili differiscono nella loro predisposizione ad accettare un tentativo di accoppiamento e nel loro grado di resistenza nei confronti del tentativo.

Più recentemente due ipotesi evidenziano il ruolo di condizioni fisiologiche interne (maturità sessuale) o esterne (parassitismo) nel mantenimento del polimorfismo. Secondo la “*Sexual Status Signalling Hypothesis*” (Huang & Reinhard, 2012) le femmine sessualmente immature variano la loro colorazione da androcrome a ginocrome per segnalare la maturità sessuale e regolare la riproduzione.

La “*Parasitism Hypothesis*” (Sánchez-Guillén *et al.*, 2013) attribuisce un importante ruolo al parassitismo nella fitness dei morfotipi; secondo questa teoria le femmine androcrome presentano un vantaggio nell’evitare la molestia da parte dei maschi, ma risultano più parassitate delle ginocrome.

Nonostante l’elevato numero di teorie proposte per spiegare il mantenimento del polimorfismo femminile, il significato adattativo di questo fenomeno rimane controverso. Il mantenimento del polimorfismo all’interno di una popolazione è un dilemma evolutivo poiché un leggero vantaggio di uno dei morfotipi potrebbe essere sufficiente a indirizzare la selezione verso l’estinzione dell’altro (Brockmann, 2001). Le conseguenze nella fitness che si ipotizza mantengano il polimorfismo sono difficilmente dimostrabili nelle popolazioni naturali (Fincke, 1994; Wellenreuther *et al.*, 2014), e le differenti ipotesi di solito si intrecciano e sovrappongono.

Gli Odonati, analogamente ad altri insetti, mostrano due differenti fasi durante il loro ciclo vitale. Durante lo sviluppo ontogenico passano da una fase larvale acquatica ad una fase immaginale terrestre. Più frequentemente gli studi che sono stati effettuati hanno esaminato l’effetto del comportamento e/o delle condizioni ambientali sul successo riproduttivo durante la fase immaginale (Corbet, 1980; Van Gossum *et al.*, 2005), mentre pochi studi sono relativi alla fase larvale (Harvey & Corbet, 1985).

L’effetto transgenerazionale del comportamento dell’adulto sulla fitness della sua progenie è stato poco studiato (Thompson *et al.*, 2011).

Nonostante l’elevata frequenza del polimorfismo negli Odonati, pochi studi hanno esaminato la crescita e la sopravvivenza della progenie generata da differenti morfotipi femminili (Bots *et al.*, 2010; Bouton *et al.*, 2011; Abbott & Svensson, 2005; Abbott, 2013).

Questi studi risultano però fondamentali nella comprensione del fenomeno del polimorfismo in quanto la fitness in ultima analisi dipenderà dal modo in cui la selezione opera durante le successive generazioni (Stearns 1992).

In questo studio è stata esaminata la specie *Ischnura elegans* (Odonata: Coenagrionidae), che presenta una femmina androcroma (tipo A) e due femmine ginocrome (*infuscans* o tipo B e *infuscans-obsolata* o tipo C). Questi morfotipi coesistono negli stessi ambienti e la frequenza di ognuno di essi subisce variazioni tra diverse popolazioni nella stessa stagione e tra le stagioni nella stessa popolazione (Gosden & Svensson, 2009; Hammers & Van Gossum, 2008; Svensson & Abbott, 2005).

I campionamenti sono stati effettuati in tre popolazioni di *I. elegans* e sono stati raccolti dati relativi a biometria, sex-ratio, frequenza, successo riproduttivo e presenza di parassiti per i diversi morfotipi. È stata anche testata la preferenza sessuale dei maschi nei confronti dei morfotipi in condizioni controllate attraverso test di scelta binaria. Infine, è stata valutata la fitness dei morfotipi attraverso il monitoraggio del successo di schiusa, della crescita larvale e del successo di sfarfallamento della progenie prodotta da ogni femmina.

In questo studio sono state prese in considerazione diverse ipotesi adattative, tra cui il mimetismo intra-specifico, l'ipotesi relativa a densità di popolazione e sex-ratio e l'ipotesi del parassitismo. Inoltre sono stati presi in considerazione i dati relativi alla progenie allevata in laboratorio al fine di valutare l'importanza dello stadio larvale riguardo alla fitness dei morfotipi.

MATERIALI E METODI

Scheda della specie

Ischnura elegans è una piccola damigella che presenta polimorfismo femminile; in particolare le femmine sono trimorfiche mentre i maschi monomorfici (Dijkstra & Lewington, 2006; Askew, 1988).

L'addome del maschio è dorsalmente nero ad eccezione dell'ottavo segmento che è azzurro; il torace è di colore blu e presenta tre strie longitudinali nere (Figura 1a).

La femmina androcroma (tipo A) ha la stessa colorazione e lo stesso modello di striature del maschio e per questo motivo viene considerata *male mimic* (Figura 1b).

Gli altri due morfotipi femminili, che prendono il nome di femmine ginocrome, presentano l'azzurro sostituito dal verde (*infuscans* o tipo B - Figura 1c) o dal marrone (*infuscans-obsolata* o tipo C - Figura 1d), risultando più criptiche (Cordero et al. 1998). La femmina ginocroma del tipo B presenta le stesse striature nere dei maschi e della femmina androcroma, mentre nella *infuscans-obsolata* mancano le strie laterali (umerali) ed è presente solo la striatura centrale. Per questo motivo la femmina tipo C è identificabile immediatamente dopo lo sfarfallamento, mentre tipo A e B risultano identiche e si differenziano solo alla maturità sessuale quando assumono la colorazione definitiva.

I morfotipi mostrano una forte determinazione genetica in cui il colore è controllato da un singolo locus autosomale con espressione limitata alle femmine nelle specie studiate finora (Cordero-rivera 1989; Sánchez-Guillén et al. 2005; Andres & Cordero 1999; Abbott & Svensson 2005; Gosden & Svensson 2008; Sánchez-Guillén et al. 2011).

In *Ischnura elegans* i tre alleli dei morfotipi formano una dominanza gerarchica, con l'allele del tipo A dominante rispettivamente su B e C, l'allele del tipo B dominante sul C e recessivo su A e l'allele del tipo C recessivo ad entrambi gli altri alleli (Sánchez-Guillén et al. 2005).

Le dimensioni di *Ischnura elegans* variano dai 30 ai 35 mm di cui 3.5-6 mm per il torace e 21-29 mm per l'addome, questo la rende la più grande del suo genere. È una delle specie di libellule più diffuse in Italia (ad eccezione della Sicilia e della Sardegna) ed estende il suo areale in Europa (tranne il nord e la Spagna) e in Asia (fino al Giappone).

In quanto specie pioniera si può trovare in quasi tutti gli ambienti umidi sia in acque calme che in acque correnti di habitat naturali o artificiali ed il suo periodo di volo va da Aprile a Settembre.

Il periodo di volo si estende per un ampio arco da aprile ad ottobre con attività massima nei mesi estivi (Dijkstra & Lewington, 2006).



Figura 1: a - maschio; b - femmina androcroma; b - femmina *infuscans*; c - femmina *infuscans-obsolata*

Area di studio

Le popolazioni esaminate in questo studio sono due zone umide artificiali e una lanca naturale vicino al fiume Po (Alessandria, Italia).

- Lago Altafiore, Castellazzo Bormida AL (44.85785° N, 8.59319° E): si tratta di un lago di 4,4 ettari dedicato alla pesca sportiva, creato artificialmente in seguito a lavori di escavazione ed estrazione. Il bacino presenta acque piuttosto profonde e rive scoscese, con una vegetazione acquatica abbastanza abbondante limitata a circa 1,5 m dalla sponda e alcuni lembi di *Phragmites* sp.

- Cava Allara, Sezzadio AL (44.78991° N, 8.55177° E): è un lago di 15,3 ettari di estensione creato artificialmente per attività estrattiva di ghiaia con sponde debolmente inclinate, acque poco profonde ed una discreta quantità di vegetazione galleggiante e sommersa. Lungo le sponde sono comuni *Phragmites* sp. e *Typha* sp. (Figura 2).

- Lanca di San Bernardo, Valenza AL (45.03701° N, 8.65516° E): la lanca, dell'estensione di 2,8 ettari, presenta acque lentiche con cenosi naturali caratterizzate da abbondante vegetazione galleggiante e differenti specie di vegetazione sommersa. Lungo le sponde sono abbondanti *Carex* sp., *Phragmites* sp., *Juncus* sp. e *Typha* sp. (Figura 3).



Figura 2: area di campionamento presso il Lago Altafiore



Figura 3: aree di campionamento presso Cava Allara; anno 2013 - in alto; anno 2014 - in basso



Figura 4: area di campionamento presso la Lanca di San Bernardo

Metodo di campionamento

Gli insetti sono stati catturati con appositi retini entomologici e marcati con un numero progressivo sull'ala allo scopo evitare di misurare più di una volta lo stesso individuo (Figura 6). I campionamenti sono stati effettuati durante le ore di massima attività degli Odonati, compresa tra le 11 e le 15.

Durante i sopralluoghi sono stati raccolti dati relativi a sesso, morfotipo femminile, età (colorazione da individuo immaturo o maturo) e presenza di parassiti (Figura 5).

Gli Odonati sono comunemente parassitati da gregarine (Protozoi: Gregarinidea) (Córdoba-Aguilar & Munguía-Steyer 2013; Gołąb et al. 2013; Sánchez-Guillén et al. 2013) e ectoparassiti del genere *Arrenurus* (Hassall et al. 2010; Zawal 2006).

In questo studio sono stati considerati esclusivamente gli ectoparassiti in quanto di più facile individuazione e identificazione durante le misurazioni degli individui (Forbes & Robb 2008) evitando di uccidere l'animale per esaminare la presenza di Protozoi (Kaunisto et al. 2015).

Al fine di ottenere le misure di addome, torace e totale ogni individuo marcato è stato fotografato in sito dopo essere stato posto su di un foglio di carta millimetrata (Figura 6); successivamente, in laboratorio, le foto sono state analizzate attraverso un software di elaborazione di immagine che permette di effettuare facilmente misurazioni in pixel convertibili poi in millimetri (ImajeJ vers. 1.48)(Schneider et al. 2012).

GENERALE			MORFO					BIOMETRIA			COMP				NOTE
R	n.	data	M	A	B	C	j/a/o	torace	addome	totale	td	ac	ov	x	P

Figura 5: tabella di campionamento



Figura 6: dall'alto - retino entomologico - misurazione con calibro - foto digitale

Scelta del partner

Per valutare la scelta effettuata dai maschi è stato sono stati rilevati il numero e le dimensioni degli individui rinvenuti in accoppiamento (posizione “a cuore”) e sono stati condotti test di scelta in condizioni standard e controllate.

Durante ogni sopralluogo è stato effettuato un campionamento random (media 30 ind., 7-124 ind.) di individui non accoppiati ed accoppiati. In alcuni casi, al fine di evitare di danneggiare individui rinvenuti in fase di accoppiamento avanzata, se i due individui non si sono separati spontaneamente, sono stati tralasciati marcatura e misurazione e sono stati solo contati.

I test di scelta sono stati effettuati sul campo, nella stessa area in cui sono stati catturati gli individui, utilizzando un insettario composto da una gabbia metallica posata sul suolo e coperta con una zanzariera (60 x 100 x 100 cm). Nell’insettario sono stati posti contemporaneamente un maschio e due femmine di morfotipo differente e sono stati osservati per 30 minuti. Durante questo periodo ogni interazione (grasping, tandem, accoppiamento) tra il maschio e una delle due femmine è stata considerata e segnata come un’indicazione di scelta (Figura 7). In questo studio i maschi non hanno mai approcciato due femmine differenti durante il test.

t	ORE	INDIVIDUI IN GABBIA	INDIVIDUI IN INTERAZIONE	COMPORTAMENTO						NOTE
				SEPARATI	AVVICINAM	CONTATTO	GRASPING	TANDEM	ACCOPPIAM	
DATA:				OSSERVATORE:						
0										
1										
2										
3										
4										
5										
6										

Figura 7: tabella utilizzata per test di scelta

Crescita e sopravvivenza della prole

In questa ricerca è stato utilizzato un metodo standard di laboratorio per valutare la crescita e la sopravvivenza della prole dei differenti morfotipi (Locklin 2012; Cordero 1990; Bots et al. 2010). In campo sono state catturate femmine in fase di accoppiamento e successivamente sono state trasportate in laboratorio all'interno di un insettario. Sono state prese in considerazione, e quindi catturate per l'esperimento, solo femmine del tipo A e del tipo B in quanto le femmine del tipo C sono molto poco diffuse nell'area di studio prescelta.

In laboratorio ogni femmina è stata misurata e fotografata, con metodo analogo alla marcatura in campo, e quindi posta in un bicchiere di plastica contenente una piccolo pezzo di carta bibula assorbente e una piccola quantità d'acqua allo scopo di stimolare la deposizione delle uova (Figura 8). Ogni bicchiere è stato chiuso con un piccolo quadrato di zanzariera e le femmine sono state lasciate circa 20 h in condizioni di luce artificiale con fotoperiodo 16 - 8h L-D; durante questo periodo ogni femmina ha deposto le sue uova sul foglio di carta bibula assorbente (Figura 9). Una volta avvenuta la deposizione delle uova ogni foglietto di carta è stato posto singolarmente in piatti di plastica contenenti acqua naturale nelle stesse condizioni di illuminazione.

Dopo circa 12-15 giorni ha avuto inizio la schiusa delle uova e le larve sono state nutrite giornalmente con nauplii di *Artemia salina*. Una volta a settimana le larve sono state poste in piastre petri con carta millimetrata e misurate con una precisione di 0,25 mm con l'ausilio di uno stereo microscopio (Figura 10). Per valutare il tasso di mortalità le larve sono state conteggiate tre volte a settimana.

Per poter distinguere la prole di ogni femmina gli individui sono stati fatti sfarfallare in piccoli insettari di zanzariera costruiti intorno ad ogni piatto (Figura 11). Una volta conclusa la fase di sfarfallamento i giovani individui sono stati posti in insettari, separati in base al sesso, dove gli sono state nutrite ad libitum con *Drosophila sp.*. Dopo circa 24 h, appena l'esoscheletro e la superficie alare risultava sufficientemente indurita, gli individui sono stati marcati e fotografati. Dopo tre giorni, tempo in cui avviene il passaggio dalla colorazione immatura a quella definitiva, è stato valutato e registrato il morfotipo di ogni femmina.



Figura 8: femmine in deposizione



Figura 9: uova deposte sulla carta bibula

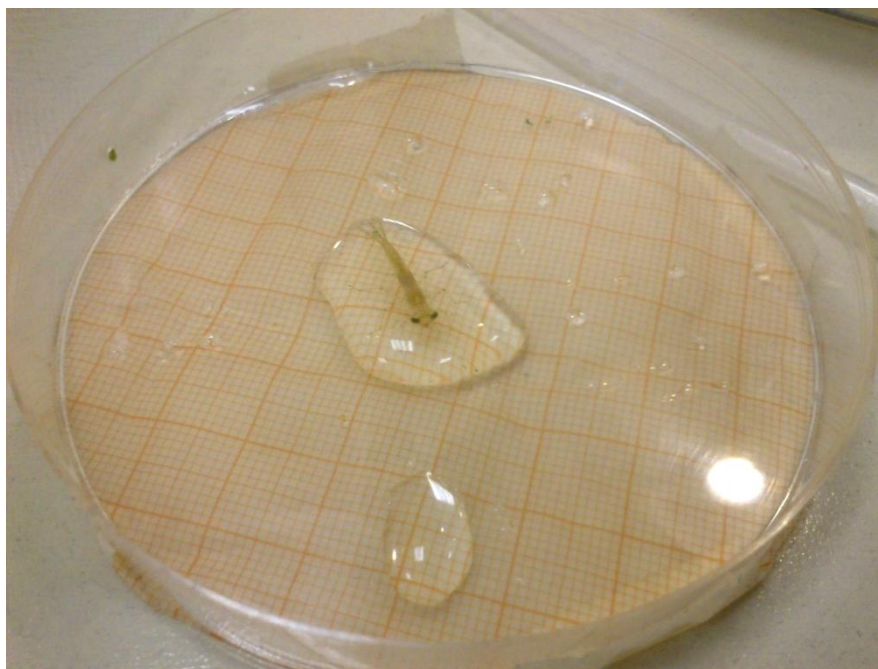


Figura 10: larva in fase di misurazione

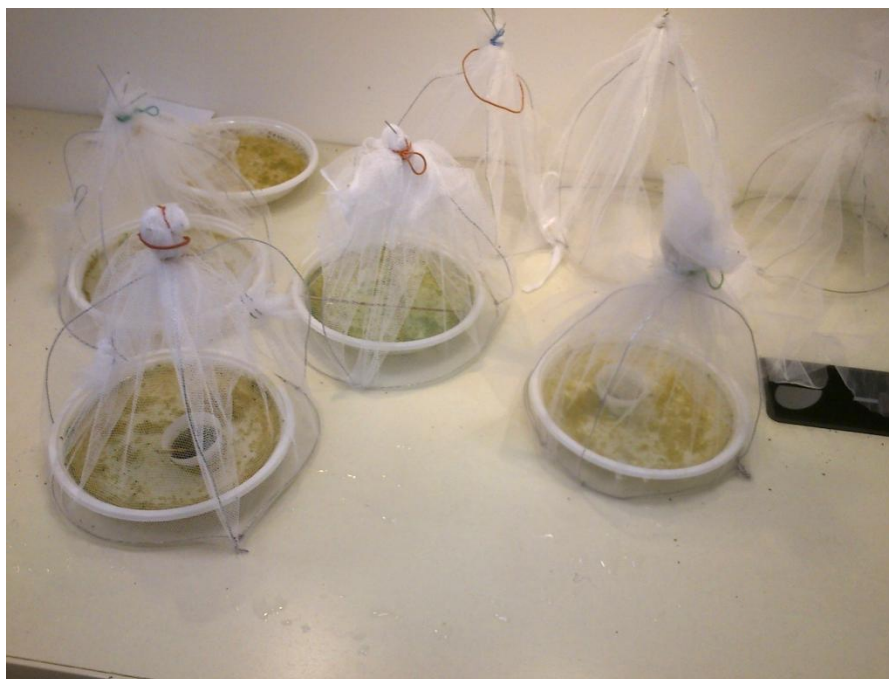


Figura 11: insettari per sfarfallamento

Statistica

Per l'analisi statistica dei dati è stato utilizzato il software R (R core Team 2015). Nelle analisi in cui la variabile indipendente era categorica (es. sesso, morfotipo, località) è stata fatta un'ANOVA.

Negli altri casi sono stati eseguiti modelli lineari generalizzati (GLM) immettendo come variabile dipendente la lunghezza degli individui e come variabile indipendente variabili categoriche (es. accoppiamento, parassitismo) o variabili continue (tempo).

Per confrontare la sopravvivenza delle larve è stato usato il "modello di sopravvivenza" implementato nel pacchetto "R survival" (Therneau, 2012). Le femmine, nell'analisi dei dati sono state inserite come "Random Effect" tramite l'opzione "frailty".

RISULTATI

Abbondanza dei morfotipi in campo

La sex-ratio osservata in campo è risultata sbilanciata verso i maschi in tutte le popolazioni considerate. I valori rilevati sono inferiori a inizio stagione, tra giugno e luglio, mentre sono decisamente maggiori verso la fine della stagione, tra agosto e settembre (Grafico 1; Tabella1). La sex ratio non differisce significativamente tra i siti (Tabella2).

E' stata osservata una differenza significativa nella frequenza dei tre morfotipi femminili ($X^2 = 202.8$; $P < 0.001$, $N = 410$). Il morfotipo A è risultato il più abbondante (61,0 %), seguito dal morfotipo B (35,4%) e dal morfotipo C rinvenuto in numeri nettamente inferiori (3,7 %). Le femmine androcrome sono costantemente più abbondanti durante tutta la stagione di campionamento (maggio: $X^2 = 218,5$ $P < 0,001$; giugno: $X^2 = 211,1$ $P < 0,001$; luglio: $X^2 = 210,0$ $P < 0,001$) (Grafico 2).

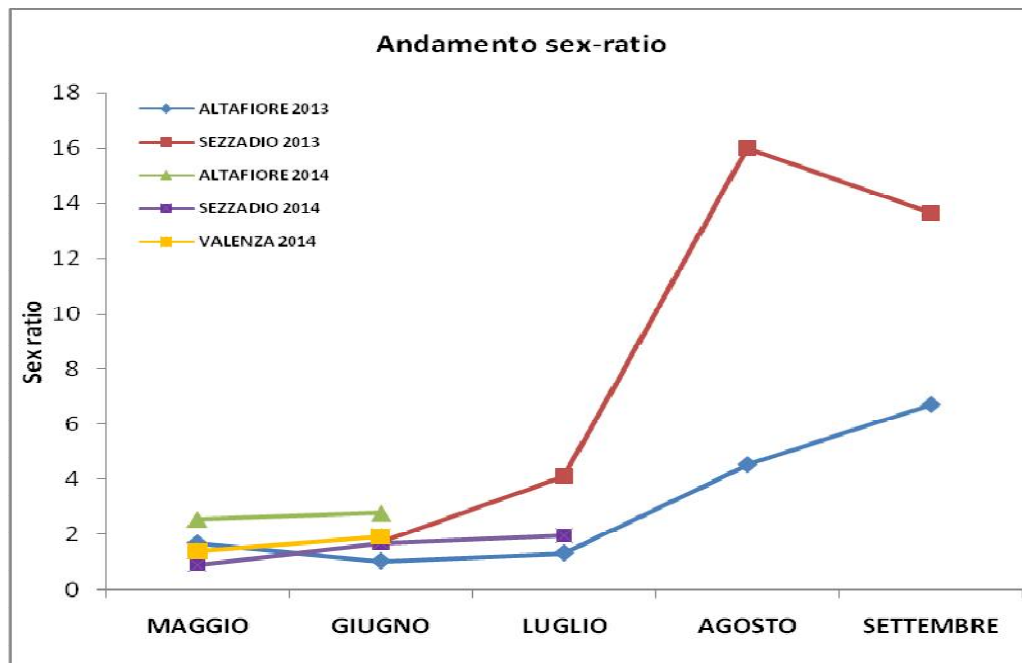


Grafico 1: andamento della sex-ratio nei siti studiati durante le stagioni 2013 e 2014

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	1.6614	0.2816	5.899	3.66e-09 ***
Mese . [T.GIU]	-0.7451	0.2984	-2.497	0.012527 *
Mese . [T.LUG]	-1.0651	0.3212	-3.316	0.000914 ***
Mese . [T.MAG]	-2.3545	0.3596	-6.547	5.86e-11 ***
Mese . [T.SET]	0.6187	0.3749	1.650	0.098862

Tabella 1: sex-ratio relativamente al mese di campionamento

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	926.36186	288.15526	3.215	0.00131 **
LOC. [T.Sezzadio]	0.15791	0.14646	1.078	0.28096
LOC. [T.Valenza]	-0.07666	0.26946	-0.285	0.77603

Tabella 2: sex-ratio relativamente alla località

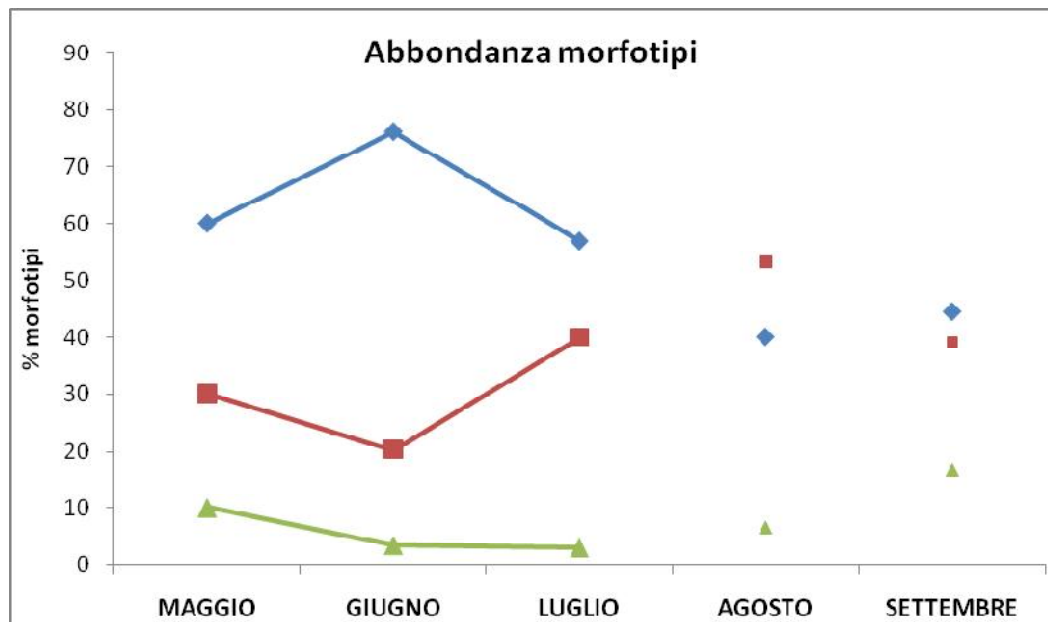


Grafico 2: abbondanza dei morfotipi durante la stagione riproduttiva. *Nei punti non collegati l'N è basso.

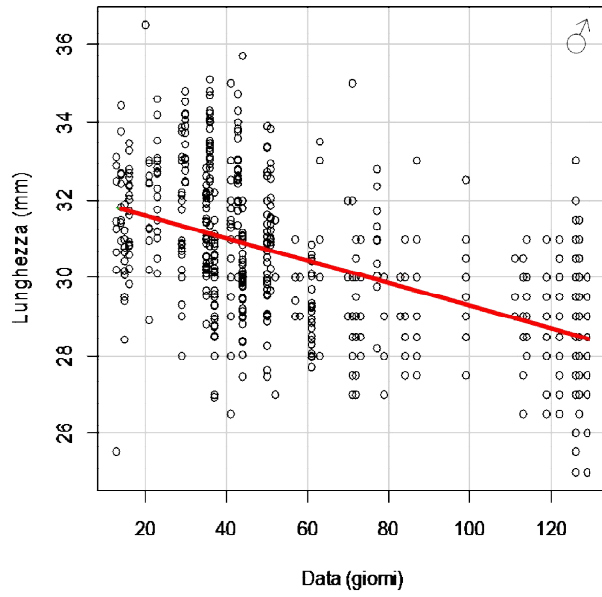


Grafico 3: trend stagionale dimensioni dei maschi

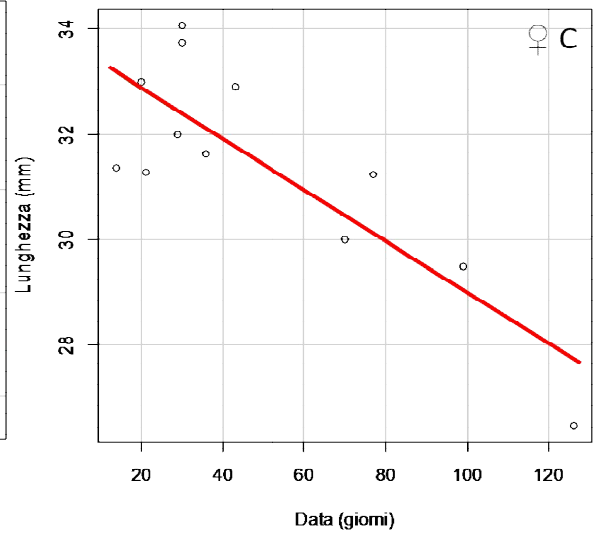
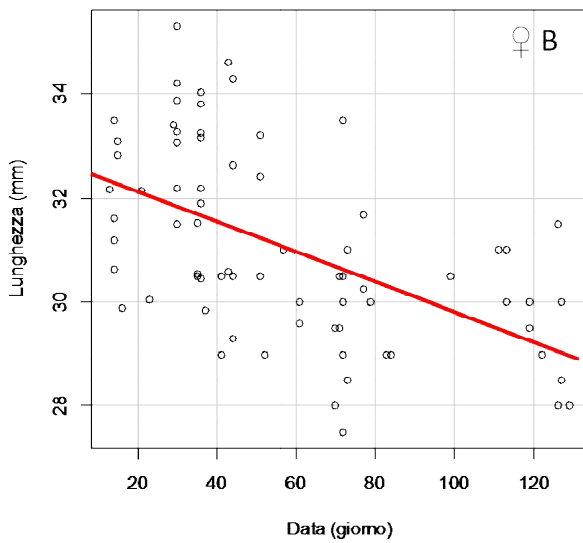
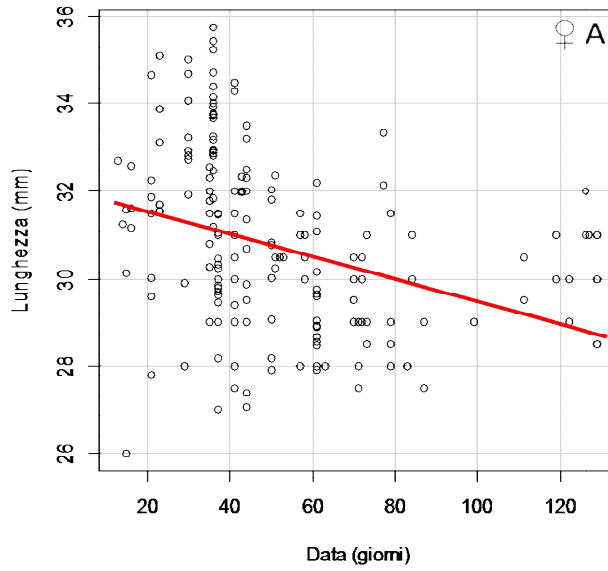


Grafico 4: trend stagionale dimensioni delle femmine A (in alto) B (a sinistra) e C (a destra)

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	32.179394	0.128038	251.326	< 2e-16 ***
JULIAN	-0.031931	0.001496	-21.337	< 2e-16 ***
LOC. [T.Sezzadio]	0.833854	0.126207	6.607	7.57e-11 ***
LOC. [T.Valenza]	-0.621000	0.168149	-3.693	0.000238 ***

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	31.812274	0.330813	96.164	< 2e-16 ***
JULIAN	-0.026270	0.005088	-5.163	6.39e-07 ***
LOC. [T.Sezzadio]	1.548091	0.300496	5.152	6.73e-07 ***
LOC. [T.Valenza]	-0.697083	0.362898	-1.921	0.0563

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	31.927007	0.386832	82.535	< 2e-16 ***
JULIAN	-0.026791	0.004948	-5.414	7.95e-07 ***
LOC. [T.Sezzadio]	1.349017	0.357303	3.776	0.000328 ***
LOC. [T.Valenza]	0.950102	0.488725	1.944	0.055854 .

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	33.511935	0.517826	64.717	3.62e-12 ***
JULIAN	-0.064314	0.009858	-6.524	0.000183 ***
LOC. [T.Sezzadio]	1.661934	0.632299	2.628	0.030253 *
LOC. [T.Valenza]	2.517714	0.966333	2.605	0.031352 *

Tabella 3: risultati statistici dei trend stagionali di (dall'alto) maschi, femmine A, femmine B e femmine C

Si può osservare che sia i maschi (Grafico 3) che le femmine (Grafico 4) presentano un trend stagionale relativo alle dimensioni; in particolare gli individui risultano di dimensioni significativamente inferiori a fine stagione (Tabella 3).

Scelta del partner

In condizioni naturali le femmine ginocrome B sono state osservate in numero significativamente maggiore in fase di accoppiamento rispetto alle femmine androcrome (Grafico 5). Le femmine ginocrome del tipo C sono state escluse dalle statistiche in quanto troppo rare nell'area di studio.

Durante i test di scelta, effettuati osservando per 30 minuti un maschio e due femmine di morfotipo A e B, la preferenza per le femmine ginocrome è stata ribadita; i maschi infatti hanno preferito per il 70% l'accoppiamento con la femmina B.

Il fatto che i maschi aumentino in numero progressivamente durante la stagione riproduttiva, causando variazioni nella sex-ratio, non influenza la frequenza degli accoppiamenti con i due morfotipi, che resta costante per il periodo considerato.

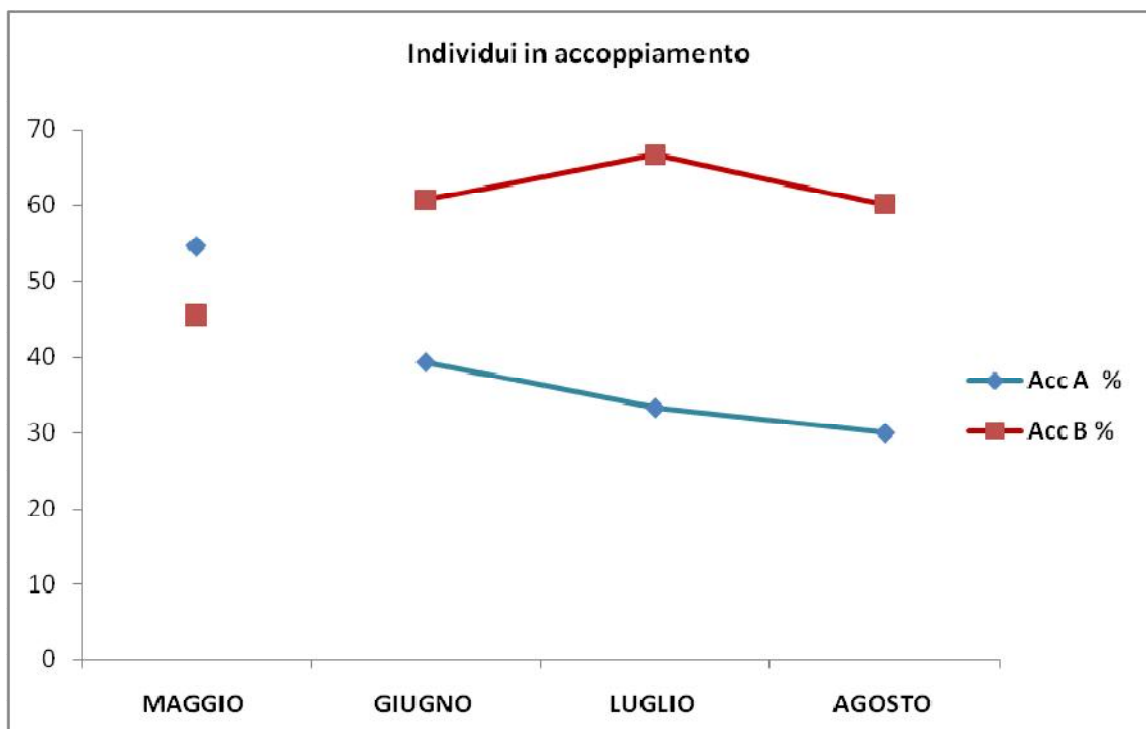


Grafico 5: percentuale di individui rinvenuti in accoppiamento dei morfotipi A e B. Logit: effect of month = 0.560, Z = 4.159; P < 0.001. Logit: effect of morph, A-type = -1.767, Z = -5.859; P < 0.001.

*nel mese di agosto sono inclusi alcuni dati di inizio settembre; il mese di maggio non è evidenziato perché presenta un N troppo basso.

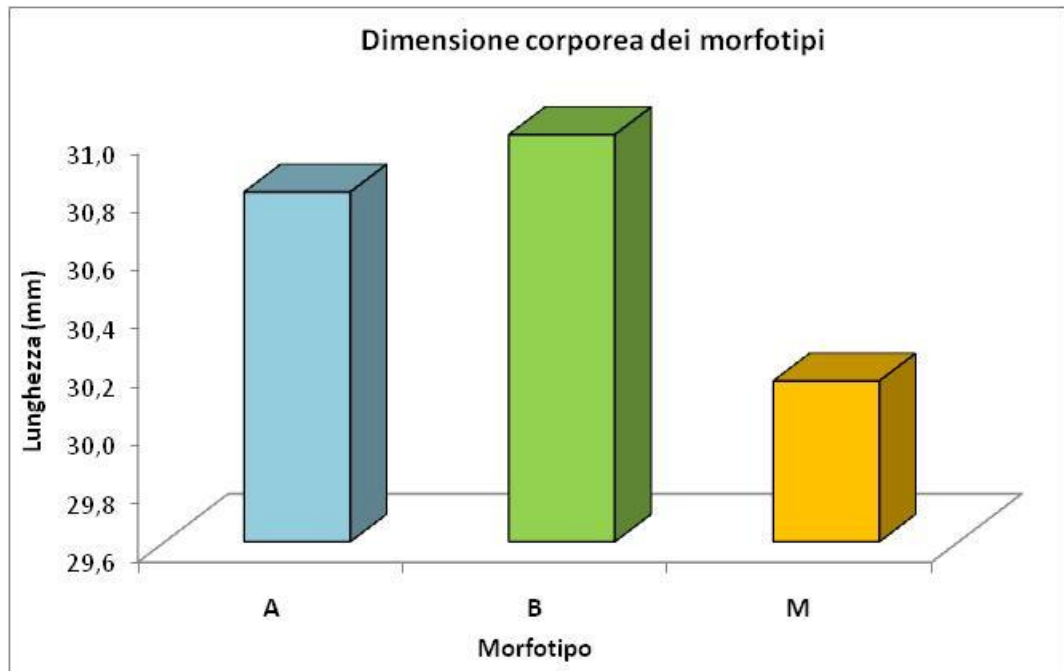


Grafico 6: lunghezza totale per morfotipo ($F = 17.798$, $P < 0.001$, $N = 1004$)

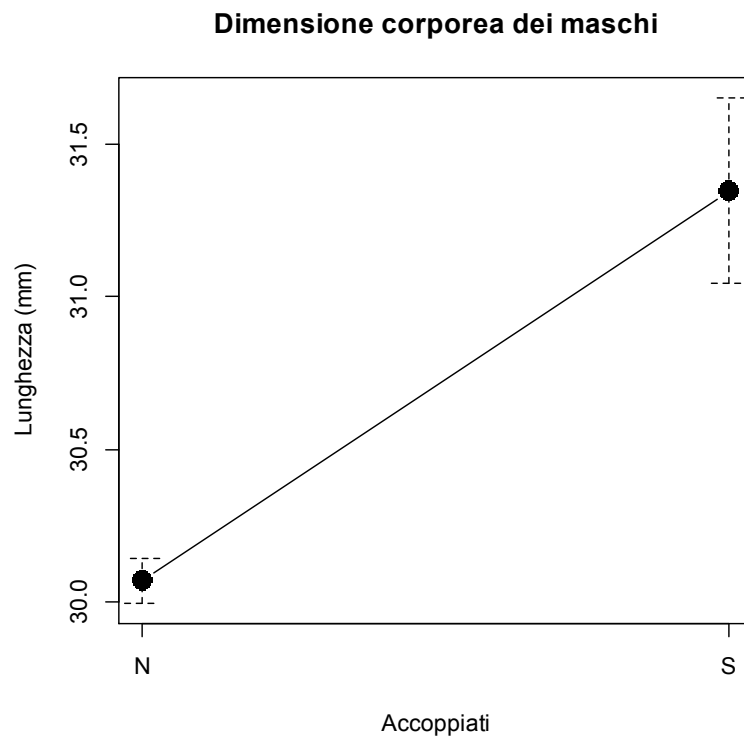


Grafico 7: andamento lunghezza totale in maschi accoppia individui trovati liberi. ($F = 20.02$, $P < 0.001$, $N = 733$)

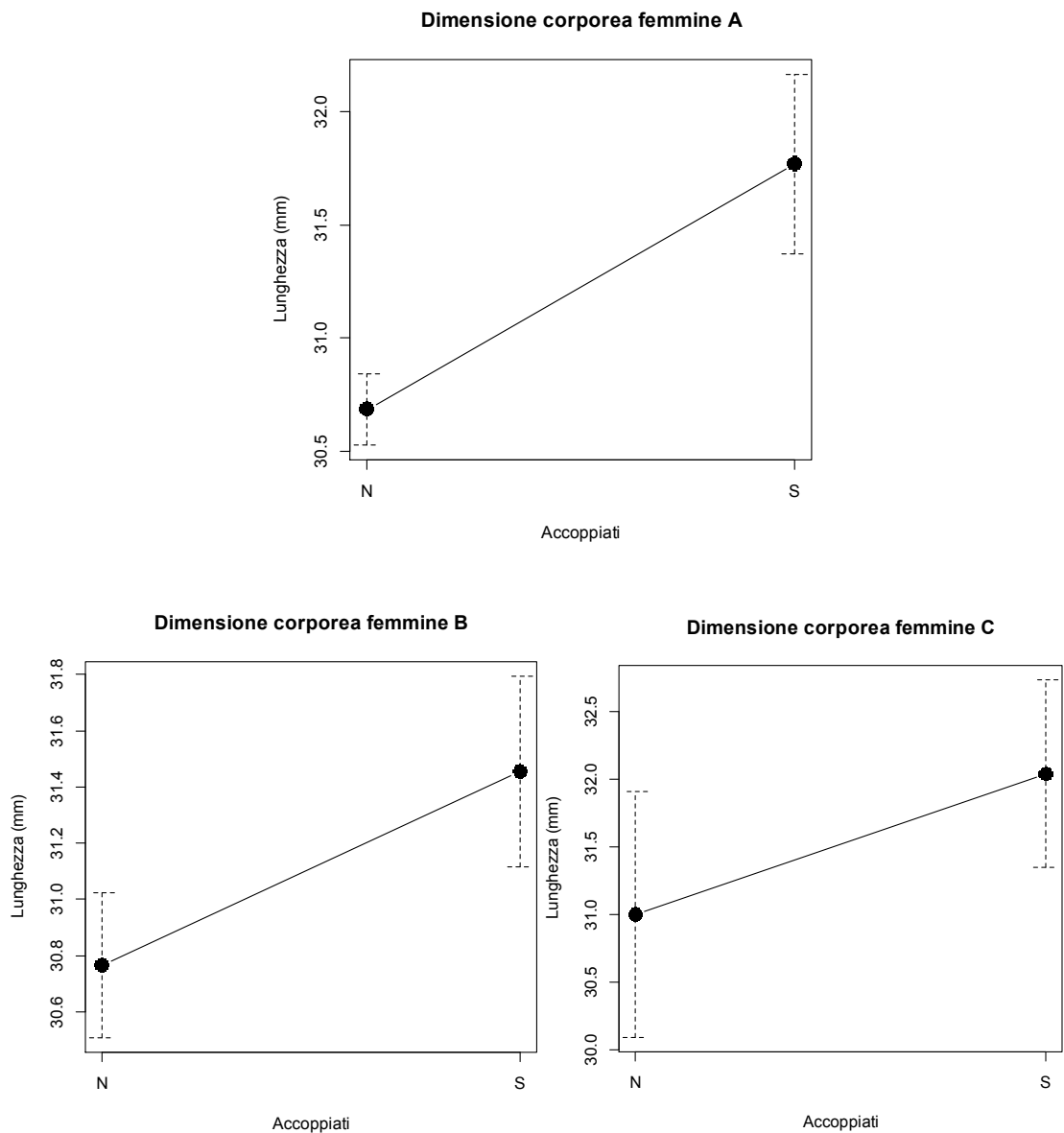


Grafico 8: andamento lunghezza totale di femmine A (F = 3.548 , P = 0.02, N = 184), B (F = 2.694, P = 0.373, N = 75) e C (F = 0.71, P = 0.419, N = 12)

Per quanto riguarda l'analisi delle dimensioni degli individui marcati i maschi sono risultati più piccoli delle femmine e le femmine ginocrome B sono significativamente più grandi rispetto alle femmine androcrome (Grafico 6). Anche in questa analisi le femmine ginocrome C non sono state inserite in quanto in numero non sufficiente ad effettuare una statistica.

Inoltre gli individui maschi rinvenuti in accoppiamento sono risultati di dimensioni maggiori rispetto agli individui non accoppiati (Grafico 7 e 8).

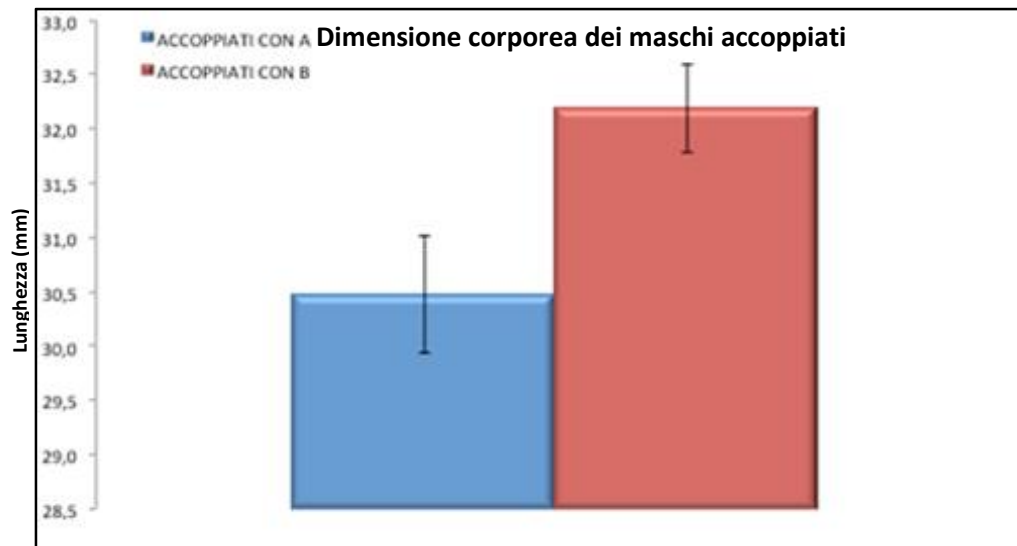


Grafico 9: dimensioni medie dei maschi accoppiati con i due morfotipi. t-test: $t = 1.985$, $P = 0.029$, $N = 28$

Infine i maschi accoppiati con le femmine B risultano significativamente più grandi di quelli accoppiati con le femmine A (Grafico 8).

Parassiti

Come si evidenzia nel Grafico 10 il grado di parassitismo è risultato più alto all'inizio della stagione riproduttiva, in particolare nel mese di giugno, mentre è stata osservata una significativa diminuzione a settembre.

I maschi sono meno parassitati delle femmine ($\chi^2=18,63$; $p<0,01$); le femmine nel loro insieme sono risultate significativamente più parassitate rispetto ai maschi anche se si può notare che questa differenza è dovuta prevalentemente al contributo delle femmine androcrome (Grafico 11).

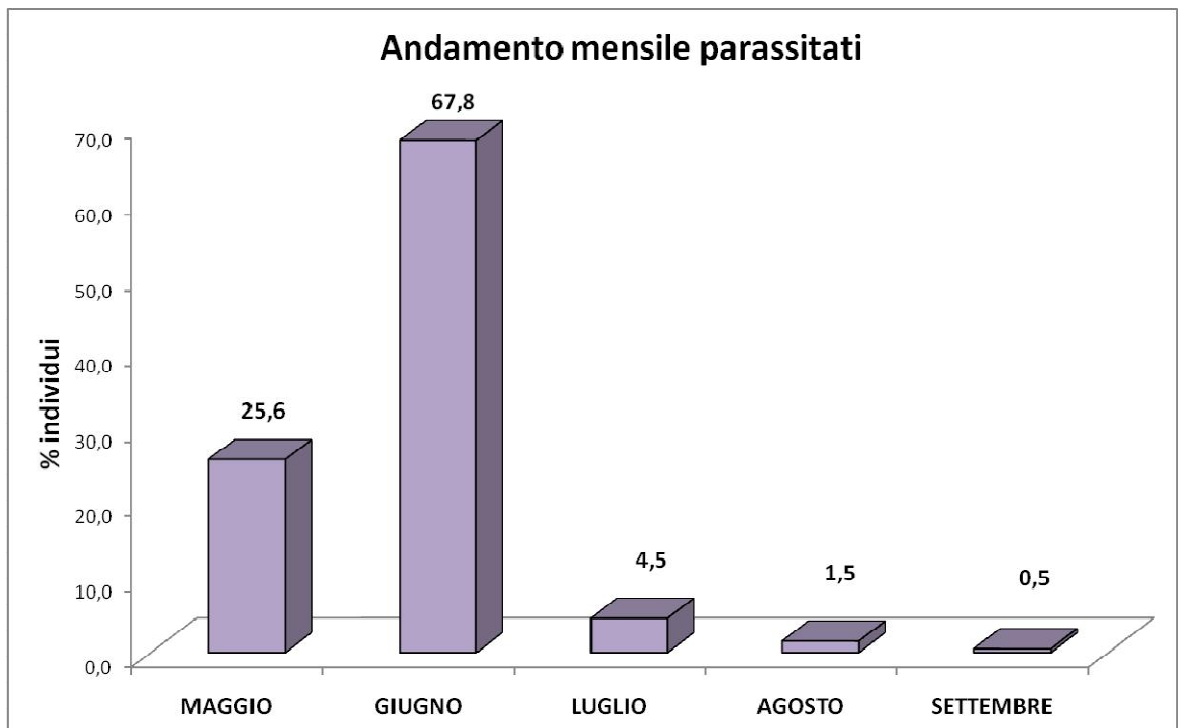


Grafico 10: percentuale degli individui parassitati per mese

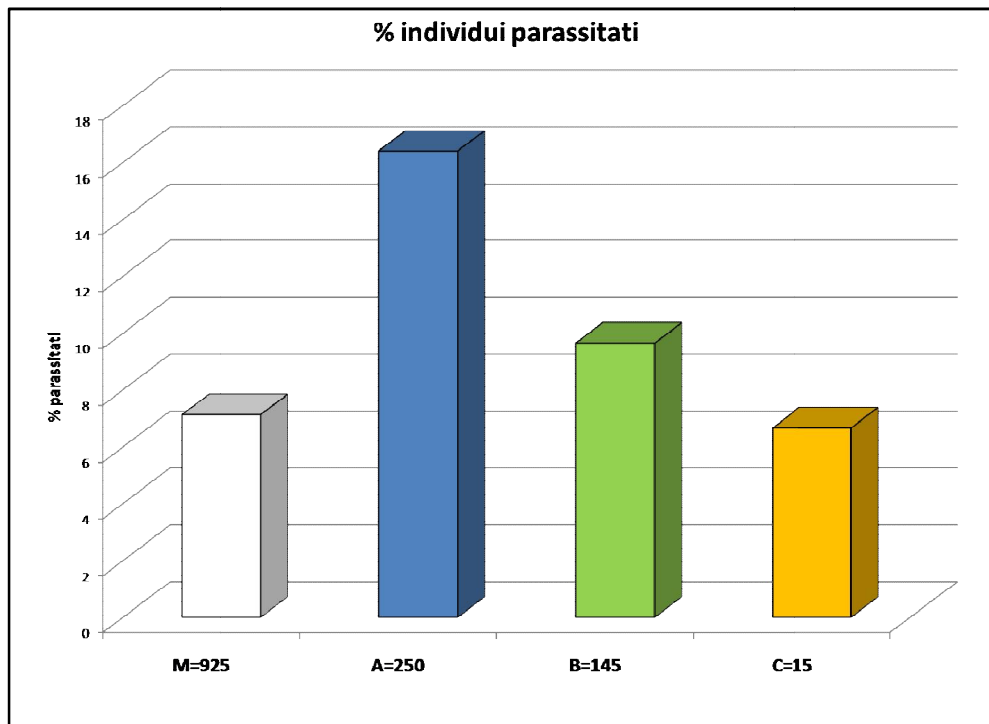


Grafico 11: percentuale degli individui parassitati per sesso e morfotipo

Dal Grafico 12 risulta evidente che i maschi parassitati presentano una lunghezza totale inferiore rispetto a quelli liberi da parassiti.

Pur presentando barre di errore piuttosto ampie, probabilmente dovuti ad un numero inferiore di individui rinvenuti, si conferma l'andamento riscontrato ad Altafiore in cui i maschi parassitati hanno lunghezza totale inferiore a quelli liberi anche a Valenza (Grafico 12-13).

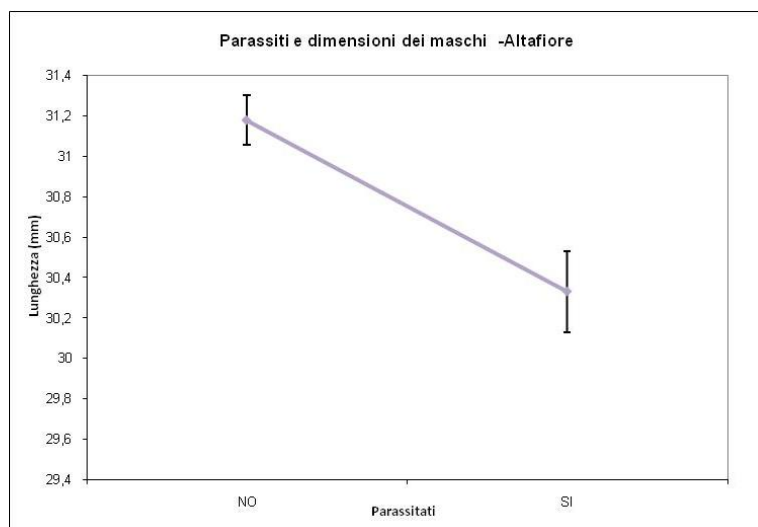


Grafico 12: lunghezza totale dei maschi parassitati ad Altafiore
($F = 11.407$, $P < 0.001$, $N = 200$)

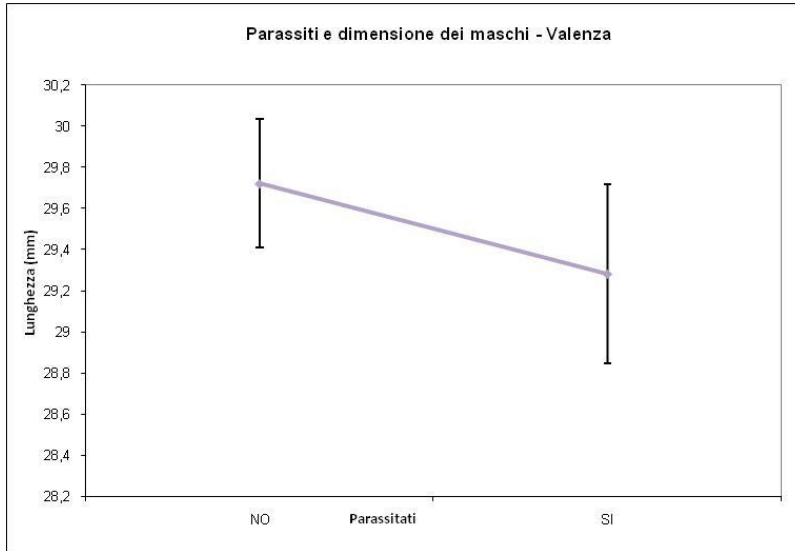


Grafico 13: lunghezza totale maschi parassitati a Valenza (F = 2.112, I 0.149, N = 107)

Analogamente anche le femmine androcrome parassitate presentano dimensioni inferiori rispetto a quelle prive di parassiti (Grafico 14); per quanto riguarda le femmine B i valori, pur non statisticamente significativi, evidenziano comunque la tendenza generale degli individui parassitati ad avere dimensioni inferiori.

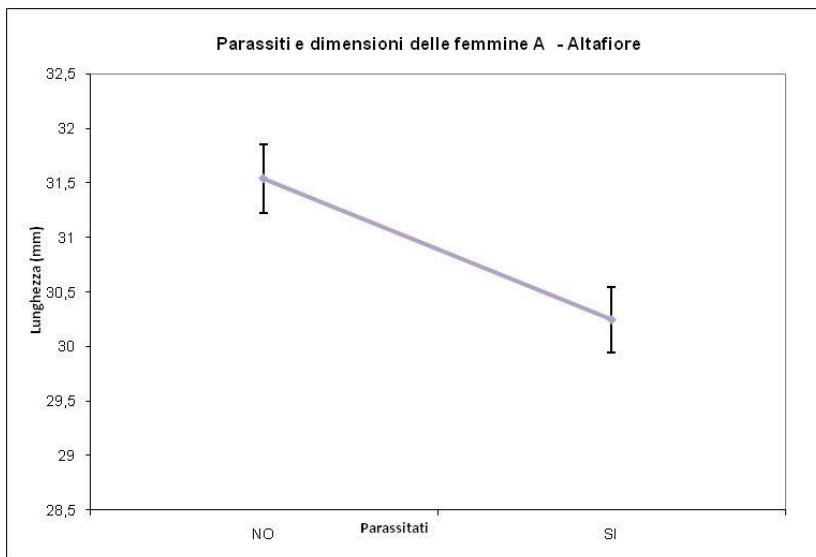


Grafico 14: lunghezza totale femmine A parassitate ad Altafiore (F = 9.089, P = 0.004, N = 53)

Infine è stato osservato che tra gli individui catturati quelli parassitati hanno una percentuale di accoppiamento bassa, significativamente inferiore al valore (36.6%) osservato negli individui privi di parassiti ($\chi^2 = 37.9$; $P < 0.001$) (Tabella 4).

		Non accoppiati	Accoppiati
MASCHI	Non parassitati	579	124
	Parassitati	107	7
FEMMINE A	Non parassitati	110	48
	Parassitati	62	2
FEMMINE B	Non parassitati	31	68
	Parassitati	13	7
FEMMINE C	Non parassitati	6	7
	Parassitati	1	0

Tabella 4: individui parassitati e non, rinvenuti in accoppiamento. CHI SQUARE - maschi=9.633 $p < 0.01$; femmine A=19.39 $p < 0.01$; femmine B=8.103 $p < 0.01$; femmine C=1.08 n.s.

Tasso di schiusa, mortalità e sopravvivenza della prole

Dai dati relativi alla schiusa delle uova deposte dalle diverse femmine è risultato che le uova prodotte da femmine del morfotipo B sono schiuse in numero minore (N=3321; schiuse = 71,6%) rispetto a quelle prodotte dal morfotipo A (N=1937; schiuse = 75,1%) (Tabella 5).

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	1.10206	0.05252	20.984	< 2e-16 ***
MORFO [T.B]	-0.17563	0.06512	-2.697	0.00699 **

Tabella 5: risultati statistici relativi alla schiusa delle uova prodotte da femmine dei morfotipi A e B

Inoltre, come si evince dal Grafico 15, la prole delle femmine appartenenti al morfotipo B presentano una mortalità statisticamente maggiore rispetto alla prole delle femmine del morfotipo A.

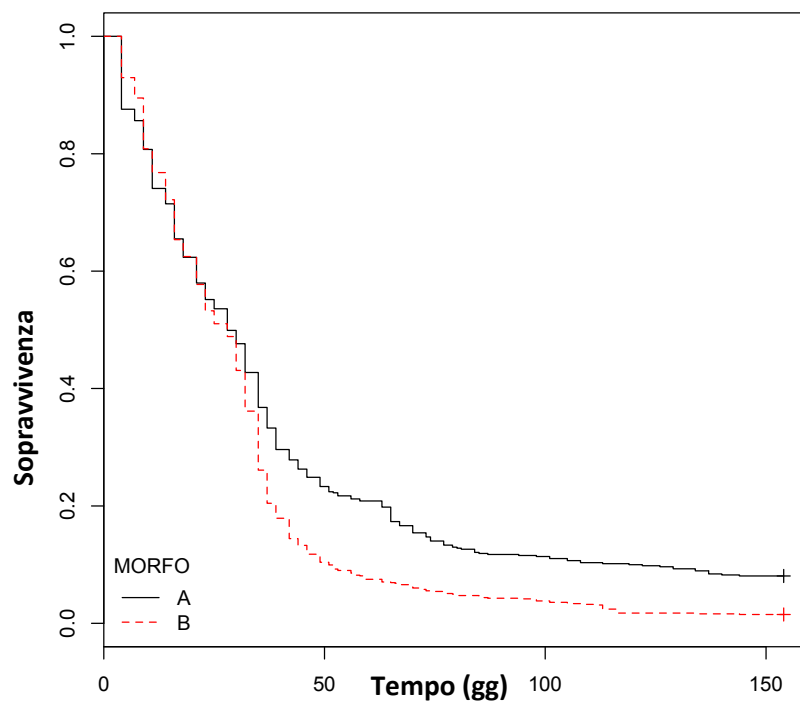


Grafico 15: andamento della mortalità della prole del morfotipo A e del morfotipo B. Chisq= 31.2 su un grado di libertà, $p < 0.01$

	figli di A	figli di B
N sfarfallati	75	96
% sfarfallati	2,57	1,77

Tabella 6: percentuale di individui sfarfallati per morfotipo della madre.

Come si può evincere dalla Tabella 6 la percentuale di larve che ha raggiunto lo sfarfallamento è significativamente maggiore per la prole delle femmine androcrome rispetto alla progenie delle femmine ginocrome B (Chi square = 5,86; $p < 0,05$).

I dati relativi alla crescita della prole derivante dai due morfotipi non hanno evidenziato differenze significative (Grafico 16).

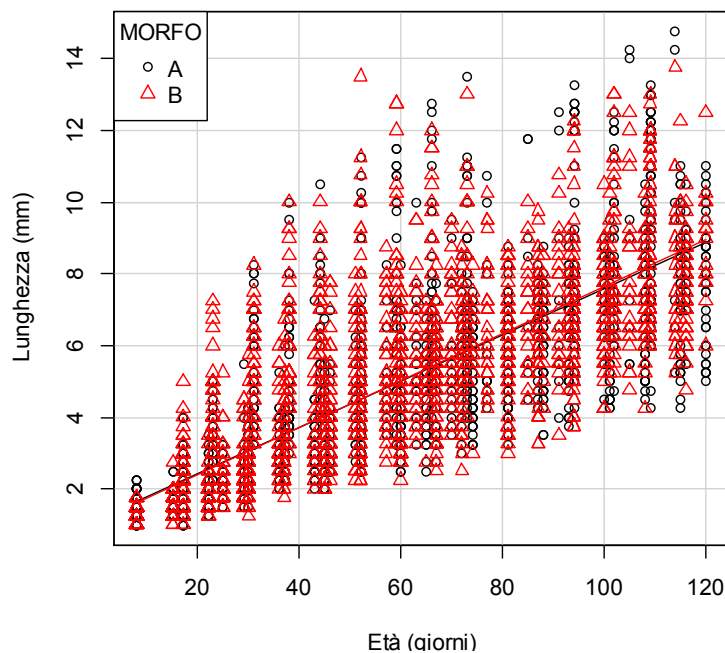


Grafico 16: andamento della crescita delle larve derivanti dai due morfotipi

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	1.096510	0.050463	21.73	<2e-16 ***
ETA	0.065138	0.000672	96.93	<2e-16 ***
MORFO [T . B]	0.006077	0.043258	0.14	0.888

Tabella 7: confronto statistico della crescita delle larve derivanti dai morfi A e B

Le analisi statistiche effettuate relativamente alle dimensioni degli individui sfarfallati non hanno rilevato differenze tra gli sfarfallati derivanti dalle madri dei due morfotipi né tra i sessi degli sfarfallati (Grafico 16 - Tabella 6).

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	27.8444	0.4858	57.315	<2e-16 ***
Morfo_Madre [T.B]	0.8484	0.6227	1.363	0.1787
SEX_FIGLI [T.M]	0.3856	0.5850	0.659	0.5126
Morfo_Madre [T.B] :				
SEX_FIGLI [T.M]	-1.4517	0.7972	-1.821	0.0741

Tabella 8: dati statistici relativi alle dimensioni degli individui sfarfallati

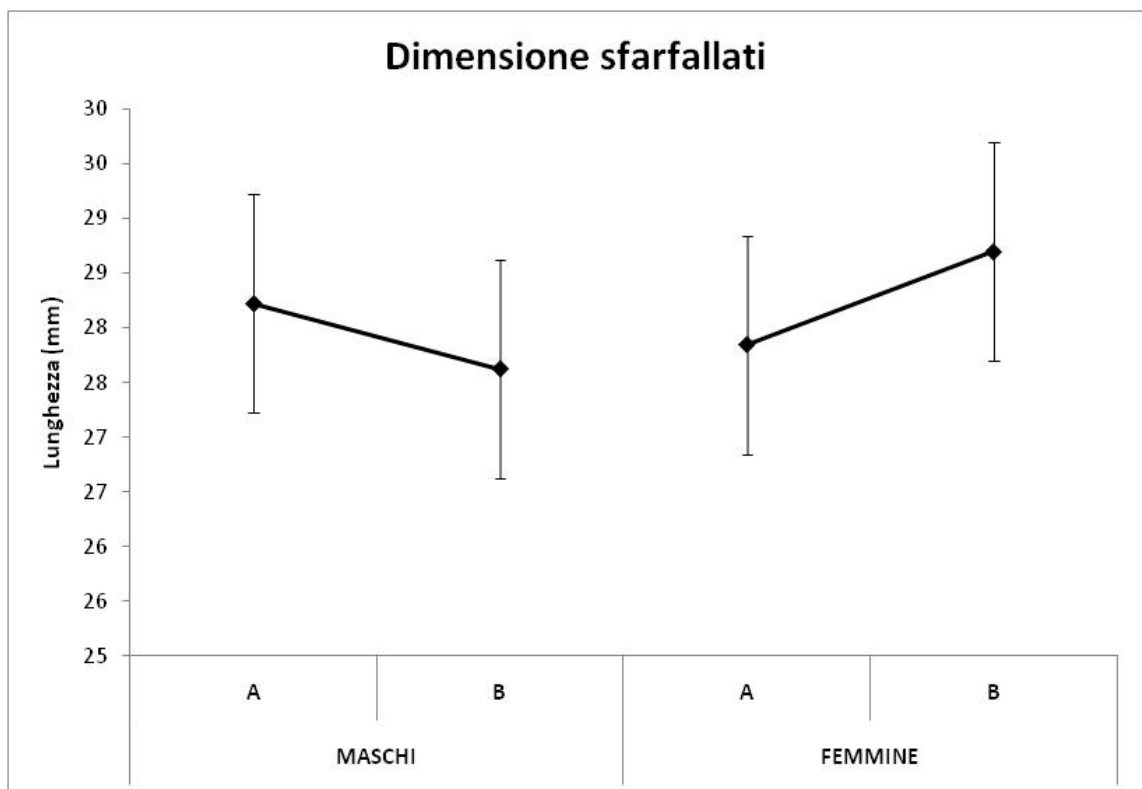


Grafico 16: dimensioni degli individui sfarfallati

DISCUSSIONE

In questa ricerca è risultato che in tutte le popolazioni prese in considerazione le femmine androcrome della specie *Ischnura elegans* sono presenti in percentuali significativamente maggiori. Questo dato contrasta con quanto osservato nella maggior parte degli Odonati (Fincke *et al.*, 2005), ma è in accordo con altri studi effettuati sulla medesima specie (Cordero *et al.*, 1998; Sanchez-Guillén *et al.*, 2011).

Nonostante la femmine androcrome siano il morfotipo dominante nelle popolazioni considerate, analizzando i dati relativi agli accoppiamenti, è risultato che le femmine ginocrome *infuscans* presentano un maggiore successo riproduttivo, in particolare sono state osservate in quantità significativamente maggiori in fase di accoppiamento. Questo dato è stato confermato anche in altri studi (Cordero-Rivera & Sánchez-Guillén, 2007; Cordero *et al.*, 1998; Abbott & Svensson, 2005; Sirot *et al.*, 2003; McKee *et al.*, 2005; Hammers *et al.*, 2009) e rappresenta una prova a favore dell'ipotesi del Mimetismo Intraspecifico. Questa ipotesi infatti prevede che, considerato che nelle specie del genere *Ischnura* è sufficiente un accoppiamento per fecondare tutte le uova prodotte da una femmina, le androcrome risultano avvantaggiate dalla colorazione analoga a quella del maschio in quanto evita a questo morfotipo accoppiamenti inutili ed energeticamente dispendiosi. Inoltre è verificato che, oltre la colorazione, le femmine androcrome presentano anche un comportamento analogo a quello dei maschi; infatti si posano ad altezze analoghe a quelle dei maschi, passano meno tempo nascoste nella vegetazione e volano meno rispetto alle ginocrome (Cordero *et al.*, 1998; Van Gossum *et al.*, 2001; Andrés *et al.*, 2002).

Le analisi delle dimensioni degli individui catturati hanno rivelato differenze statisticamente significative tra i sessi e i morfotipi. In particolare i maschi sono risultati più piccoli delle femmine; questo dimorfismo sessuale è comune nelle damigelle e nelle specie non territoriali come *I. elegans* (Corbet, 1999; Cordero, 1992). Come discusso da Abbott & Svensson (2008) la differenza di dimensioni tra i sessi è probabilmente il risultato di una selezione per proterandria (i maschi emergono prima durante la stagione riproduttiva), dal momento che i maschi sono in competizione per le femmine. In effetti studi precedenti hanno dimostrato che i maschi di piccole dimensioni possono avere un maggior successo riproduttivo in alcune popolazioni (Cordero *et al.* 1997; Carchini *et al.*,

2000). Per contro questa differenza di successo riproduttivo a favore dei maschi più piccoli non è sempre presente, poiché in altri casi è stata osservata una correlazione positiva tra le dimensioni ed il successo riproduttivo dei maschi, come ad esempio in *Coenagrion puella* (Harvey & Walsh, 1993), in alcune damigelle tropicali (Fincke, 1992) ed in altre specie non territoriali (Sokolovska *et al.*, 2000; Thompson & Fincke, 2002).

L'ipotesi della nascita anticipata dei maschi è in linea con i risultati ottenuti in questo studio relativamente alla sex-ratio e alla dimensione dei maschi. Analogamente ad altri studi effettuati su popolazioni ad alte densità, come quelle considerate in questa ricerca (Cordero, 1992), la sex-ratio risulta fortemente sbilanciata verso i maschi; inoltre presenta un trend stagionale in aumento verso la fine della stagione riproduttiva (Cordero, 1988).

I dati relativi alla dimensione evidenziano un trend stagionale secondo il quale gli individui osservati a fine stagione sono più piccoli di quelli osservati all'inizio. Questo andamento potrebbe essere correlato con una diminuzione dell'attività riproduttiva nel periodo finale della stagione (Cordoba-Aguilar, 2009) e potrebbe quindi rappresentare un modo per mantenere inalterata la frequenza di accoppiamento. Questo dato concorda con uno studio effettuato sulla specie *Coenagrion mercuriale* (Purse & Thompson, 2003) in cui è stato riscontrato lo stesso tipo di andamento; in questa ricerca si suggerisce che potrebbe esserci una relazione tra l'aumento di massa corporea di individui adulti e il ritardo nella riproduzione; all'inizio della stagione alle larve piccole conviene aumentare in massa e pagare il costo di una riproduzione ritardata; più avanti nella stagione i costi superano i benefici.

Come si può evincere dai risultati sono state osservate differenze significative nelle dimensioni dei morfotipi; in particolare le femmine ginocrome *infuscans* risultano di dimensioni significativamente maggiori rispetto alle femmine androcrome; inoltre i maschi accoppiati con femmine *infuscans* presentano dimensioni significativamente maggiori rispetto a quelli accoppiati con femmine androcrome. Le dimensioni maggiori potrebbero essere parzialmente responsabili del successo riproduttivo di questo morfotipo (Abbott & Gosden, 2009; Iserbyt *et al.*, 2011; Purse & Thompson, 2003; Sokolovska *et al.*, 2000). Altri studi, infatti, indicano che per le femmine è probabile che la

fecondità sia influenzata dalla dimensione del corpo più che dai tempi di emersione (Gribbin & Thompson, 1990; Cordero, 1991; Morbey & Ydenberg, 2001).

Queste differenze supportano l'ipotesi del mimetismo intraspecifico in quanto le ridotte dimensioni delle femmine androcrome le rendono più simili al loro modello, cioè i maschi; inoltre l'evitamento di continui tentativi di accoppiamento può in parte compensare il ridotto successo riproduttivo delle femmine androcrome (Iserbyt *et al.*, 2011).

Gli Odonati sono frequentemente parassitati da idracari del genere *Arrenurus* (Forbes, 1991; Joop *et al.*, 2006; Zawal, 2006); durante i campionamenti delle popolazioni naturali sono stati raccolti dati relativi alla presenza/assenza di parassiti sugli individui marcati.

Le analisi statistiche effettuate hanno evidenziato differenze significative nel numero di individui parassitati tra i sessi e tra i morfotipi femminili; in particolare i maschi sono risultati meno parassitati delle femmine, mentre tra le femmine le androcrome sono risultate più parassitate delle ginocrome *infuscans*.

Numerosi studi hanno evidenziato una relazione inversa tra il grado di parassitismo ed il successo riproduttivo di ospiti maschi (Read, 1988; Jaenike, 1988; Borgia & Collis, 1989). I risultati di questo studio differiscono rispetto a quanto osservato in altre specie nelle quali la presenza di parassiti è maggiore nei maschi rispetto alle femmine; ad esempio in *Hetaerina americana* e in *Argia* sp. il maggior parassitismo dei maschi rispetto alle femmine sembra essere legato alle notevoli energie che i maschi spendono ai fini dell'accoppiamento che provocherebbero una riduzione dell'efficienza del sistema immunitario e un aumento della probabilità di essere ospiti (Cordoba-Aguilar & Munguía-Steyer, 2013). In effetti alcuni studi sui vertebrati hanno dimostrato che l'investimento in termini di dimensioni dei testicoli può indebolire il sistema immunitario dei maschi (Scantlebury *et al.*, 2010; Manjerovic & Waterman, 2012).

Il minor grado di parassitismo dei maschi osservato in questa ricerca potrebbe anche essere legato ad un diverso utilizzo dell'habitat; le femmine, infatti, frequenterebbero maggiormente l'ambiente acquatico a causa della deposizione delle uova e sarebbero quindi maggiormente a rischio (Zawal, 2006; Baker *et al.*, 2008).

Poco numerosi sono invece gli studi riguardanti differenze di parassitismo tra morfotipi in specie polimorfiche (Tsubaki & Hooper, 2004). Analogamente a questo un altro studio (Sanchez-Guillén *et al.*, 2012) ha riscontrato differenze significative tra i morfotipi ed in particolare ha verificato che le femmine androcrome di 3 specie di damigella, tra cui una congenere dell'*I. elegans*, presentano un grado di parassitismo maggiore rispetto alle ginocrome. Per spiegare questa differenza una possibilità potrebbe risiedere nel tempo di emergenza dei due morfotipi; le femmine androcrome potrebbero impiegare più tempo per concludere la fase di sfarfallamento ed esporsi così più a lungo ai parassiti in questa fase delicata.

Una seconda spiegazione è correlata all'allocazione delle risorse e ai costi della difesa immunitaria. È risaputo che la capacità immunitaria è una caratteristica costosa al punto che l'ospite deve ottimizzare il compromesso tra questa e altre caratteristiche vitali (Sanchez-Guillén *et al.*, 2012). A differenza delle femmine ginocrome e dei maschi, probabilmente la selezione attualmente in atto porta le androcrome a cercare continuamente di migliorare il proprio livello di mimetismo intraspecifico (Iserbyt *et al.*, 2011) investendo risorse che potrebbero altrimenti essere utilizzate per la protezione dai parassiti e la fecondità. Un solo altro studio ha ricercato differenze nel grado di parassitismo tra i morfotipi; in *Coenagrion puella* le femmine presentano una maggiore risposta immunitaria ed un maggior grado di parassitismo dei maschi, ma in questo caso non è stata rilevata nessuna differenza tra i morfotipi. In questo specifico caso i risultati escludono che il polimorfismo femminile nei coenagrionidi possa essere spiegato attraverso il sistema immunitario (Joop *et al.*, 2006).

Le differenze nel grado di parassitismo dei morfotipi femminili riscontrate nel presente studio rivelano un potenziale ruolo del parassitismo nel mantenimento del polimorfismo femminili degli Odonati.

I dati di questo studio hanno inoltre rilevato una significativa differenza nelle dimensioni tra gli individui parassitati e non; in particolare gli individui parassitati, sia maschi che femmine, sono risultati più piccoli dei non parassitati. Come ipotizzano altri studi (Siva-Jothy & Plaistow, 1999; Cordoba-Aguilar & Munguia-Steyer, 2013), è plausibile che le dimensioni minori siano dovute al prelievo di risorse per lo sviluppo e la riproduzione da parte dei parassiti a spese della damigella ospite.

Infine è stato osservato che gli individui parassitati presentano una percentuale di accoppiamento molto inferiore rispetto agli individui non parassitati. E' probabile che il parassitismo influisca sul successo riproduttivo sia dei maschi che delle femmine. Nel caso dei maschi il prelievo di risorse da parte dei parassiti può portare ad una diminuzione delle prestazioni muscolari degli individui diminuendone il successo negli scontri con i rivali (Marden & Cobb, 2004; Schilder & Marden, 2006). Inoltre altri studi sugli Zigotteri dimostrano che la presenza di parassiti è fortemente associata ad una riduzione del successo riproduttivo dei maschi in popolazioni naturali (Forbes, 1991). Analogamente esiste una correlazione tra la presenza di parassiti ed il successo riproduttivo delle femmine; il parassitismo nelle femmine può causare una riduzione nella produzione di uova e nella sopravvivenza (Cordoba-Aguilar *et al.*, 2003).

Il maggior grado di parassitismo delle femmine androcrome rispetto alle ginocrome si presenta come un possibile ulteriore meccanismo di riduzione dei vantaggi legati al mimetismo intraspecifico; infatti le femmine androcrome non subiscono gli svantaggi legati a ripetuti ed energicamente dispendiosi accoppiamenti che ne possono influenzare le condizioni e la fecondità (Bots *et al.*, 2009), ma presentano un minor successo riproduttivo ed una riduzione delle probabilità di sopravvivenza legato, almeno parzialmente, anche al maggior grado di parassitismo.

I risultati relativi all'allevamento effettuato in questo studio non indicano differenze tra i morfotipi relativamente alla crescita delle larve prodotte, mentre sono state riscontrate differenze nel tasso di schiusa e nella sopravvivenza della prole, con un maggior successo della progenie della femmina androcroma.

I dati contrastano in parte rispetto ad altri studi; ad esempio in uno studio effettuato su *Nehalonia irene* (Iserbyt *et al.*, 2013) è stato verificato che il morfotipo più raro presenta un numero maggiore di uova rispetto al più comune e Bots *et al.* (2009) hanno osservato che l'addome delle femmine androcrome contiene meno uova rispetto alle ginocrome in *Enallagma cyathigerum*. Nella specie *Ischura ramburii* è stato appurato che le femmine androcrome depongono meno uova delle ginocrome, anche se si accoppiano maggiormente in condizioni in cui sono il morfotipo più comune (Sirot & Brockmann, 2001). Secondo Purse & Thompson (2003), in specie di Odonati non territoriali come *Coenagrion mercuriale*, le femmine con addome più ampio possono

produrre più uova. Infine in *Ischnura elegans* è stato dimostrato che la quantità di uova è minore nelle femmine androcrome rispetto alle ginocrome *infuscans* (Svensson & Abbott, 2005).

Oltre a differenze nella quantità di uova prodotte sono state evidenziate nella specie *Ischnura senegalensis* altre differenze tra i morfotipi femminili. Takahashi & Kawata (2013) riportano preferenze differenti tra i morfotipi mostrano per quanto riguarda il sito di deposizione; le femmine androcrome depongono in tessuti vegetali di piante vive, mentre le femmine ginocrome prediligono piante in decomposizione. Questo dato suggerisce che i due morfotipi scelgano il sito di deposizione in cui risultano più mimetiche (in questa specie la femmina androcroma è blu-verde, mentre la ginocroma è marrone). Inoltre le uova dei due morfotipi presentano uova di morfologia differente: le uova delle femmine androcrome risultano più piccole ed allungate, il che sembra renderle più adattate per substrati duri rispetto a quelli delle femmine ginocrome. Il diverso sfruttamento delle risorse si evidenzia nelle differenze morfologiche e comportamentali dei due morfotipi che permettono loro di sfruttare efficacemente risorse differenti.

Secondo Takahashi & Kawata (2013) le femmine androcrome sono r-strategists, presentando una maggiore fecondità con uova piccole, mentre le ginocrome sono k-strategists, con uova grandi ma una minore fecondità. La fecondità e la dimensione delle uova in *Ischnura senegalensis* potrebbero perciò determinare la quantità e la qualità della prole, indicando che le caratteristiche riproduttive delle due femmine potrebbero essere alla base della frequenza dei morfotipi nella popolazione.

L'analisi delle dimensioni degli individui sfarfallati, analogamente a quanto osservato da Abbott (2013), non ha rilevato differenze tra la prole dei due morfotipi.

Nel loro complesso i dati di questo studio, uniti a quelli raccolti dagli Autori precedenti sulla stessa specie, indicano che diversi meccanismi sono coinvolti nel mantenimento del polimorfismo femminile.

In questa specie le femmine androcrome presentano vantaggi legati al mimetismo intraspecifico, quali una probabilità di sopravvivenza maggiore grazie all'evitamento di dispendiosi accoppiamenti ed un minor grado di molestia da parte dei maschi. Ciò nonostante interviene una compensazione da parte del parassitismo che, in questo

morfotipo, si presenta con maggior frequenza diminuendo la fecondità delle femmine e le condizioni di vita.

Per contro il minor parassitismo delle femmine ginocrome *infuscans* potrebbe compensare un elevato grado di molestia da parte dei maschi.

Durante le fasi larvali la prole delle femmine androcrome si è rivelata più resistente, presentando un maggior tasso di schiusa e una maggiore sopravvivenza a cui consegue un maggior numero finale di individui sfarfallati.

Questo ultimo dato potrebbe spiegare il motivo per cui nelle popolazioni osservate e campionate in questo studio il numero delle femmine androcrome è significativamente maggiore delle femmine ginocrome *infuscans*, mentre l'insieme delle differenze nella frequenza di accoppiamento, nel parassitismo, nella fecondità e nella sopravvivenza dei due morfotipi spiega il mantenimento di entrambi i tipi femminili.

BIBLIOGRAFIA

Abbott J.K., 2013. Morph-specific and sex-specific temperature effects on morphology in the colour polymorphic damselfly *Ischnura elegans*. *Animal Biology*, 63:149-167.

Abbott J.K., Gosden T.P., 2009. Correlated morphological and colour differences among females of the damselfly *Ischnura elegans*. *Ecological Entomology*, 34(3):378-386.

Abbott J. & Svensson E.I., 2005. Phenotypic and genetic variation in emergence and development time of a trimorphic damselfly. *Journal of Evolutionary Biology*, 18(6):1464-70.

Abbott J.K., Svensson E.I., 2008. Ontogeny of sexual dimorphism and phenotypic integration in heritable morphs. *Evolutionary Ecology*, 22(1):103-121.

Amundsen T., 2000. Why are female birds ornamented? *Trends in Ecology and Evolution*, 15(4):149-155.

Andrés J.A., Sánchez-Guillén R.A., Rivera A.C., 2002. Evolution of female colour polymorphism in damselflies: testing the hypotheses. *Animal Behaviour*, 63(4):677-685.

Askew R.R., 1988. The dragonflies of Europe. *Harley Books*, Colchester, Essex.

Baker R.A., Mill P.J., Zawal A., 2008. Ectoparasiting water mite larvae of the genus *Arrenurus* on damselfly *Coenagrion puella* (Linnaeus) (Zygoptera: Coenagrionidae). *Odonatologica*, 37(3):193-202.

Borgia G., Collis K., 1989. Female choice for parasite-free male satin bowerbirds and the evolution of bright male plumage. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 25(6):445-453.

Bots J., Van Dongen S., Adriaens T., Dumont H.J., Stoks R., Van Gossum H., 2009. Female morphs of a colour polymorphic damselfly differ in developmental instability and fecundity. *Animal biology*, 59(1):41-54.

Bots J., Van Dongeon S., De Bruyn L., Van Houtte N., Van Gossum H., 2010. Clutch size and reproductive success in a female polymorphic insect. *Evolutionary Ecology*, 24:1239-1253.

Bouton N., Iserbyt A. & Van Gossum H., 2011. Thermal plasticity in life-history traits in the polymorphic blue-tailed damselfly, *Ischnura elegans*: no differences between female morphs. *Journal of Insect Science* (Online), 11(112):1-11.

Carchini G., Chiarotti F., Di Domenico M., Paganotti G., 2000. Fluctuating asymmetry size and mating success in males of *Ischnura elegans* (Vander Linden) (Odonata: Coenagrionidae). *Animal behaviour*, 59(1): 177-182.

Corbet P.S., 1980. Biology of Odonata. *Annual review of entomology*, 25:189-217.

Cordero A., 1988. Ciclomorfosis y fenología en *Ischnura graellsii* Rambur, 1842 (Odonata: Coenagrionidae). In *Actas del III Congreso Ibérico de Entomología*, 419-430.

Corbet P.S., 1999. Dragonflies: behaviour and ecology of Odonata. *Harley Books*.

Cordero A., 1990. The inheritance of female polymorphism in the damselfly *Ischnura graellsii* (Rambur) (Odonata:Coenagrionidae). *Heredity*, 64(3):341-346.

Cordero A., 1991. Fecundity of *Ischnura graellsii* (Rambur) in the laboratory (Zygoptera: Coenagrionidae). *Odonatologica* 20(1):37-44.

Cordero A., 1992. Sexual cannibalism in the damselfly species *Ischnura graellsii* (Odonata:Coenagrionidae). *Entomologia Generalis*, 17(1):17-20.

Cordero A., 1992. Density-dependent mating success and colour polymorphism in females of the damselfly *Ischnura graellsii* (Odonata: Coenagrionidae). *Journal of Animal Ecology*, 769-780.

Cordero-Rivera A. & Andrés J.A., 1996. Colour polymorphism in odonates - female that mimic males. *Journal of the British Dragonfly Society*, 12.

Cordero A., Carbone, S.S., Utzeri, C., 1997. Male mating success in a natural population of *Ischnura elegans* (Vander Linden) (Odonata: Coenagrionidae). *Odonatologica* 26(4):459-465.

Cordero A., Carbone S.S., Utzeri C., 1998. Mating opportunities and mating costs are reduced in androchrome female damselflies, *Ischnura elegans* (Odonata). *Animal Behaviour*, 55(1):185-197.

Cordero A.C., Sánchez-Guillén R.A., 2007. Male-like females of a damselfly are not preferred by males even if they are the majority morph. *Animal Behaviour*, 74(2):247-252.

Córdoba-Aguilar A., Uhía E., Rivera A.C., 2003. Sperm competition in Odonata (Insecta): the evolution of female sperm storage and rivals' sperm displacement. *Journal of Zoology*, 261(04):381-398.

Córdoba-Aguilar A., 2009. Seasonal variation in genital and body size, sperm displacement ability, female mating rate, and male harassment in two calopterygid damselflies (Odonata: Calopterygidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 96(4):815-829.

Córdoba-Aguilar A., Munguía-Steyer R., 2013. The sicker sex: understanding male biases in parasitic infection, resource allocation and fitness. *PloS one*, 8(10):e76246.

Dijkstra K.D.B., Lewington R., 2006. Field Guide to the Dragonflies of Britain and Europe: Including western Turkey and north-western Africa. Dorset: British Wildlife Publishing.

Dunkle S. W., 1990. Damselflies of Florida, Bermuda and the Bahamas. *Scientific Publishers*.

Fincke O.M., 1992. Consequences of larval ecology for territoriality and reproductive success of a neotropical damselfly. *Ecology*, 449-462.

Fincke O. M.,1992. Interspecific competition for tree holes: consequences for mating systems and coexistence in neotropical damselflies. *American Naturalist*, 80-101.

Fincke O.M., 1994. Female colour polymorphism in damselflies failure to reject the null hypothesis. *Animal Behaviour*, 47:1249-1266.

Fincke O.M., Jödicke R., Paulson D.R., Schultz T.D., 2005. The evolution and frequency of female color morphs in Holarctic Odonata :why are male-like females typically the minority ? *International Journal of Odonatology*, 8:183-212.

Forbes M.R., 1991. Ectoparasites and mating success of male *Enallagma ebrium* damselflies (Odonata: Coenagrionidae). *Oikos*, 336-342.

Forbes M.R. & Robb T., 2008. Testing hypotheses about parasite-mediated selection using Odonate hosts. *Dragonflies and damselflies:model organisms for ecological and evolutionary research*, 175-188.

Gołąb M.J., Śniegula S., Drobniak S.M., Zajac T., Serrano-Meneses M.A., 2013. Where do floaters settle? An experimental a roach in odonates. *Animal Behaviour*, 86(5):1069-1075.

Gosden T.P. & Svensson E.I., 2009. Density-dependent male mating harassment, female resistance, and male mimicry. *The American Naturalist*, 173(6):709-721

Gosden T.P. & Svensson E.I., 2009. Density-dependent male mating harassment, female resistance, and male mimicry. *The American Naturalist*, 173(6):709-721.

- Gosden T.P. & Svensson E.I., 2007.** Female sexual polymorphism and fecundity consequences of male mating harassment in the wild. *PLoS one*, 2(6), p.e580.
- Gray S.M. & McKinnon J.S., 2007.** Linking color polymorphism maintenance and speciation. *Trends in Ecology and Evolution*, 22(2):71-79.
- Gribbin S.D., Thompson D.J., 1990.** Egg size and clutch size in *Pyrrhosoma nymphula* (Sulzer) (Zygoptera: Coenagrionidae). *Odonatologica*, 19(4):347-357.
- Hammers M. & Van Gossum H., 2008.** Variation in female morph frequencies and mating frequencies: random, frequency-dependent harassment or male mimicry? *Animal Behaviour*, 76:1403-1410.
- Hammers M., Sánchez-Guillén R.A., Van Gossum H., 2009.** Differences in mating propensity between immature female color morphs in the damselfly *Ischnura elegans* (Insecta: Odonata). *Journal of Insect Behavior*, 22(4):324-337.
- Harvey I.F. & Corbet P.S., 1985.** Territorial behaviour of larvae enhances mating success of male dragonflies. *Animal Behaviour*, 33(2):561-565.
- Harvey I. F., Walsh, K.J., 1993.** Fluctuating asymmetry and lifetime mating success are correlated in males of the damselfly *Coenagrion puella* (Odonata: Coenagrionidae). *Ecological Entomology*, 18(3):198-202.
- Hassall C., Lowe C.D., Harvey I.F., Watts P.C., Thompson D.J., 2010.** Phenology determines seasonal variation in ectoparasite loads in a natural insect population. *Ecological Entomology*, 35(4):514-522.
- Hinneking B.O.N., 1987.** Population dynamics of *Ischnura elegans* (Vander Linden) (Insecta: Odonata) with special reference to morphological colour changes, female polymorphism, multiannual cycles and their influence on behaviour. *Hydrobiologia*, 146:3-31.

Huang S.C. & Reinhard J., 2012. Color change from male-mimic to gynomorphic:a new aspect of signaling sexual status in damselflies (Odonata, Zygoptera). *Behavioral Ecology*, 23(6):1269-1275.

Jaenike J., 1988. Parasitism and mating success in *Drosophila testacea*. *American Naturalist*, 131:774-780

Johnson C. 1975. Polymorphism and natural selection in Ischnuran damselflies. *Evolutionary Theory* 1:81-90.

Joop G., Mitschke A., Rolff J., Siva-Jothy M.T., 2006. Immune function and parasite resistance in male and polymorphic female *Coenagrion puella*. *BMC Evolutionary Biology*, 6(1):19.

Kaunisto K.M., Kaunisto P., Vathera V., Suhonen J., 2015. Populations of the damselfly *Coenagrion hastulatum* at the edge of the species range have fewer gregarine and water mite parasites. *Freshwater Biology*, 60:794-801.

Iserbyt A., Bots J., Van Dongen S., Ting J.J., Van Gossum H., Sherratt T.N., 2011. Frequency-dependent variation in mimetic fidelity in an intraspecific mimicry system. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*.

Iserbyt A., Bots J., Van Gossum H., Sherratt T.N., 2013. Negative frequency-dependent selection or alternative reproductive tactics: maintenance of female polymorphism in natural populations. *BMC Evolutionary Biology*,13(1):139.

Locklin J.L., 2012. A method for rearing large quantities of the damselfly, *Ischnura ramburii* (Odonata:Coenagrionidae), in the laboratory. *Florida Entomologist*, 95(2):273-277.

Manjerovic M.B., Waterman J.M., 2012. Immunological sex differences in socially promiscuous African ground squirrels. *PloS one*, 7(6):e1-e5.

Marden J.H., Cobb J.R., 2004. Territorial and mating success of dragonflies that vary in muscle power output and presence of gregarine gut parasites. *Animal Behaviour*, 68(4):857-865.

McKee D., Harvey I.F., Thompson D.J., Sherratt T.N., 2005. Frequency of female colour morphs in populations of four coenagrionid damselflies (Zygoptera: Coenagrionidae). *Odonatologica*, 34(1):37-49.

Miller M.N. & Fincke O.M., 1999. Cues for mate recognition and the effect of prior experience on mate recognition in *Enallagma* damselflies. *Journal of Insect Behaviour*, 12(6).

Morbey Y.E., Ydenberg R.C., 2001. Protandrous arrival timing to breeding areas: a review. *Ecology Letters*, 4(6):663-673.

Purse B.V., Thompson D.J., 2003. Emergence of the damselflies, *Coenagrion mercuriale* and *Ceriagrion tenellum* (Odonata: Coenagrionidae), at their northern range margins, in Britain. *European Journal of Entomology*, 100(1):93-100.

R Development Core Team, 2008. R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria.

Read A.F., 1988. Sexual selection and the role of parasites. *Trends of Ecological Evolution*, 3:97-102

Robertson H.M., 1985. Female dimorphism and mating behaviour in a damselfly, *Ischnura ramburi*: females mimicking males. *Animal Behaviour* 33:805-809.

Sánchez-Guillén R.A., Hansson B., Wellenreuther M., Svensson E.I., Cordero-Rivera A., 2011. The influence of stochastic and selective forces in the population divergence of female colour polymorphism in damselflies of the genus *Ischnura*. *Heredity*, 107(6):513-522.

Sánchez-Guillén R.A., Martínez-Zamilpa S.M.J., Jiménez-Cortés J.G., Forbes M.L.R., Córdoba-Aguilar A., 2012. Maintenance of polymorphic females: do parasites play a role? *Oecologia*, 171(1):105-13.

Scantlebury M., McWilliams, M.M., Marks N.J., Dick J.T.A., Edgar H., Lutermann H., 2010. Effects of life-history traits on parasite load in grey squirrels. *Journal of Zoology*, 282(4):246-255.

Schilder R.J., Marden J.H., 2006. Metabolic syndrome and obesity in an insect. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(49):18805-18809.

Schneider C.A., Rasband W.S. & Eliceiri K.W., 2012. NIH Image to ImageJ:25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7):671-675.

Sherratt T.N. & Forbes M.R., 2001. Sexual differences in coloration of Coenagrionid damselflies (Odonata):a case of intraspecific aposematism? *Animal Behaviour*, 62:653-660.

Sirot L.K., Brockmann H.J., 2001. Costs of sexual interactions to females in Rambur's forktail damselfly, *Ischnura ramburi* (Zygoptera: Coenagrionidae). *Animal Behaviour*, 61(2):415-424.

Sirot L.K., Brockmann H.J., Marnis C., Muschett G., 2003. Maintenance of a female-limited polymorphism in *Ischnura ramburi* (Zygoptera:Coenagrionidae). *Animal Behaviour*, 66(4):763-775.

Siva-Jothy M.T., Plaistow S.J., 1999. A fitness cost of eugregarine parasitism in a damselfly. *Ecological Entomology*, 24(4):465-470.

Sokolovska N., Rowe L., Johansson F., 2000. Fitness and body size in mature odonates. *Ecological Entomology*, 25(2):239-248.

- Stearns S.C., 1992.** The evolution of life histories, *Oxford University Press*, London.
- Svensson E.I. & Abbott J., 2005.** Evolutionary dynamics and population biology of a polymorphic insect. *Journal of Evolutionary Biology*, 18(6):1503-14.
- Takahashi Y., Kawata M., 2013.** A comprehensive test for negative frequency-dependent selection. *Population ecology*, 55(3):499-509.
- Takahashi Y. & Watanabe M., 2011.** Male mate choice based on ontogenetic colour changes of females in the damselfly *Ischnura senegalensis*. *Journal of Ethology*, 29(2):293-299.
- Therneau T., 2012.** Survival: A package for Survival analysis in S. R package version 2.36-12.
- Thompson D.J., Fincke O.M., 2002.** Body size and fitness in Odonata, stabilising selection and a meta-analysis too far? *Ecological Entomology*, 27(3):378-384.
- Thompson D.J., Hassal C., Lowe C.D., Watts P.C., 2011.** Field estimates of reproductive success in a model insect: behavioural surrogates are poor predictors of fitness. *Ecology Letters*, 14(9):905-913.
- Tsubaki Y., Hooper R.E., 2004.** Effects of eugregarine parasites on adult longevity in the polymorphic damselfly *Mnais costalis* Selys. *Ecological entomology*, 29(3):361-366.
- Utzeri C. 1980.** Considerations on cannibalism in Zygoptera. *Notulae Odonatologicae*, 1:100-102.
- Van Gossum H., Stoks R. & De Bruyn L., 2001.** Frequency-dependent male mate harassment and intra-specific variation in its avoidance by females of the damselfly *Ischnura elegans*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 51(1):69-75.

Van Gossum H., Stoks R., De Bruyn L., 2001. Reversible frequency–dependent switches in male mate choice. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 268(1462):83-85.

Van Gossum H., Stoks R. & De Bruyn L., 2005. Lifetime fitness components in female colour morphs of a damselfly: density- or frequency-dependent selection? *Biological Journal of the Linnean Society*, 86(4):515-523.

Van Gossum H., Stoks R. & De Bruyn L., 2001. Reversible frequency-dependent switches in male mate choice. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 268(1462):83-85.

Wellenreuther M., Svensson E.I. & Hansson B., 2014. Sexual selection and genetic colour polymorphisms in animals. *Molecular Ecology*, in press, p.n/a-n/a.

Zawal A., 2006. Phoresy and parasitism :water mite larvae of the genus *Arrenurus* (Acari:Hydrachnidia) on Odonata from Lake Binowskie (NW Poland). *Biological Letters*, 43(2):257-276.

Walker E. M., 1953. The Odonata of Canada and Alaska. *University of Toronto Press*, Vol. 1, Toronto.

CAPITOLO 2

Il polimorfismo nella specie *Ceriagrion tenellum*

RIASSUNTO

Questa parte della ricerca ha l'obiettivo di approfondire, utilizzando una seconda specie di damigella, gli adattamenti comportamentali legati al polimorfismo femminile.

Durante questo studio è stata analizzata la specie *Ceriagrion tenellum* (Odonata: Coenagrionidae); questo taxon presenta una femmina androcroma (*forma erythrogastrum* o tipo A), con colorazione analoga a quella del maschio, e due femmine ginocrome (*forma typica* o tipo B e *forma melanogastrum* o tipo C). Il determinismo è genetico e si basa sulla presenza di un locus autosomale con tre alleli gerarchicamente dominanti ($p^t > p^m > p^a$ - t=typica, m=melanogastrum, a=androcroma).

I campionamenti hanno interessato due popolazioni naturali di *C. tenellum* allo scopo di ottenere dati relativi alla frequenza dei vari morfotipi, alle dimensioni e alla scelta del partner da parte del maschio.

I risultati ottenuti evidenziano un'assenza totale del morfotipo A; in entrambe le popolazioni la forma dominante è la femmina ginocroma del tipo B. La femmina del morfotipo C è risultata poco presente e non è quindi stato possibile effettuare dei confronti con le femmine B in termini di frequenze di accoppiamento.

Per quanto concerne le dimensioni corporee le analisi effettuate non hanno rilevato differenze significative tra i morfotipi femminili e tra gli individui osservati in fase di accoppiamento o no.

INTRODUZIONE

Il polimorfismo femminile è stato osservato in molte specie di Odonati. In circa la metà dei generi europei è presente questo fenomeno ed è particolarmente comune nella famiglia dei Coenagrionidae, al cui interno il 65% delle specie sono polimorfiche (Cordero & Andrés, 1996).

Il significato adattativo del polimorfismo nelle damigelle è stato largamente studiato (Cordero & Andrés, 1996 - review). Le specie polimorfiche presentano due o più morfi femminili: un morfotipo androcromo, che assomiglia al maschio nella colorazione, e uno o due morfotipi ginocromi che presentano una colorazione chiaramente diversa da quella maschile (Cordero *et al.*, 1998).

La coesistenza di due o tre morfotipi femminili, a differenti frequenze di popolazione, è stato spiegato in termini di isolamento riproduttivo (Johnson, 1975), di selezione dipendente dalla frequenza (Robertson, 1985) e di selezione dipendente da frequenza e densità (Hinneking, 1987), nonché da numerose varianti di queste tre teorie principali (vedi Capitolo 1). Altri autori hanno proposto che i maschi sono semplicemente attratti dal morfotipo più comune nella popolazione (Fincke, 1994; Van Gossum *et al.*, 1999), e suggeriscono che il maschio possa cambiare la sua scelta in accordo con la frequenza dei morfotipi. Per contro Forbes & Teather (1994) indicano che sono presenti discordanze tra gli studi effettuati; infatti, numerosi studi indicano che il maschio non è sempre attratto dal morfotipo più comune.

Tuttavia le ipotesi sopra citate non sono servite a spiegare totalmente l'esistenza di più di una femmina ginocroma in un numero così elevato di specie polimorfiche. Altri studi hanno proposto che il polimorfismo sia neutrale alla selezione e che fattori casuali siano alla base del mantenimento di questo fenomeno (Fincke, 1994a-b; Andrés & Cordero, 1999).

La base genetica di questa forma di polimorfismo è conosciuta in quattro specie di damigelle, tutte appartenenti al genere *Ischnura* (Andrés & Cordero, 1999). In *I. damula* e *I. demorsa*, due specie dimorfiche, le androcrome sono omozigoti per l'allele recessivo (pp) mentre le femmine ginocrome sono eterozigoti ($p^+ p$) o omozigoti ($p^+ p^+$) per l'allele dominante di un singolo locus auto somale con espressione limitata alla femmina

(Johnson, 1964-1966). *I. graelsii* e *I. elegans* presentano tre morfotipi femminili determinati, analogamente alle specie dimorfiche, da un singolo locus auto somale con espressione limitata alla femmina, ma in questo caso il sistema presenta tre alleli: p^a (androcroma), p^i (*infuscans*) e p^o (rispettivamente *aurantica* e *infuscans-obsoleta*). Questi tre alleli presentano una dominanza gerarchica ($p^a > p^i > p^o$) (Cordero, 1990; Sanchez-Guillen *et al.*, 2005).

La specie in esame in questo studio presenta tre morfotipi femminili principali (*typica*, *erythrogastrum* e *melanogastrum*), per cui è stato dimostrato un determinismo genetico basato su un singolo locus auto somale a espressione limitata per la femmina con tre alleli che presentano una dominanza gerarchica in cui l'androcroma è recessiva ($p^t > p^m > p^a$). La situazione dei morfotipi di questa specie è potenzialmente molto interessante poiché sono state descritte anche una forma *intermedium* (Selys, 1876). e un nuovo morfotipo, molto simile alla forma *typica*, ma con la colorazione rossa più estesa ed il nono segmento addominale più tendente al rosso rispetto alla *typica* (Papazian, 1988).

Ceriagrion tenellum potrebbe quindi rappresentare un caso di polimorfismo femminile in cui sono presenti numerose varianti, una situazione difficile da interpretare anche dal punto di vista teorico.

Lo scopo di questa ricerca è quindi quello di meglio comprendere i fattori che regolano questo tipo di polimorfismo e che permettono il mantenimento della compresenza di diversi morfotipi femminili nelle popolazioni.

In particolare sono state ricercate differenze di dimensioni tra i morfotipi femminili, che potessero influire sulla scelta del maschio o sulla fitness del morfotipo stesso. Inoltre sono stati raccolti dati relativi all'eventuale presenza di parassiti ed al comportamento dell'individuo al momento della cattura per individuare differenze tra i morfotipi nella frequenza all'accoppiamento.

MATERIALI E METODI

Scheda della specie

La specie *Ceriagrion tenellum* appartiene alla famiglia Coenagrionidae del sottordine degli Zygopteri. Il corpo è allungato e sottile, con apertura alare di 30-42 mm. Risulta facilmente identificabile per la colorazione rossa di addome, occhi e pterostigma alare. Si distingue da *Pyrrhosoma nymphula* perché questa ha una taglia minore (25-35 mm) e le zampe rosse anziché nere.

Il maschio presenta l'addome interamente di colore rosso (Figura 1a). La femmina presenta invece tre varianti cromatiche principali:

- *forma erythrogastrum* (tipo A): presenta la stessa colorazione del maschio con l'addome completamente rosso (Figura 1b);

- *forma typica* (tipo B): l'addome è di colore nero ad eccezione di S1-3 e S9-10 che sono rossi (Figura 1d);

- *forma melanogastrum* (tipo C): presenta l'addome totalmente di colore nero (Figura 1e).

Inoltre sono presenti anche due morfotipi meno comuni (di cui uno prende il nome di *intermedium*, Figura 1c) che presentano una colorazione intermedia tra la forma androcroma e la forma *typica*.

La specie è segnalata per tutte le regioni italiane. Poco comune e abbastanza localizzata, predilige ambienti con acque ferme o con lento corso. Si rinviene principalmente presso stagni, laghi di pianura, corsi d'acqua con abbondante vegetazione ripariale e canneti (Dijkstra & Lewington, 2006; Bellman, 2013).



Figura 12: dall'alto: a - maschio; b - *forma erythrogastrum*; c - *forma intermedium*; d - *forma typica*; e - *forma melanogastrum*

Area di studio

Per la marcatura degli individui nel corso del 2015 sono state effettuate delle uscite in campo presso due differenti siti:

- Oasi WWF "Il Verneto", Rocchetta Tanaro (AT) (44.851841, 8.360191): si tratta di una antica ansa del Tanaro in cui è presente un corso d'acqua incanalato che ospita diverse specie di Odonati, fra le quali *Ceriagrion tenellum*. Il contesto ambientale è buono nonostante si trovi vicino ad aree coltivate. L'area è compresa in un Sito d'Importanza Comunitaria (SIC IT1170005) (Figura 2a).

- Regione Crocetta, Villafranca d'Asti (AT) (44.928826, 8.003759): è un'area compresa fra campi coltivati in cui si trova un canale densamente vegetato. Anche in quest'area sono presenti numerose altre specie tra cui alcune di interesse conservazionistico (es. *Coenagrion mercuriale*) (Figura 2b).

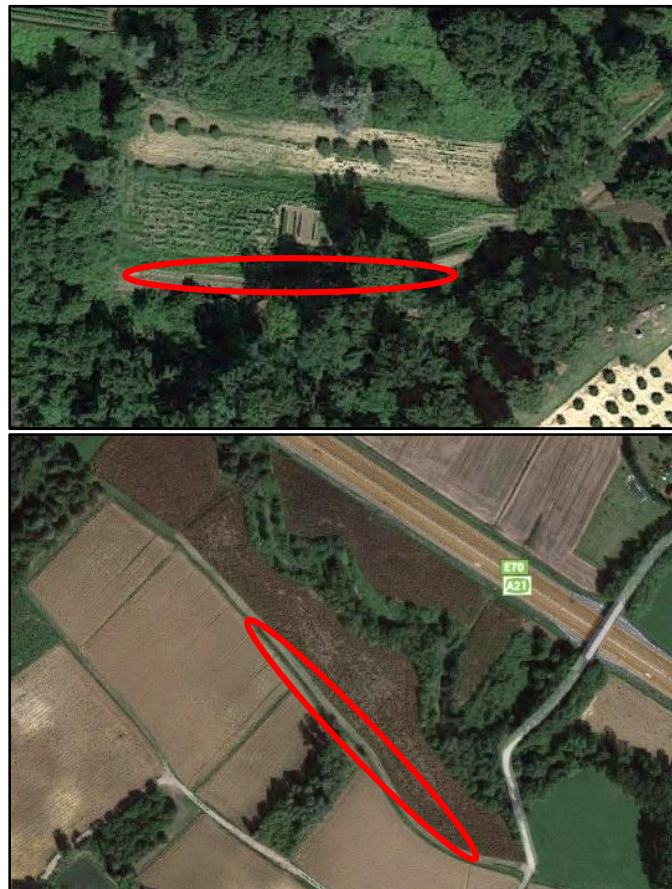


Figura 13 - Dall'alto: a - Rocchetta Tanaro; b - Villafranca d'Asti

Metodo di campionamento

In entrambi i siti sono stati effettuati sopralluoghi con frequenza settimanale o bisettimanale, in base alle condizioni meteorologiche, durante la principale parte del periodo riproduttivo da inizio giugno a fine luglio 2015. Considerando le ore di massima attività degli Odonati i campionamenti sono stati effettuati tra le 11 e le 15.

Analogamente al campionamento di *Ischnura elegans* ogni singolo individuo è stato catturato, marcato tramite un numero progressivo sull'ala con pennarello indelebile e ritratto con fotografia digitale prima di essere rilasciato nel luogo di cattura. Un approfondimento relativo alla tematica della marcatura individuale, valida sia per *Ischnura elegans* che per *Ceragrion tenellum*, è riportato in "Approfondimento 1".

Anche in questo caso per ogni individuo catturato sono stati raccolti dati relativamente al sesso/morfotipo e alla eventuale presenza di parassiti (Figura 3).



Figura 14 - Applicazione del metodo di campionamento

Statistica

Per l'analisi statistica dei dati è stato utilizzato il software R (R core Team 2015). Nelle analisi in cui la variabile indipendente era categorica (es. sesso, morfotipo, località) è stata fatta un'ANOVA.

Negli altri casi sono stati eseguiti modelli lineari generalizzati (GLM) immettendo come variabile dipendente la lunghezza degli individui e come variabile indipendente variabili categoriche (es. accoppiamento, parassitismo) o variabili continue (tempo).

Approfondimento 1 - Il metodo cattura-marcatura-ricattura

L'ecologia di popolazione si occupa principalmente di comprendere i cambiamenti temporali in termini di abbondanza ed i meccanismi ad essi correlati (Cordero-Rivera & Stocks, 2008). Nel campo dell'ecologia un problema comune allo studio di tutta la fauna selvatica, dai vertebrati agli invertebrati, è quello di ottenere dati statisticamente significativi di una popolazione che possano fornire informazioni relativamente alla dimensione effettiva e non ad un sottoinsieme di essa (Nichols, 1992). In questo contesto risulta quindi indispensabile poter riconoscere nel tempo all'interno di una popolazione determinati individui (Mari *et al.*, 2003)

Il metodo della cattura-marcatura-ricattura (CMR) provvede ad affrontare e risolvere questa complicazione fornendo gli strumenti per ottenere una stima quantitativa indiretta della dimensione della popolazione (Krebs, 1999; Southwood & Henderson, 2000), densità di popolazione, sopravvivenza e dispersione (Baur, 1986; Johnson & Black, 1991; Kiss & Samu, 2000), nonché di testare gli effetti delle variabili ambientali (Pradel, 1996).

Le informazioni che questo metodo permette di ottenere risultano anche di fondamentale importanza per la conservazione delle specie in quanto i movimenti e la dispersione delle popolazioni risulta strettamente correlato alla struttura degli habitat che presentano una sempre maggiore frammentazione (Rouquette & Thompson, 2007). Usato per monitoraggi a lungo termine questo metodo fornisce accurate informazioni relativamente alla distribuzione delle specie, all'uso dell'habitat ed eventualmente a stati di declino delle popolazioni (Williams *et al.*, 2002; Janks & Barker, 2013; Watts *et al.*, 2007).

Il metodo della CMR consiste nell'applicazione di un segno di riconoscimento univoco che possa ricondurre al momento della ricattura alla storia di ogni singolo individuo (Correia *et al.*, 2014). I sistemi di marcatura artificiale sono numerosi e spesso specifici per determinati tipi di gruppi animali (Silvy *et al.*, 2005) e possono consistere ad esempio in numeri identificativi, collari, anelli da zampa, transponder, colorazioni o decolorazioni di tessuti; in casi in cui ogni individuo all'interno di una popolazione presenti particolari disegni è possibile utilizzare sistemi di identificazione che sfruttano la marcatura naturale non invasivi come la foto identificazione, utilizzata con successo per studiare alcune specie marine (Meekan *et al.*, 2006; Kitchen-Wheeler, 2010; Barker & Williamson, 2010).

Questo metodo, nelle sue varianti, è stato utilizzato negli anni per lo studio di numerosi gruppi animali quali mammiferi (Gaillard *et al.*, 1993), pesci (Correia *et al.*, 2014; Cunjak *et al.*, 2005), uccelli (Charmantier *et al.*, 2008; Crespin *et al.*, 2006), molluschi (Janks & Barker, 2013), insetti (Maier *et al.*, 2013; Neira *et al.*, 2014; Torres-Vila *et al.*, 2013).

In questo studio è stato utilizzato il metodo della CMR su due popolazioni di *Ceriagrion tenellum* (Odonata: Coenagrionidae) al fine di ottenere informazioni sulla struttura di popolazione e studiare il polimorfismo femminile che questa specie presenta.

Storicamente tra tutti gli invertebrati gli Odonati sono stati largamente presi in considerazione per studi di questo tipo in quanto è possibile ottenere un'elevata quantità di dati abbastanza facilmente ed in poco tempo (Cordero & Stocks, 2008). Gli Odonati, in particolare gli Zigofteri, sono degli ottimi organismi studi relativamente alla CMR in quanto sono semplici da catturare e marcare (Roquette & Thompson, 2007) e producono più facilmente di altri gruppi dati equivalenti a studi analoghi su uccelli e mammiferi (Beirinckx *et al.*, 2006).

Inoltre gli Zigofteri generalmente presentano una bassa capacità di dispersione (Utzeri *et al.*, 1984, Cordero, 1991); escludendo l'allontanamento dei giovani durante il periodo di maturazione risultano particolarmente fedeli al sito riproduttivo di origine (Geenen *et al.*, 2000).

Borror (1934) fu uno dei primi ad utilizzare questo metodo sugli Odonati (Cordoba-Aguilar, 2008), marcando gli individui sulle ali con la china; successivamente alla sua esperienza diversi autori si sono misurati con questa tecnica sviluppando nuovi sistemi per marcare le ali, fino ad arrivare al più recente utilizzo di pennarelli indelebili, metodo utilizzato in questo studio.

RISULTATI

Durante i campionamenti sono stati raccolti dati relativamente ad un totale di 698 individui di *C. tenellum*.

	Totale individui	Individui accoppiati	Sesso e morfi				Individui con parassiti			
			M	A	B	C	M	A	B	C
Villafranca d'Asti	496	320	346	0	141	9	1	0	0	0
Rocchetta Tanaro	202	67	153	0	47	2	20	0	2	0

Tabella 1: conteggi relativi agli individui campionati. M = maschi; A, B, C = morfi femminili

La Tabella 1 mostra che durante i campionamenti sono stati osservati numerosi individui in fase di accoppiamento.

Entrambe le popolazioni presentano una sex-ratio sbilanciata verso i maschi; inoltre il morfotipo B risulta il più abbondante seguito dal morfotipo C. La femmina androcroma e la *forma intermedium* non sono mai state contattate.

Gli individui parassitati sono risultati in numeri troppo ridotto per consentire di effettuare analisi statistiche riguardo relazioni tra parassitismo e sesso o tra parassitismo e morfotipo.

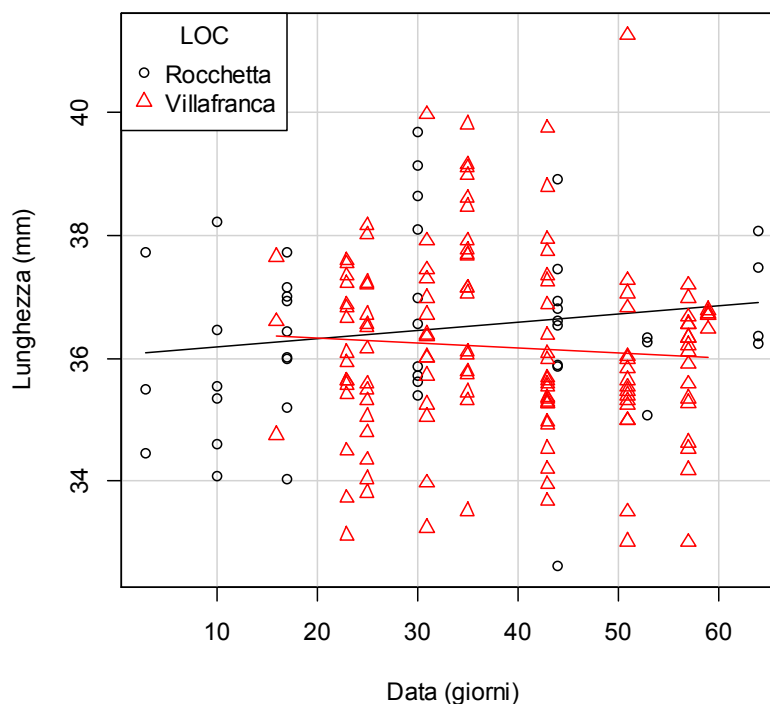


Grafico 1: andamento delle dimensioni delle femmine B durante la stagione nelle due località

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	33.970950	0.165504	205.258	<2e-16 ***
DAY	-0.001796	0.003726	-0.482	0.630
LOC[T.Villafranca]	0.004525	0.129168	0.035	0.972

Tabella 2: risultati delle analisi statistiche relative alle dimensioni delle femmine B in relazione alla data e alla località

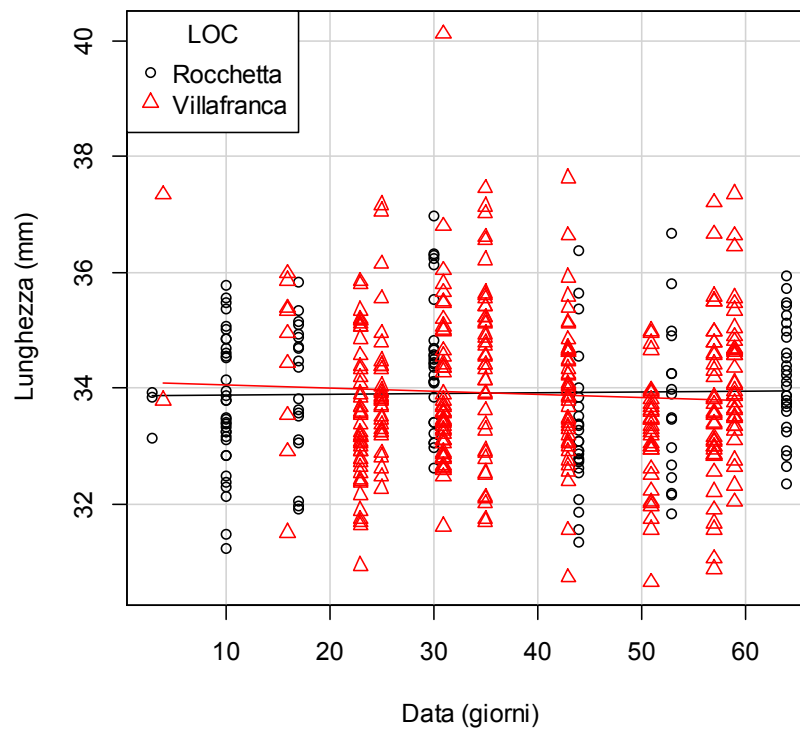


Gráfico 2: andamento delle dimensioni dei maschi durante la stagione nelle due località

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	36.4379755	0.3301247	110.376	<2e-16 ***
LOC[T.Villafranca]	-0.2719961	0.2669300	-1.019	0.31
DAY	0.0003969	0.0080010	0.050	0.96

Tabella 3: risultati delle analisi statistiche relative alle dimensioni dei maschi in relazione alla data e alla località

Le analisi statistiche effettuate sulle dimensioni degli individui campionati non hanno evidenziato differenze significative tra le popolazioni né trend stagionali sia nelle femmine (Grafico 1 - Tabella 2) che nei maschi (Grafico 2 - Tabella 3).

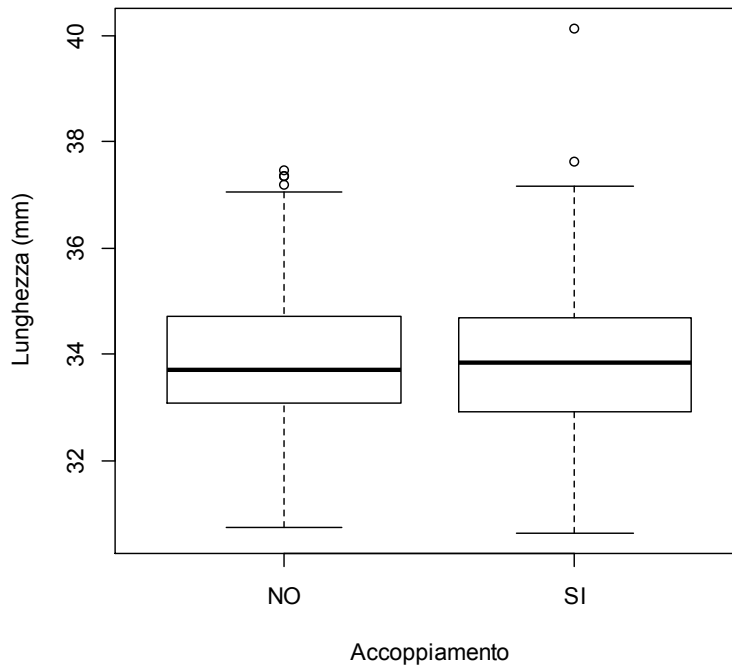


Grafico 3: confronto delle dimensioni tra gli individui maschi accoppiati e non.

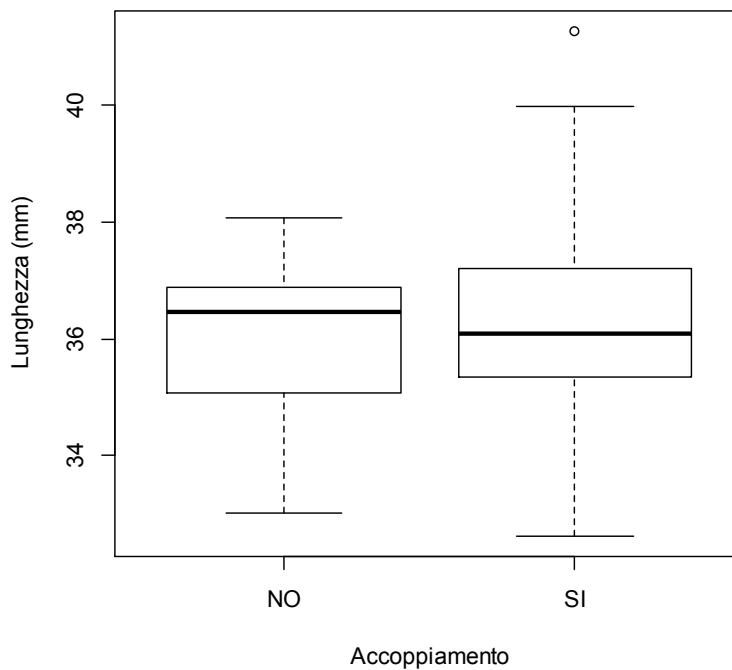


Grafico 4: confronto delle dimensioni tra le femmine B accoppiate e non.

Le dimensioni degli individui osservati in accoppiamento non sono significativamente differenti rispetto a quelli non accoppiati (Grafici 3 e 4). I risultati statistici sono mostrati in Tabella 4 per i maschi e in Tabella 5 per le femmine.

In queste analisi le femmine C non sono state prese in considerazione in quanto rinvenute in numeri troppo bassi.

MASCHI	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr (>F)
ACC	1	0.0	0.0212	0.013	0.911
Residuals	476	803.3	1.6877		

FEMMINE	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr (>F)
ACC	1	1.4	1.416	0.643	0.424
Residuals	176	387.7	2.203		

Tabella 4 (alto) e 5 (basso): risultati dell'analisi effettuata su maschi (alto) e femmine B (basso) osservati in fase di accoppiamento (ACC) oppure non accoppiati

L'unica differenza statisticamente significativa relativa alle dimensioni mostra che le femmine sono più grandi dei maschi (MvsB: $F=389.8$, $p<0.01$; MvsC: $F=19.38$, $p<0.01$). Le differenze tra i due morfotipi femminili invece non sono significative.

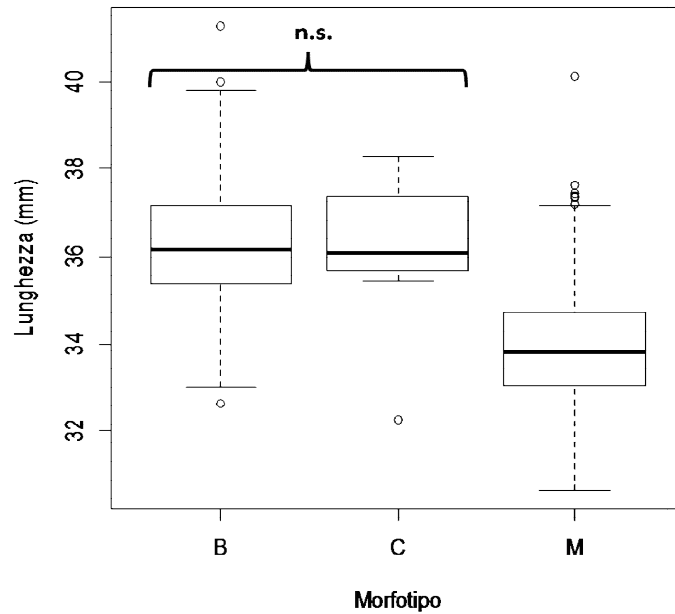


Grafico 5: confronto tra le dimensioni dei morfotipi femminili e dei maschi. $P<0.001$.

	mean	sd	data:n	data:NA
M	33.90680	1.297751	478	1
B	36.24775	1.482760	178	0
C	36.1000	1.989623	7	0

Tabella 6: valori osservati per i maschi e per i due morfotipi femminili

DISCUSSIONE

I risultati di questo studio indicano che in entrambe le popolazioni analizzate il morfotipo femminile dominante è rappresentato dalla forma *typica*, seguito dalla forma *melanogastrum* in numeri notevolmente inferiori. La forma *erythrogastrum* (androcroma) e le altre due forme intermedie non sono mai state osservate durante i campionamenti.

Questo dato è stato ottenuto anche un altro studio (Andrés & Cordero, 1999) effettuato in Galizia (Spagna) in cui la femmina *typica* è stata osservata in percentuali maggiori in tutte le popolazioni considerate tranne una; analogamente a questo studio la forma *melanogastrum* ha sempre rappresentato il secondo morfotipo più comune. A differenza del presente studio, Andrés & Cordero (1999) in tutte le popolazioni studiate tranne in una hanno rinvenuto la femmina androcroma (forma *erythrogastrum*). La frequenza di questo morfotipo è tuttavia molto variabile, passando da uno 0%, riscontrato ad esempio nella singola popolazione in Galizia ed in una popolazione italiana (Carini, 1995), ad un 97,5% in alcune popolazioni in Germania (Andrés & Cordero, 1999).

L'esistenza dei tre morfotipi principali in *Ceriagrion tenellum* è spiegata da un sistema genetico simile a quello descritto per *I. graelsii* e *I. elegans*: infatti Andrés & Cordero (1999) hanno allevato *Ceriagrion tenellum* in laboratorio ed hanno ipotizzato che il polimorfismo è controllato da un singolo locus autosomale con espressione limitata alle femmine; questo locus presenta tre alleli con dominanza gerarchica ($p^t > p^m > p^a$). Secondo questa ipotesi quindi la forma *typica* presenta tre genotipi ($p^t p^t$, $p^t p^m$, $p^t p^a$), la forma *melanogastrum* due ($p^m p^m$, $p^m p^a$) e la forma *erythrogastrum* un solo genotipo ($p^a p^a$).

La dominanza genetica dei morfotipi in questa specie potrebbe quindi essere alla base della frequenza dei morfotipi nelle popolazioni analizzate in questo studio.

In alcune specie del genere *Ischnura* per le quali è conosciuta la base genetica l'allele della femmina androcroma è recessivo (Johnson, 1964-1966); generalmente si afferma che per un locus polimorfico l'allele ancestrale è recessivo rispetto a quelli che si sono evoluti successivamente (Clarke *et al.*, 1985). Il principio, che prende il nome di "Haldane sieve" (Haldane, 1924), asserisce che un nuovo allele dominante può instaurarsi rapidamente in una popolazione solo se è presente un vantaggio selettivo (Haldane, 1924), ma comunque la probabilità che un allele recessivo vantaggioso si stabilisca in una

popolazione è molto ridotta (Turner, 1983). La possibilità che si instauri un allele recessivo con un vantaggio selettivo della nuova mutazione si verifica solo quando le popolazioni sono piccole. In tal caso la deriva genetica casuale gioca un ruolo essenziale nel far sì che il nuovo mutante si stabilisca (Clarke *et al.*, 1985).

Secondo il principio di Haldane (1924), quindi, le femmine di *Ischnura damula*, *I. demorsa* e *Ceriagrion tenellum*, in cui il morfotipo della forma androcroma è recessivo, erano ancestralmente simili ai maschi ed hanno successivamente evoluto il dimorfismo sessuale. I casi di *I. graelsii* e *I. elegans* suggeriscono la possibilità che questo polimorfismo si sia evoluto in modo diverso nei Coenagrionidae e indicano un valore adattativo di questo tratto. Tuttavia il principio di Haldane è probabilistico e non rinnega totalmente l'ipotesi che il morfotipo recessivo si sia evoluto successivamente ai dominanti; quindi è necessario che gli studi sulla genetica delle specie polimorfiche, in particolare relativi alla famiglia Coenagrionidae, approfondiscano questo aspetto.

I dati relativi alle dimensioni degli individui, a differenza del caso di *Ischnura elegans*, non hanno evidenziato nessuna variazione durante il periodo di campionamento. Questo risultato contrasta con un altro studio (Purse & Thompson, 2003) che ha riscontrato un trend stagionale nelle dimensioni sia dei maschi che delle femmine in *Coenagrion mercuriale*.

Nessuna differenza statisticamente significativa è stata riscontrata nelle dimensioni tra gli individui rinvenuti in accoppiamento o non accoppiati, analogamente ad un altro studio effettuato su *Ischnura denticollis* (Cordoba-Aguilar, 1995); in questo studio, analizzando maschi accoppiati e non accoppiati, sono state riscontrate differenze solo sulla asimmetria fluttuante e non sulle dimensioni effettive (Cordoba-Aguilar, 1995).

Inoltre i due morfotipi presentano dimensioni statisticamente non differenti; questo dato non fornisce alcuna informazione a supporto di eventuali differenze nella fitness dei due morfotipi.

L'unica differenza statisticamente significativa rinvenuta in questo studio è rappresentata dalle maggiori dimensioni di entrambi i morfotipi femminili rispetto ai maschi, in accordo con un altro studio sulla stessa specie (Purse & Thompson, 2003).

I risultati non forniscono indizi relativamente a fattori che possono giocare un ruolo nel mantenimento del polimorfismo femminile e la scelta effettuata dai maschi per l'accoppiamento non può essere valutata a causa di una frequenza molto bassa della forma *melanogastrum*.

I risultati di questo studio, nel loro insieme, portano a suggerire che nelle popolazioni analizzate il polimorfismo sia mantenuto essenzialmente dalla base genetica di questo fenomeno, anche se ciò non spiega una frequenza così bassa di femmine *melanogastrum*.

Tuttavia la frequenza dei morfotipi in *Ceriagrion tenellum* risulta molto più variabile, considerando un numero maggiore di popolazioni, rispetto ad altri studi sui Coenagrionidae (Andrés & Cordero, 1999). Questo può essere spiegato dagli effetti del fondatore e dal drift genetico casuale, oppure da un'eventuale relazione tra la frequenza dei morfotipi e fattori ecologici.

In Spagna nel 1995 più di 1000 individui sono stati marcati in un'ampia zona umida (Andrés & Cordero, 1998) e nessuno di questi individui è stato ricatturato nelle aree più vicine con specifiche popolazioni. Questo risultato suggerisce che in questa specie in flusso di geni sia basso e l'esistenza del drift genetico associato al "founder effect" non può essere escluso. Inoltre studi precedenti (Andrés, 1998) non hanno riscontrato differenze nella fitness dei due morfotipi né fluttuazioni nella fitness dei morfotipi in relazione alle frequenze delle popolazioni studiate.

E' possibile che in *Ceriagrion tenellum* l'importanza relativa dei fattori casuali nel mantenimento del polimorfismo femminile sia maggiore rispetto ad altre specie della stessa famiglia, quali *Ischnura graelsii*, *Ischnura elegans* e *Nehalennia irene* (Cordero, 1992; Forbes *et al.*, 1995; Cordero *et al.*, 1998), in cui la densità delle popolazioni sembra essere il fattore determinante della frequenza dei morfotipi.

BIBLIOGRAFIA

Andrés J.A., 1998. Polimorfismo y selección sexual en *Ceriagrion tenellum* (Odonata). PhD Thesis, *Universidad de Vigo*, Vigo.

Andrés J.A., Cordero A., 1999. The inheritance of female colour morphs in the damselfly *Ceriagrion tenellum* (Odonata, Coenagrionidae). *Heredity*, 82(3):328-335.

Barker S. M., Williamson, J.E., 2010. Collaborative photo-identification and monitoring of grey nurse sharks (*Carcharias taurus*) at key aggregation sites along the eastern coast of Australia. *Marine and Freshwater Research*, 61:971-979.

Baur B., 1986. Patterns of dispersion, density and dispersal in alpine populations of the land snail *Arianta arbustorum* (L.) (Helicidae). *Holarctic Ecology*, 9:117-125

Beirinckx K., Van Gossum, H., Lajeunesse, M. J., Forbes, M.R., 2006. Sex biases in dispersal and philopatry: insights from a meta-analysis based on capture-mark-recapture studies of damselflies. *Oikos*, 113(3):539-547.

Borrer D.J., 1934. Ecological studies of *Argia moesta* Hagen (Odonata: Coenagrionidae) by means of marking. *Ohio Journal of Science*, 34:97-108.

Charmantier A., McCleery R.H., Cole L.R., Perrins C., Kruuk L.E., Sheldon, B.C., 2008. Adaptive phenotypic plasticity in response to climate change in a wild bird population. *Science*, 320(5877):800-803.

Clarke S.C., Clarke I.F., Collins S.C., Gill A.C., Turner J.R., 1985. Male-like females, mimicry and transvestism in butterflies (Lepidoptera: Papilionidae). *Systematic Entomology*, 10(3):257-283.

Cordero A., 1991. Drought-induced dispersal in *Calopteryx haemorrhoidalis* (Vander Linden) (Odonata: Calopterygidae). *Opuscula Zoologica Fluminensia*, 64:1-6.

Cordero A., 1992. Density-dependent mating success and colour polymorphism in females of the damselfly *Ischnura graellsii* (Odonata: Coenagrionidae). *Journal of Animal Ecology*, 769-780.

Cordero A., Carbone S.S., Utzeri C., 1998. Mating opportunities and mating costs are reduced in androchrome female damselflies, *Ischnura elegans* (Odonata). *Animal Behaviour*, 55(1):185-197.

Córdoba-Aguilar A., 1995. Fluctuating asymmetry in paired and unpaired damselfly males *Ischnura denticollis* (Burmeister) (Odonata: Coenagrionidae). *Journal of Ethology*, 13(1):129-132.

Córdoba-Aguilar A., Stocks R., 2008. Mark-recapture studies and demography, 7-20. In: (Cordoba-Aguilar A., 2008) Dragonflies and damselflies: model organisms for ecological and evolutionary research: model organisms for ecological and evolutionary research. *Oxford University Press*.

Correia M., Palma J., Koldewey H., Andrade J.P., 2014. The use of a non-invasive tool for capture-recapture studies on a seahorse *Hippocampus guttulatus* population. *Journal of Fish Biology*, 84(4):872-884.

Crespin L., Harris M.P., Lebreton J.D., Wanless S., 2006. Increased adult mortality and reduced breeding success with age in a population of common guillemot *Uria aalge* using marked birds of unknown age. *Journal of Avian Biology*, 37(3):273-282.

Cunjak R. A., Roussel J.M., Gray M.A., Dietrich J.P., Cartwright D.F., Munkittrick K.R., Jardine T.D., 2005. Using stable isotope analysis with telemetry or mark-recapture data to identify fish movement and foraging. *Oecologia*, 144(4):636-646.

Forbes M.R., Richardson J.M., Baker R.L., 1995. Frequency of female morphs is related to an index of male density in the damselfly, *Nehalennia irene* (Hagen). *Ecoscience*, 28-33.

Geenen S., Jordaens K., De Block M., Stoks R., De Bruyn L., 2000. Genetic differentiation and dispersal among populations of the damselfly *Lestes viridis* (Odonata). *Journal of the North American Benthological Society*, 19(2):321-328.

Haldane J.B.S., 1924. A mathematical theory of natural and artificial selection. Part II the influence of partial self-fertilisation, inbreeding, assortative mating, and selective fertilisation on the composition of mendelian populations, and on natural selection. *Biological reviews*, 1(3):158-163.

Jank, M.R., Barker N.P., 2013. Using Mark-recapture to provide population census data for use in Red Listing of invertebrates: the rare terrestrial snail *Prestonella bowkeri* as a case study. *Biodiversity and Conservation*, 22(8):1609-1621.

Johnson C., 1964. The inheritance of female dimorphism in the damselfly, *Ischnura damula*. *Genetics*, 49(3):513.

Johnson C., 1966. Genetics of female dimorphism in *Ischnura demorsa*. *Heredity*, 21:453-459.

Johnson M.S., Black R., 1991. Growth, survivorship, and population size in the land snail *Rhagada convicta* Cox, 1870 (Pulmonata: Camaenidae) from a semiarid environment in eastern Australia. *Journal of Molluscan Studies*, 57:367-374.

Kiss B., Samu F., 2000. Evaluation of population densities of the common wolf spider *Pardosa agrestis* (Araneae: Lycosidae) in Hungarian alfalfa fields using mark-recapture. *European Journal of Entomology*, 97:191-195.

Kitchen-Wheeler A.M., 2010. Visual identification of individual manta ray (*Manta alfredi*) in the Maldives Islands, Western Indian Ocean. *Marine Biology Research*, 6:351-363.

Krebs J.C., 1999. Ecological methodology. *Addison Wesley Longman Inc*, Menlo Park, California.

Maier C., Bachinger K., Mörtel J., Engel C., Czipin L., Riedle-Bauer M., 2013. European stone fruit yellows: a mark, release and recapture experiment tracking the dispersal of its vector *Cacopsylla pruni* (Hemiptera: Psyllidae) in a model apricot orchard and epidemiological studies in lower Austria. *Journal of Phytopathology*, 161(10):713-722.

Mari F., Gentile L., Locati M., 2003. Utilizzo del trasponder come marcatura permanente per la fauna selvatica. *Journal of Mountain Ecology*, 7:27-30.

Meekan M.G., Bradshaw C.J.A., Press M., McLean C., Richards A., Quasnichka S., Taylor J.G., 2006. Population size and structure of whale sharks *Rhincodon typus* at Ningaloo Reef, Western Australia. *Marine Ecology Progress Series*, 319:275-285.

Neira M., Lacroix R., Cáceres L., Kaiser P.E., Young J., Pineda L., Black I., Sosa N., Nimmo D., Alphey L., McKemey A., 2014. Estimation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) population size and adult male survival in an urban area in Panama. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 109(7):879-886.

Nichols J.D., 1992. Capture-recapture models. *BioScience*, 42:94-102.

Papazian M., 1988. A propos de *Ceriagrion tenellum* (de Villers, 1789) observé en Corse (Odonata Zygoptera: Coenagrionidae). *Martinia*, 4:17-18.

Pradel R., 1996. Utilization of capture-mark-recapture for the study of recruitment and population growth rate. *Biometrics*, 52:703-709.

Purse B.V., Thompson D.J., 2003. Emergence of the damselflies, *Coenagrion mercuriale* and *Ceriagrion tenellum* (Odonata: Coenagrionidae), at their northern range margins, in Britain. *European Journal of Entomology*, 100(1):93-100.

R Development Core Team, 2008. R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria.

Rouquette J.R., Thompson D.J., 2007. Patterns of movement and dispersal in an endangered damselfly and the consequences for its management. *Journal of Applied Ecology*, 44(3):692-701.

Selys L.E.D., 1876. Synopsis des agrionnes, 5e légion: Agrion (Suite). *Bull. Acad. R. Belg.*, 5:712-714.

Silvy N.J., Lopez R.R., Peterson, M.J., 2005. Wildlife marking techniques. Techniques for wildlife investigations and management. In: (Brunn C.E.) Techniques for wildlife investigations and management. *The Wildlife Society*, Bethesda, MD, 339-376.

Southwood T.R.E., Henderson P.A., 2000 Ecological methods. *Blackwell Science Ltd*, Oxford.

Torres-Vila L.M., Sánchez-González Á., Merino-Martínez J., Ponce-Escudero F., Conejo-Rodríguez Y., Martín-Vertedor D., Ferrero-García J. J., 2013. Mark-recapture of *Cerambyx welensii* in dehesa woodlands: dispersal behaviour, population density, and mass trapping efficiency with low trap densities. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 149(3):273-281.

Turner J.R.G., 1983. Mimetic butterflies and punctuated equilibria: some old light on a new paradigm. *Biological Journal of the Linnean Society*, 20(3):277-300.

Utzeri C., Carchini G., Falchetti E., 1988. Aspects of demography in *Lestes barbarus* (Fabr.) and *L. virens vestalis* Ramb. (Zygoptera: Lestidae). *Odonatologica*, 17:107-114

Watts P.C., Saccheri I.J., Kemp S.J., Thompson D.J., 2007. Effective population sizes and migration rates in fragmented populations of an endangered insect (*Coenagrion mercuriale*: Odonata). *Journal of Animal Ecology*, 76(4):790-800.

Williams B.K., Nichols J.D., Conroy M.J., 2002. Analysis and management of animal populations: modeling, estimation and decision making. *Academic Press*. San Diego, CA.

CAPITOLO 3

**Effetto degli insetticidi diflubenzuron e
alfa-cipermetrina su specie non target:
Ischnura elegans e *Daphnia magna***

RIASSUNTO

Allo scopo di ricercare le cause del mantenimento del polimorfismo nella specie *Ischnura elegans* è stata presa in considerazione l'ipotesi che i morfotipi femminili potessero presentare una diversa sensibilità ai fattori ambientali. Per questo motivo è stato allestito un allevamento ed è stato testato l'effetto di due contaminanti ambientali sulle larve prodotte dai due morfotipi (A e B) della specie in esame.

In particolare sono stati scelti due insetticidi comunemente utilizzati in risaia, l'alfa-cipermetrina e il diflubenzuron. In laboratorio le due sostanze sono state somministrate separatamente alle uova e alle larve di *I. elegans* ed è stato successivamente effettuato un esperimento analogo utilizzando una miscela dei due inquinanti al fine di ricreare il più possibile ciò che avviene in risaia. Nei test con singolo insetticida il trattamento è stato effettuato con 3 livelli di concentrazione (diflubenzuron: 1, 0.1, 0.01 µl/l; alfa-cipermetrina 1, 0.1, 0.01 mg/l), dei quali il più elevato è pari alla quantità comunemente utilizzata in risaia, mentre per la miscela è stata somministrata la concentrazione più bassa dei due pesticidi. Durante il periodo di allevamento sono stati raccolti dati relativi alla crescita ed alla mortalità delle larve trattate rispetto ai controlli. Durante tutte le fasi dell'allevamento sono state mantenute separate le uova o larve derivanti dai due morfotipi femminili.

E' stata riscontrata una mortalità maggiore nelle larve trattate, rispetto ai controlli, sia con le singole sostanze alle tre concentrazioni considerate, sia nell'esperimento in cui è stata utilizzata la miscela.

I dati relativi alla crescita e alla mortalità della prole dei due morfotipi non presentano differenze significative, evidenziando in entrambi un'elevata mortalità.

Parallelamente sono stati condotti test di tossicità (ISO 6341:2012) su *Daphnia magna* con gli stessi insetticidi e le stesse concentrazioni, al fine di poter effettuare un confronto su un'altra specie non target, comunemente utilizzata nei test ecotossicologici. I test effettuati mostrano una significativa diminuzione della percentuale di mobilità di *D. magna* a 24 ore dalla somministrazione per tutte le concentrazioni di insetticida.

INTRODUZIONE

Allo scopo di ricercare le cause del mantenimento del polimorfismo nella specie *Ischnura elegans* è stata presa in considerazione l'ipotesi che i morfotipi femminili potessero presentare una diversa sensibilità ai fattori ambientali.

Diversi morfotipi all'interno di una singola specie possono continuare ad esistere nel tempo solo se la fitness relativa di ognuno di essi varia continuamente, in modo da non favorire nessuno di loro (Hedrick, 1986). Il mantenimento del polimorfismo è stato tradizionalmente spiegato da conflitti sessuali dipendenti dalla frequenza e dalla densità di popolazione, mentre il ruolo dei fattori abiotici ha solo recentemente suscitato un maggior interesse (Bouton *et al.*, 2011). Il polimorfismo può essere il risultato di una variazione temporale o spaziale (Abbott, 2013); ad esempio, morfotipi diversi potrebbero preferire condizioni biotiche o abiotiche leggermente differenti (Chang & Emlen, 1993; Munday *et al.*, 2003; Ahnesjö & Forsman, 2006). Il polimorfismo cromatico è solitamente associato con variazioni in più tratti tra loro collegati (McKinnon & Pierotti, 2010) e differenze ecologiche tra i morfotipi sono state osservate anche in specie nelle quali si è pensato a lungo che il polimorfismo fosse semplicemente legato a differenze genetiche (Schemske & Bierzychudek, 2007).

Diversi studi hanno esaminato il ruolo che la temperatura avrebbe nel determinare la frequenza dei morfotipi femminili, ma l'evidenza del suo contributo al polimorfismo non è ancora stato del tutto chiarito (Abbott, 2013). In effetti alcuni di questi studi hanno riscontrato una relazione (Bots *et al.*, 2009; Takahashi *et al.*, 2011), mentre altri non hanno trovato interazioni significative tra la temperatura e i morfotipi (Bots *et al.*, 2008; Bouton *et al.*, 2011).

In uno studio sperimentale Abbot (2013) ha effettuato una manipolazione della temperatura sulle larve di *Ischnura elegans* in condizioni di laboratorio in modo da ricercare eventuali differenze durante l'intero ciclo vitale. In questo studio (Abbott, 2013) le femmine androcrome sono risultate più grandi rispetto all'altro morfotipo quando esposte a temperature inferiori durante lo sviluppo; ciò suggerisce che le androcrome presentino una resistenza maggiore al freddo, coerentemente con altri studi effettuati su specie del genere *Ischnura* (Takahashi *et al.*, 2011). Il vantaggio relativo alle maggiori dimensioni potrebbe essere riconducibile alle maggiori frequenze delle femmine

androcrome osservate nelle aree più fredde e può rappresentare il motivo per cui, su larga scala, la frequenza delle androcrome aumenta con l'aumentare della latitudine in *Ischnura elegans* (Gosden *et al.*, 2011).

Un recente articolo di Stocks & de Block (2011) ha esaminato la resistenza agli shock termici dovuti alla proteina Hsp70 in *Ischnura elegans* trovando che le popolazioni più nordiche presentano maggiore resistenza agli shock termici dovuti al freddo e che presentano livelli di Hsp70 più elevati. Non sono state esaminate eventuali differenze tra i morfotipi; sulla base dei risultati di Abbott (2013) si potrebbe prevedere che le androcrome presentino livelli più elevati di questa proteina.

In considerazione di questo recente interesse per l'effetto che i fattori abiotici potrebbero avere sulla frequenza dei morfotipi, in questo studio è stato allestito un allevamento ed è stato testato l'effetto di due contaminanti ambientali sulle larve prodotte dai due morfotipi (A e B) della specie in esame.

L'utilizzo di comunità multispecie come modello degli ecosistemi naturali risulta apparentemente il miglior modo per valutare il rischio potenziale legato alla tossicità di numerose sostanze (Crossland & La Point, 1992; Williams *et al.*, 2002). Tuttavia, un confronto della tolleranza di individui di specie differenti studiate separatamente può fornire interessanti informazioni complementari; ad esempio Beketov (2004) si è occupato di valutare la sensibilità delle larve di alcuni insetti comunemente presenti nelle acque lentiche nella regione Palearctica. In particolare ha studiato gli effetti su due specie di efemerotteri (*Cloeon dipterum* e *Caenis miliaria*), una specie di damigella (*Lestes sponsa*) ed una specie di libellula (*Cordulia aenea*); similmente ad altri organismi che vivono in acque lentiche, questi insetti sono abbastanza tolleranti ad ammonio, nitrati e fosfati (Beketov, 2002) e ad altre sostanze di origine naturale (Galatowitsch *et al.*, 1999), ma possono risultare estremamente sensibili ai pesticidi.

Sono numerosi gli organismi che negli anni sono stati utilizzati per valutare la presenza e gli effetti degli inquinanti in ambiente acquatico (tra cui gli Invertebrati: Ditteri, Efemerotteri, Tricotteri e Crostacei). Gli Insetti in particolare presentano una tolleranza selettiva relativamente agli inquinanti ed i loro stadi larvali risultano per questa ragione ideali per testare la presenza di insetticidi ed ottenere informazioni sulle

proprietà tossiche di determinate sostanze, soluzioni o miscele (Beketov, 2004; Hurd *et al.*, 2006; Tang & Siegfried, 1995).

Per questi motivi in questo studio si è scelto di utilizzare gli stadi larvali degli Odonati per testare l'effetto di sostanze chimiche su specie non target.

Per il loro ruolo di predatori intermedi nell'ambito della catena trofica in acque lentiche e lotiche gli Odonati risultano degli ottimi indicatori dello stato di salute dell'ambiente, in particolare delle acque per quanto riguarda gli stadi larvali. Numerose ricerche hanno esaminato l'importanza di questi organismi per valutare la qualità dell'ambiente (Sahlén & Ekestubbe, 2001; D'Amico *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2007; Funk *et al.*, 2009; Cordoba-Aguilar, 2008) e sono stati anche creati e utilizzati appositi indici (Chovanec *et al.*, 2015); in particolare è stato sviluppato un indice denominato Odonate River Index (ORI) allo scopo di valutare le condizioni dell'intero corridoio fluviale nei fiumi alluvionali (Golfieri *et al.*, 2015) in quanto questi insetti forniscono informazioni sulle condizioni dei siti riproduttivi e delle circostanti aree terrestri. Questo indice è lo sviluppo del sistema di valutazione proposto in Austria (Chovanec & Waringer, 2001) chiamato Odonate Habitat Index (OHI), basato su una precedente analisi del macrozoobenthos e adattato al fine di soddisfare i requisiti associati all'analisi degli Odonati, quali ad esempio la valutazione delle preferenze degli habitat delle specie, l'abbondanza ed il peso relativo delle specie.

Gli Odonati tuttavia non risultano ancora largamente utilizzati nel campo dell'ecotossicologia (Beketov, 2004; Buckland-Nicks *et al.*, 2014; Tollet *et al.*, 2009), in particolare non sono numerosi gli studi che utilizzano una specie modello per i test (Stewart, 1996; Chang *et al.*, 2009). Recentemente, però, alcuni studi hanno testato gli effetti di vari erbicidi e pesticidi sugli stadi larvali degli Odonati, tra cui azinphos-methyl e carbayl (Hardersen & Wratten, 2000), diflubenzuron (Hurd *et al.*, 1996), avermectina, imidacloprid e fipronil (Chang *et al.*, 2007; Jinguji *et al.*, 2010), PFOS (Van Gossum *et al.*, 2009).

Gli Odonati, e soprattutto gli Zigotteri (damigelle), si prestano particolarmente bene ad un utilizzo come indicatori della tossicità dell'ambiente poichè risultano ben conosciuti (Corbet, 1999), i risultati ottenuti sono rappresentativi anche di altri taxa acquatici condividendone numerose caratteristiche (Stocks *et al.*, 2015), presentano

ampie distribuzioni, mobilità limitata e vita abbastanza lunga, e sono adatti per l'allevamento in laboratorio (Hardersen & Wratten, 2000).

La caratteristica più importante degli Zigotteri è quella di presentare una sensibilità elevata a diverse sostanze, non solo in termini di mortalità ma anche manifestata con effetti sul comportamento e sullo sviluppo corporeo. Ad esempio Van Gossum *et al.* (2009) hanno riscontrato una riduzione dell'attività, della capacità di fuga dai predatori e dell'efficienza nella nutrizione in larve di *Enallagma cyathigerum* trattate con PFOS (acido perfluorooctansolfonico). In due studi effettuati su Odonati appartenenti ad entrambi i sottordini sono state evidenziate correlazioni tra la presenza di insetticidi e la simmetria bilaterale nelle larve (Chang, 2008; Al-Shami *et al.*, 2014).

Le damigelle sono risultate sensibili a organofosfati (Johnson & Finley, 1980; Muirhead-Thomson, 1987; Siegfried, 1993; Tang & Siegfried, 1995) e diversi altri contaminanti ambientali (Siegfried & Young, 1993; Corbi *et al.*, 2011); ad esempio Heintzman *et al.* (2015) hanno indagato sulla presenza di IPA (idrocarburi policiclici aromatici) nei tessuti di Odonati adulti, mentre Takamura *et al.* (1991) hanno analizzato la struttura della popolazione odontologica in zone trattate con numerose sostanze erbicide ed insetticide.

In questo studio sono stati testati gli effetti di due inquinanti comunemente utilizzati in ambito risicolo sulla specie *Ischnura elegans* (Odonata: Coenagrionidae), damigella comune e diffusa in tutto il territorio italiano. Questa specie permette un efficace modello di allevamento (Cordero, 1993; Piersanti *et al.*, 2015) ed è stata utilizzata in altri studi legati all'ecotossicologia; in particolare Van Praet *et al.* (2012-2014a-2014b) hanno effettuato studi relativi all'accumulo di diversi contaminanti organici nei tessuti delle larve di *I. elegans* e ricerche incentrate sull'analisi di effetti subletali legati all'accumulo nei tessuti larvali di quattro pesticidi. Van *et al.* (2014) hanno condotto studi su larve di *I. elegans* trattate con un organofosfato (chlorpyrifos) che induce una riduzione nel comportamento predatorio ed in particolare una riduzione nell'orientamento della testa e nel numero di attacchi compiuti.

Contemporaneamente gli effetti dei due insetticidi sono stati testati sulla specie *Daphnia magna*; questo crostaceo è l'organismo più sensibile ed il più comunemente usato nei test ecotossicologici e risulta presente praticamente in tutti gli

habitat d'acqua dolce (Alberdi *et al.*, 1996; Barry, 1996; Barata, 2005; Atienzar *et al.*, 2001; Kramer *et al.*, 2004; Boh net *al.*, 2008). Inoltre la sua suscettibilità agli inquinanti è rappresentativa dello zooplancton d'acqua dolce (LeBlanc, 1980) ed è anche per questo motivo usato come organismo standard da molte Agenzie per la Protezione dell'Ambiente e dall'Organizzazione Internazionale per la Normazione (ISO) per i protocolli standard (Zhu *et al.*, 2009). Il test ISO 6341:2012 prevede l'utilizzo della *Daphnia magna* per un test di mobilità comunemente utilizzato per gli ambienti di acqua dolce.

La *Daphnia sp.* è stata utilizzata per la valutazione di risposta di enzimi antiossidanti e danni a tessuti ossidativi a diverse concentrazioni di UV e e concentrazione di ossigeno (Vega & Pizarro, 2000; Borgeraas & Hessen, 2000 e 2002a,b) nonché per lo studio della tossicità di diverse sostanze (Beketov, 2004; Christensen *et al.*, 2005; Beketov & Liess, 2008; De Souza *et al.*, 2011; Touma *et al.*, 2013). Numerosi studi hanno valutato la tossicità del diflubenzuron su *Daphnia sp.* riscontrando aumento della mortalità (Ali & Mulla, 1978; Abe *et al.*, 2014; Dodson, 2002; De Souza *et al.*, 2011) e riduzione della crescita (Duchet *et al.*, 2011).

Diversi studi effettuati a livello di meso e microcosmo hanno dimostrato che i piretroidi possono modificare la struttura delle comunità zooplanctoniche e fitoplanctoniche (Day *et al.*, 1987; Helgen *et al.*, 1988; Yasuno *et al.*, 1988; Friberg-Jensen *et al.*, 2003; Wendt-Rasch *et al.*, 2003). In particolare l'abbondanza dei cladoceri, gruppo a cui appartiene la specie *Daphnia magna*, diminuisce successivamente all'applicazione dell'insetticida (Friberg-Jensen *et al.*, 2003; Wendt-Rasch *et al.*, 2003).

Considerando la posizione intermedia della *D. magna* nella rete alimentare degli ecosistemi di acqua dolce (Christensen *et al.*, 2005), una riduzione della sua abbondanza o di una ridotta capacità a nutrirsi e muoversi può risultare in un effetto a cascata sull'intero ecosistema provocando un aumento del fitoplancton ed un conseguente intorbidimento dell'acqua (Yasuno *et al.*, 1988; Friberg-Jensen *et al.*, 2003; Wendt-Rasch *et al.*, 2003).

In questo studio sono stati analizzati e comparati gli effetti del diflubenzuron e della cipermetrina su *Ischnura elegans* e *Daphnia magna*.

In laboratorio le due sostanze sono state somministrate separatamente alle uova e alle larve di *I. elegans* ed è stato successivamente effettuato un esperimento analogo utilizzando una miscela dei due inquinanti al fine di ricreare il più possibile ciò che avviene

in risaia. Nei test con singolo insetticida il trattamento è stato effettuato con 3 livelli di concentrazione (diflubenzuron: 1, 0.1, 0.01 $\mu\text{l/l}$; alfa-cipermetrina 1, 0.1, 0.01 mg/l), dei quali il più elevato è pari alla quantità comunemente utilizzata in risaia, mentre per la miscela è stata somministrata la concentrazione più bassa dei due pesticidi. Durante il periodo di allevamento sono stati raccolti dati relativi alla crescita ed alla mortalità delle larve trattate rispetto ai controlli. Durante tutte le fasi dell'allevamento sono state mantenute separate le uova o larve derivanti dai due morfotipi femminili.

MATERIALI E METODI

Insetticidi utilizzati

L'*alfa-cipermetrina* (Figura 1), noto anche come Contest, è un insetticida usato nella profilassi anti-zanzara.

Si tratta di un piretroide estremamente attivo, autorizzato dall'Unione Europea, che risulta in grado di agire molto rapidamente e con grande efficacia contro i parassiti presenti negli allevamenti, nelle zone residenziali e nelle zone delle attività produttive. Dal momento che questo insetticida è altamente stabile alla luce e a temperature elevate risulta molto pericoloso per gli habitat naturali ed in particolare per quelli acquatici a causa degli effetti tossici sugli organismi che ci vivono, come alghe, anellidi, aracnidi, crostacei, anfibi, mammiferi, pesci e insetti (tra cui gli Odonati) (ISPRA 2015).

Il *Diflubenzuron* (Figura 1) invece è un insetticida e aracnicida usato nella profilassi antizanzara ed è un regolatore della crescita (Franci *et al.* 2014); è in grado di inibire l'enzima chitina-sintetasi impedendo così la deposizione della chitina durante la muta della larva. Analisi ultrastrutturali hanno rivelato che questo tipo di sostanza porta ad una deposizione anormale di strati epicuticolari (Gijswijt *et al.*, 1979; Grosscurt, 1978b; Lim & Lee, 1982; Mulder & Rijswijk, 1973; Verloop & Ferrell, 1977). Inoltre il diflubenzuron impedisce anche la normale formazione della matrice peritrofica, membrana che riveste il lume intestinale e protegge l'epitelio dell'intestino medio da numerosi danni (Becker, 1978; Clarke *et al.*, 1977; Soltani, 1984). Il meccanismo di base del diflubenzuron è stato oggetto di numerose indagini che hanno considerato diverse specie di insetti (Merzendorfer *et al.*, 2012); l'azione alla base dell'effetto di questa sostanza sugli insetti è legata alla sua capacità di inibire l'attività della chitina-sintetasi, in quanto sono stati rinvenuti precursori radiomarcanti compromessi (Clarke & Jewess, 1990; Hajjar e Casida, 1978; Mayer *et al.*, 1980; Post & Vincent, 1973).

Durante la crescita le larve aumentano in dimensioni senza che sia presente la chitina nello strato più esterno e quando non riescono a compiere la metamorfosi muoiono rapidamente (Fontoura *et al.* 2012; Bellinato *et al.* 2015).

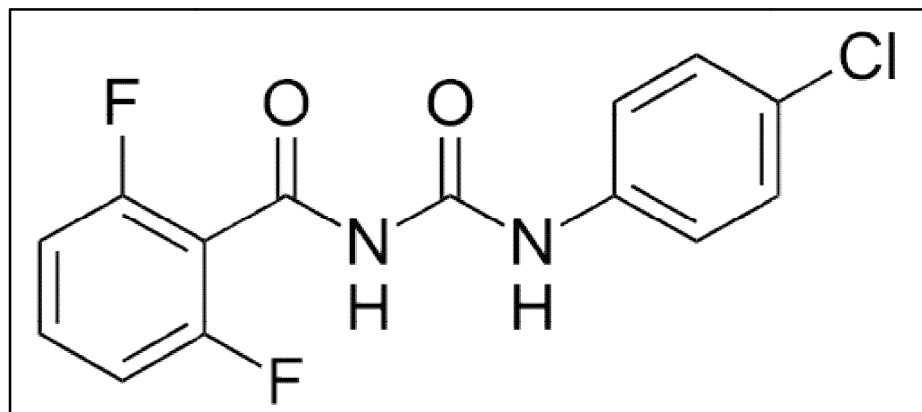
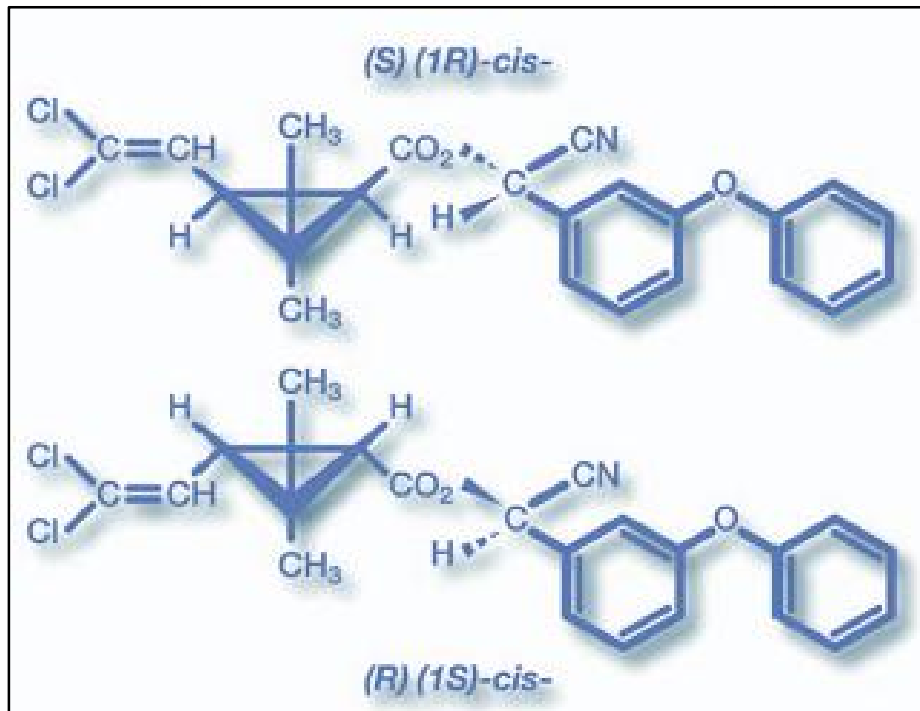


Figura 1: Molecole di alfa-cipermetrina (in alto) e di diflubenzuron (in basso)

Modello di allevamento di *Ischnura elegans*

L'allevamento è stato organizzato seguendo modelli di allevamento già sperimentati in altri studi (Cordero, 1993; Piersanti *et al.*, 2015) ed in particolare è stato seguito lo stesso metodo descritto nel capitolo relativo al polimorfismo di *Ischnura elegans*.

Una volta effettuata una stima iniziale delle uova deposte da ogni femmina, queste sono state divise in diversi gruppi di cui uno rappresentava il controllo mentre gli altri i gruppi sperimentali sottoposti all'effetto di diverse concentrazioni di insetticida.

I test con il Diflubenzuron sono stati effettuati alle concentrazioni 0.1 µl/l, 0.01 µl/l e 1 µl/l in due diversi esperimenti: nel primo (denominato DIFLU_UOVA) l'inquinante è stato somministrato alle uova, mentre nel secondo esperimento (DIFLU_LARVE) è stato somministrato alle larve a schiusa avvenuta.

Analogamente sono stati effettuati due test con il Contest (CONTEST_UOVA e CONTEST_LARVE) a concentrazioni 0.1 mg/l, 0.01 mg/l e 1 mg/l.

Per entrambi gli insetticidi la concentrazione maggiore, pari a 1 µl/l e 1 mg/l, è equivalente alla dose utilizzata normalmente in risaia, le altre risultano quindi diluite rispettivamente 10 e 100 volte.

Infine è stato effettuato un test somministrando una miscela delle due sostanze entrambe alla concentrazione 100 volte diluita rispetto alla dose utilizzata in risaia.

La somministrazione dell'inquinante è avvenuta in un solo momento durante tutto l'allevamento e non sono state eseguite aggiunte successive, al fine di simulare ciò che avviene in ambito risicolo con una singola somministrazione di insetticida da terra o con mezzo aereo. Per quanto riguarda le uova l'insetticida è stato inserito dopo 1 giorno dalla deposizione, mentre per le larve è stato somministrato dopo 6-7 giorni, in modo da permettere a tutte le uova di schiudere (le uova schiudono in modo leggermente asincrono nell'arco di 2-3 giorni).

Al fine di valutare gli effetti degli inquinanti sulla mortalità delle larve sono stati eseguiti dei conteggi 3 volte a settimana, mentre per valutare gli effetti sulla crescita sono state eseguite misurazioni delle stesse due volte a settimana.

Parallelamente alla somministrazione dei pesticidi alle larve di *I. elegans* sono stati effettuati test analoghi, considerando le stesse concentrazioni, 1 - 0,1 - 0.01 e controllo, su *Daphnia magna*. Un approfondimento sul metodo utilizzato per i test effettuati su *D. magna* è riportato in “*Approfondimento 2*”.

Approfondimento 2 - Test di tossicità su *Daphnia magna*

Uno degli organismi più usati per i bioassay è sicuramente la *Daphnia sp.*, un piccolo Crostaceo d'acqua dolce di facile allevamento e di buona reperibilità. La *Daphnia* è un Artropode di piccole dimensioni: gli individui adulti possono raggiungere i 5-6 mm mentre i piccoli appena arrivano al millimetro.

Al fine di valutare la tossicità di composti su specie acquatiche, sia acuta che cronica la *Daphnia magna* viene allevata in laboratorio, in una cella termostata a $20^{\circ}\text{C} \pm 1$ ed illuminata con luce a fluorescenza per 16 ore al giorno. Per l'allevamento viene utilizzata acqua distillata alla quale vengono aggiunte soluzioni di sali e vitamina B12 (acqua artificiale), areata 24 ore per portare la percentuale di saturazione dell'ossigeno al 100%.

La *Daphnia magna* è allevata in cristallizzatori di vetro del diametro di 130 mm riempiti con 1500 mL di acqua. La densità di popolazione è di circa un individuo ogni 50 ml di acqua. Viene nutrita con una soluzione di *Scenedesmus subspicatus* (Chlorococcales: Scenedesmaceae) in modo da ottenere un mezzo colturale con una densità di 60000 cell ml⁻¹, equivalente alla densità del fitoplancton durante una massiccia fioritura. Quando la densità di popolazione della coltura algale raggiunge $12,53 \times 10^6$ cell ml⁻¹, la soluzione algale viene centrifugata a 3000 giri min⁻¹ per 10 minuti. Il sovrantante viene eliminato e le alghe ridiluite in acqua artificiale.

Al fine di verificare la sensibilità degli organismi allevati si effettua un test di tossicità in condizioni standardizzate con una sostanza a tossicità nota (bicromato di potassio).

Per il test di tossicità si utilizzano neonati di età inferiore alle 24 ore poiché più sensibili. A questo scopo, prima dell'allestimento del test, si isolano un certo numero di femmine adulte prossime al parto, riconoscibili per la presenza di uova di colore arancio nella camera d'incubazione. I nati nelle 24 ore successive si pongono nelle soluzioni di tossico, senza alimento, utilizzando una pipetta Pasteur, facendo attenzione a trasferire il minor quantitativo possibile di acqua per non diluire le soluzioni del tossico.

Al termine delle 24 e delle 48 ore vengono conteggiati gli individui immobili.

Statistica

Per l'analisi statistica dei dati è stato utilizzato il software R (R Core Team 2015).

Per confrontare la sopravvivenza delle larve in relazione alla quantità di Contest e Diflubenzuron somministrato, è stato usato il "modello di sopravvivenza" implementato nel pacchetto "R survival" (Therneau, 2012). Nell'analisi è stato inserito il numero di individui sopravvissuti come variabile dipendente e i dati relativi al tempo e al gruppo sperimentale (1; 0,1; 0,01 e controllo) come variabili indipendenti. Le femmine, nell'analisi dei dati sono state inserite come "Random Effect" tramite l'opzione "frailty".

RISULTATI

Ischnura elegans

Confronto tra la prole dei due morfotipi

I dati analizzati della crescita ed alla mortalità delle larve dei due morfotipi considerati (A e B) sono relativi alle larve appartenenti al livello di concentrazione più basso, in quanto negli altri due livelli l'elevata mortalità non ha permesso di effettuare analisi statistiche significative, con un sufficiente numero di individui.

Le analisi statistiche effettuate sui dati relativi alla crescita non hanno evidenziato differenze significative tra la prole proveniente da femmine di diverso morfotipo (Grafico 1 - Tabella 1).

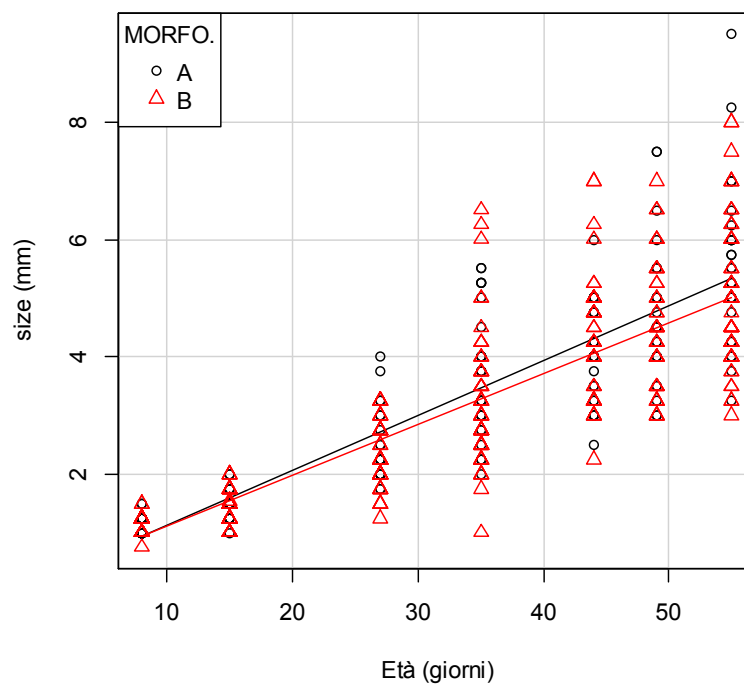


Grafico 1: andamento della crescita delle larve dei due morfotipi femminili

	Value	Std. Error	DF	t value	p-value
(Intercept)	0.4793928	0.14917561	641	3.21361	0.0014
ETA	0.0882851	0.00176613	641	49.98775	0.0000
MORFO [T . B]	-0.1333298	0.17782236	25	-0.74979	0.4604

Tabella 14: risultati statistici dell'analisi effettuata sui dati relativi alla crescita delle larve dei due morfotipi femminili

Anche le analisi effettuate sulla mortalità non hanno evidenziato differenze significative tra i due gruppi (Grafico 2 - Tabella 2).

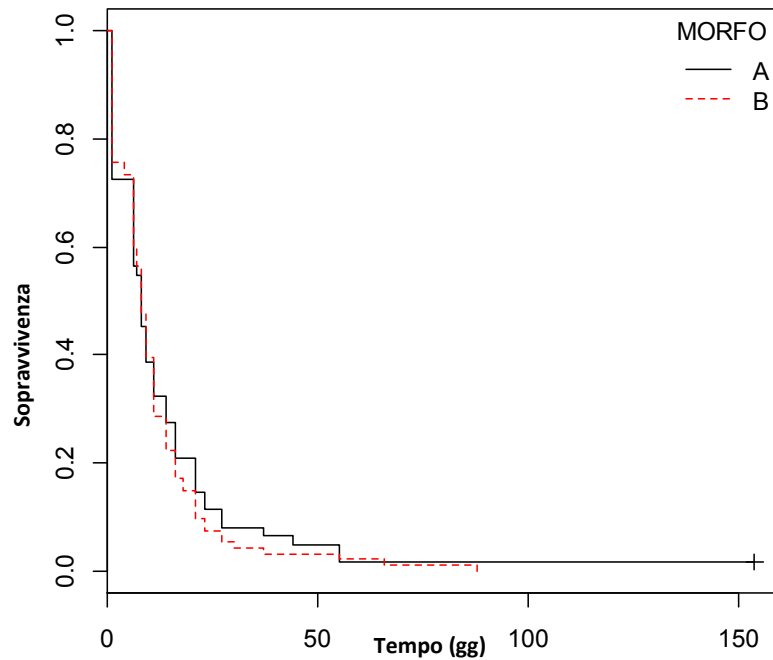


Grafico 2: andamento della mortalità delle larve dei due morfotipi

	coef	se (coef)	se2	Chisq	DF	p
MORFO [T.B]	0.1459	0.2084	0.1702	0.49	1.00	0.48
frailty (FEMMINA)				13.13	7.93	0.10

Tabella 2: risultati statistici dell'analisi effettuata sui dati relativi al tasso di sopravvivenza delle larve larve dei due morfotipi femminili

Confronto tra i livelli di concentrazione degli insetticidi

Diflubenzuron

Uova

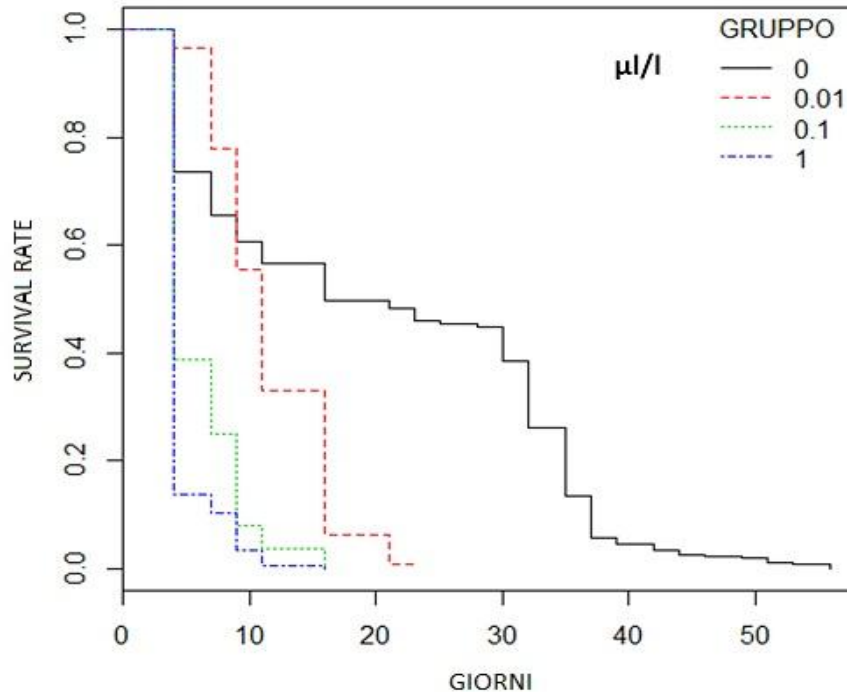


Grafico3: andamento della mortalità nelle larve nate da uova trattate con Diflubenzuron. Chisq= 878 con 3 gradi di libertà, $p < 0,001$

	coef	se(coef)	se2	Chisq	DF	p
GRUPPO[T.0.01]	1.269	0.10024	0.09994	160.2	1.00	<0,001
GRUPPO[T.0.1]	2.330	0.09882	0.09853	555.9	1.00	<0,001
GRUPPO[T.1]	2.913	0.10903	0.10872	714.0	1.00	<0,001
frailty(FEMMINA)				163.2	10.43	<0,001

Tabella 3: risultati statistici delle larve nate da uova trattate con Diflubenzuron

Come si evince dal Grafico 3 la mortalità della larve derivanti da uova trattate con Diflubenzuron è risultata elevata fin dai primi giorni dopo la schiusa. E' anche evidente come la diversa concentrazione dell'insetticida abbia influito su questo parametro, provocando una mortalità più distribuita nella larve trattate con una

concentrazione più bassa ed una mortalità quasi totale entri i primi 10 giorni per quanto riguarda le larve trattate con la concentrazione massima (Grafico 3).

Larve

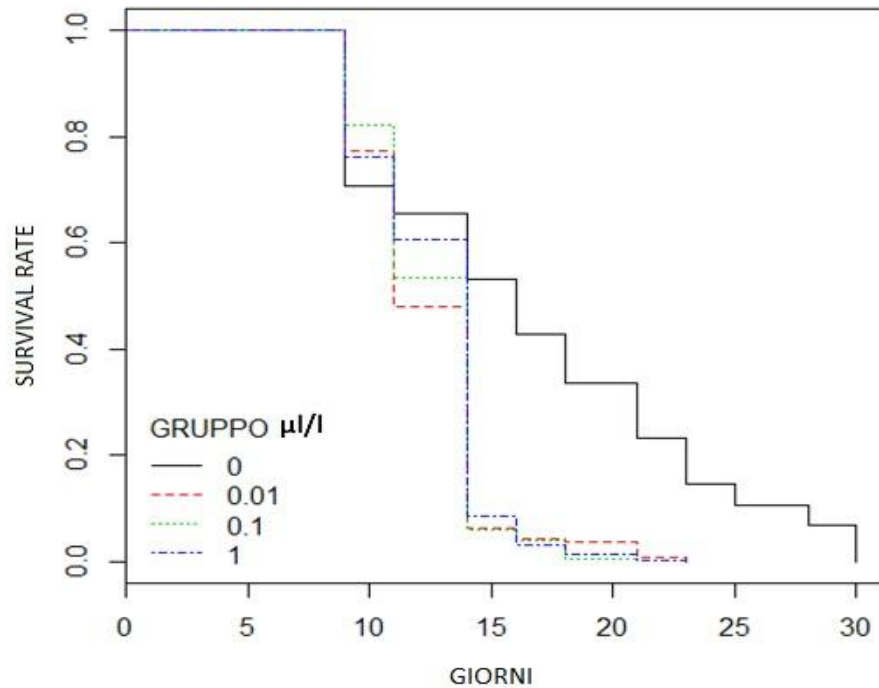


Grafico 4: andamento della mortalità nelle larve trattate con Diflubenzuron.
Chisq= 466 con 3 gradi di libertà, $p < 0,001$

	coef	se(coef)	se2	Chisq	DF	p
GRUPPO[T.0.01]	1.824	0.10492	0.10419	302.1	1.00	<0,001
GRUPPO[T.0.1]	1.785	0.10439	0.10374	292.3	1.00	<0,001
GRUPPO[T.1]	1.735	0.09632	0.09603	324.6	1.00	<0,001
frailty(FEMMINA)				48.5	12.52	<0,001

Tabella 4: risultati statistici delle larve trattate con Diflubenzuron

Il Grafico 4 mostra l'andamento delle larve trattate con Diflubenzuron dopo la schiusa. Nonostante graficamente l'andamento dei gruppi sia meno distinguibile rispetto all'esperimento precedente, la statistica ha evidenziato significative differenze tra questi indicando una mortalità maggiore nelle larve a cui è stato somministrato l'insetticida rispetto ai controlli (Tabella 4).

Contest

Uova

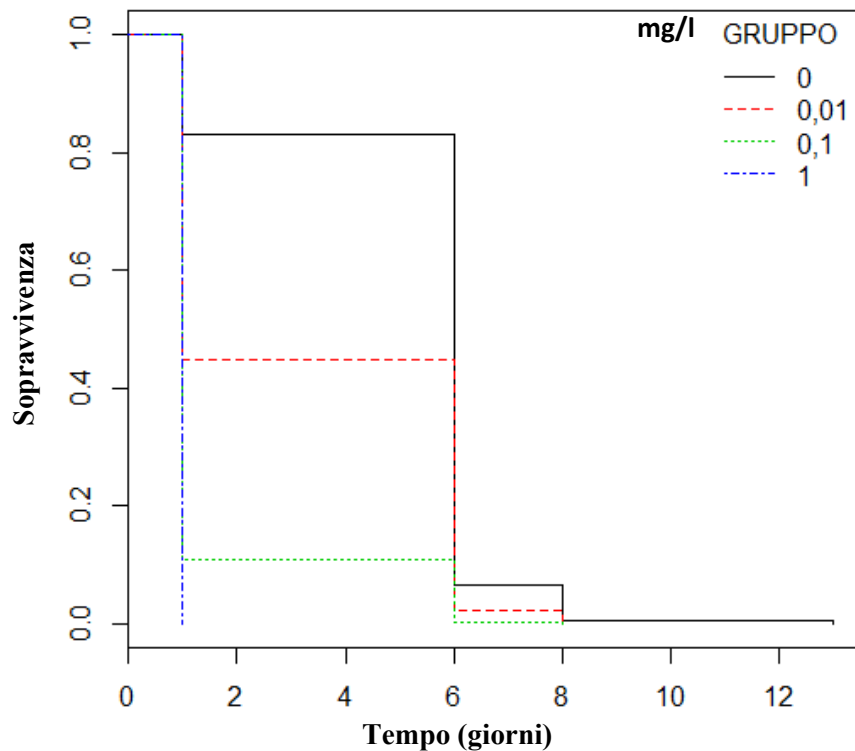


Grafico 5: andamento della mortalità nelle larve nate da uova trattate con Contest. Chisq=1935 con 3 gradi di libertà, $p < 0,001$.

	coef	se(coef)	se2	Chisq	DF	p
GRUPPO[T.0.01]	0.5492	0.04091	0.04066	180.2	1.00	<0,001
GRUPPO[T.0.1]	1.4921	0.04555	0.04520	1073.2	1.00	<0,001
GRUPPO[T.1]	1.8525	0.05393	0.05362	1180.1	1.00	<0,001
frailty(FEMMINA)				183.9	26.25	<0,001

Tabella 5: risultati statistici delle larve nate da uova trattate con Contest

Analogamente agli altri anche questo esperimento presenta differenze statisticamente significative tra i gruppi mostrando una mortalità maggiore nelle uova trattate con la concentrazione più alta di insetticida (Grafico 5 - Tabella 5).

Larve

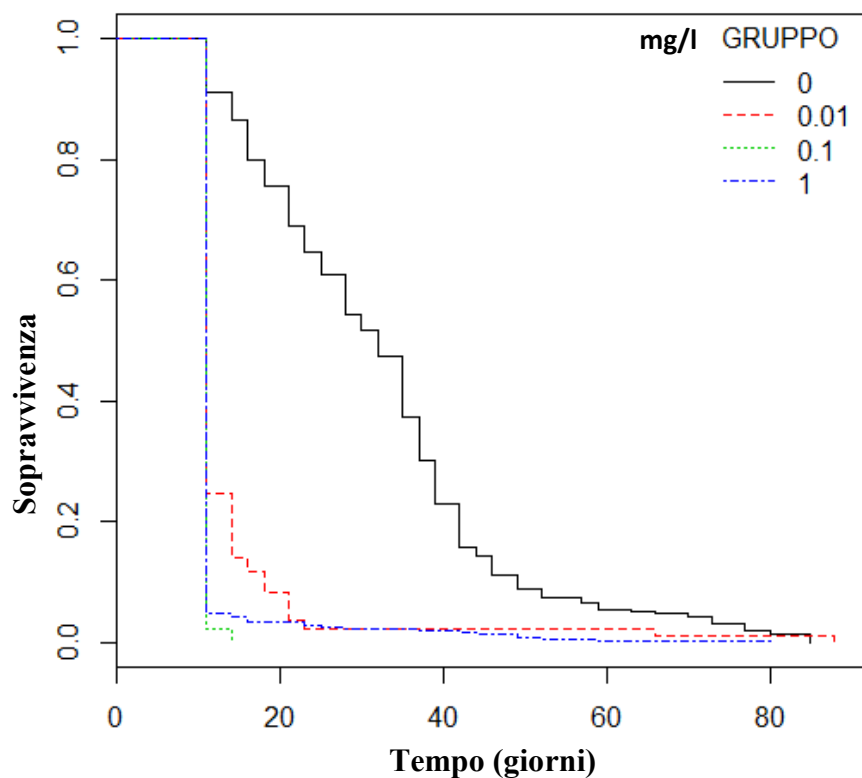


Grafico 6: andamento della mortalità nelle larve trattate con Contest.
Chisq=582 con 3 gradi di libertà, $p < 0,001$

	coef	se(coef)	se2	Chisq	DF	p
GRUPPO[T.0.01]	1.108	0.1710	0.1679	41.97	1.00	<0,001
GRUPPO[T.0.1]	2.786	0.2271	0.2259	150.49	1.00	<0,001
GRUPPO[T.1]	2.830	0.1240	0.1226	520.84	1.00	<0,001
frailty(FEMMINA)				307.53	16.78	<0,001

Tabella 6: risultati statistici delle larve trattate con Contest

Il Grafico 6 mostra l'andamento della mortalità delle larve trattate con Contest dopo la schiusa; è evidente come la mortalità differisca significativamente fra i 3 gruppi di concentrazione e come sia proporzionata alla concentrazione somministrata (Tabella 6).

Miscela di Contest (0,01 mg/l) e Diflubenzuron (0,01 µl/l)

Uova

La miscela dei due insetticidi utilizzata alla concentrazione 100 volte diluita rispetto a quella utilizzata in risaia è risultata letale per tutte le larve nate da uova trattate entro le 24 ore seguenti la schiusa. Per questo motivo non è stato possibile effettuare conteggi e misurazioni delle larve.

Larve

La miscela dei due insetticidi utilizzata alla concentrazione 100 volte diluita rispetto a quella utilizzata in risaia è risultata letale entro le 24 ore seguenti la schiusa per tutte le larve trattate. Per questo motivo non è stato possibile effettuare conteggi e misurazioni delle larve.

Daphnia magna

Diflubenzuron

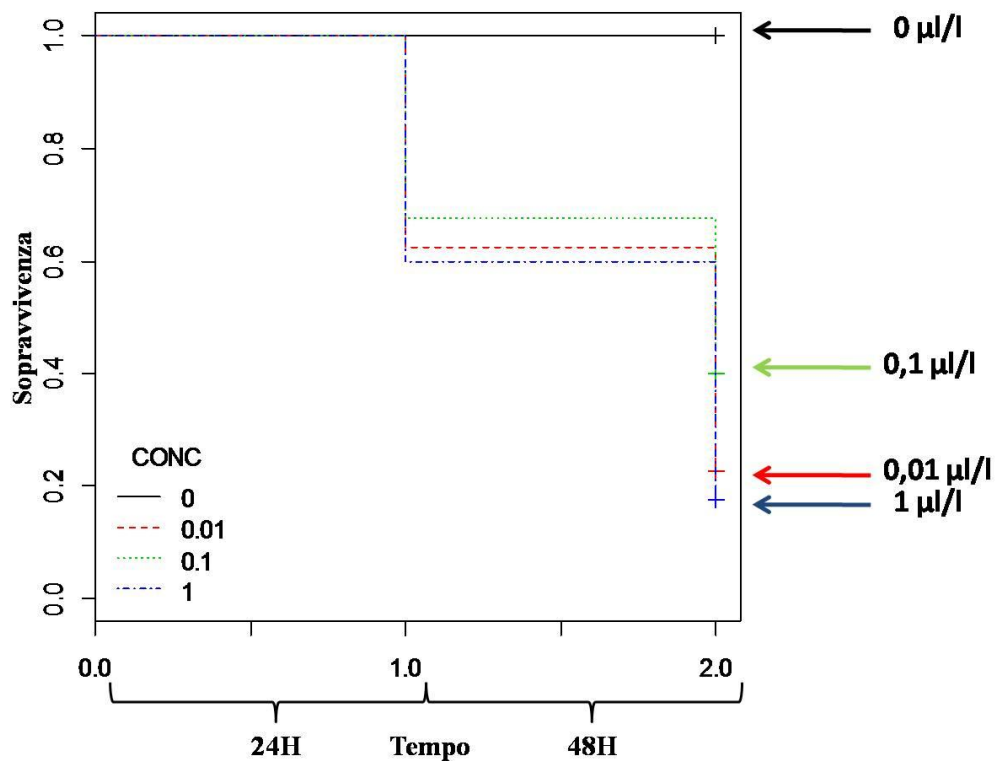


Grafico 7: andamento della mortalità nelle *D. magna* trattate con Diflubenzuron. Chisq=60,3 con 3 gradi di libertà, $p < 0,001$

Come si può notare nel Grafico 7 la mortalità è nulla nei controlli mentre è massima negli individui a cui è stata somministrata la massima concentrazione dell'insetticida. Le differenze tra gruppi sono statisticamente significative ($p < 0,001$).

Contest

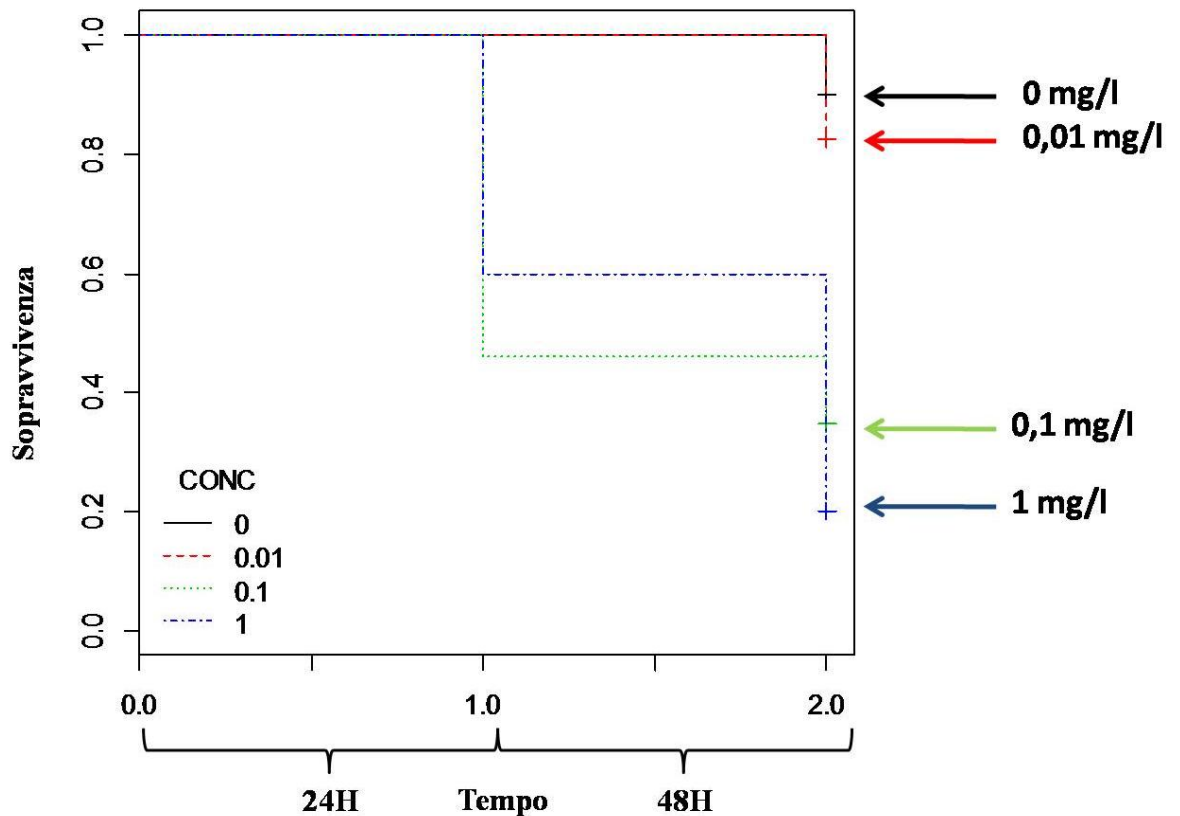


Grafico 8: andamento della mortalità nelle *D. magna* trattate con Contest. Chisq=64,1 con 3 gradi di libertà, $p < 0,001$

Anche le analisi effettuate sui dati relativi alle *D. magna* trattate con Contest evidenziano differenze significative ($p < 0,001$) tra i gruppi di concentrazione; in particolare è interessante notare come la differenza maggiore si verifichi tra i controlli e la concentrazione più elevata (Grafico 8).

Miscela di Contest e Diflubenzuron

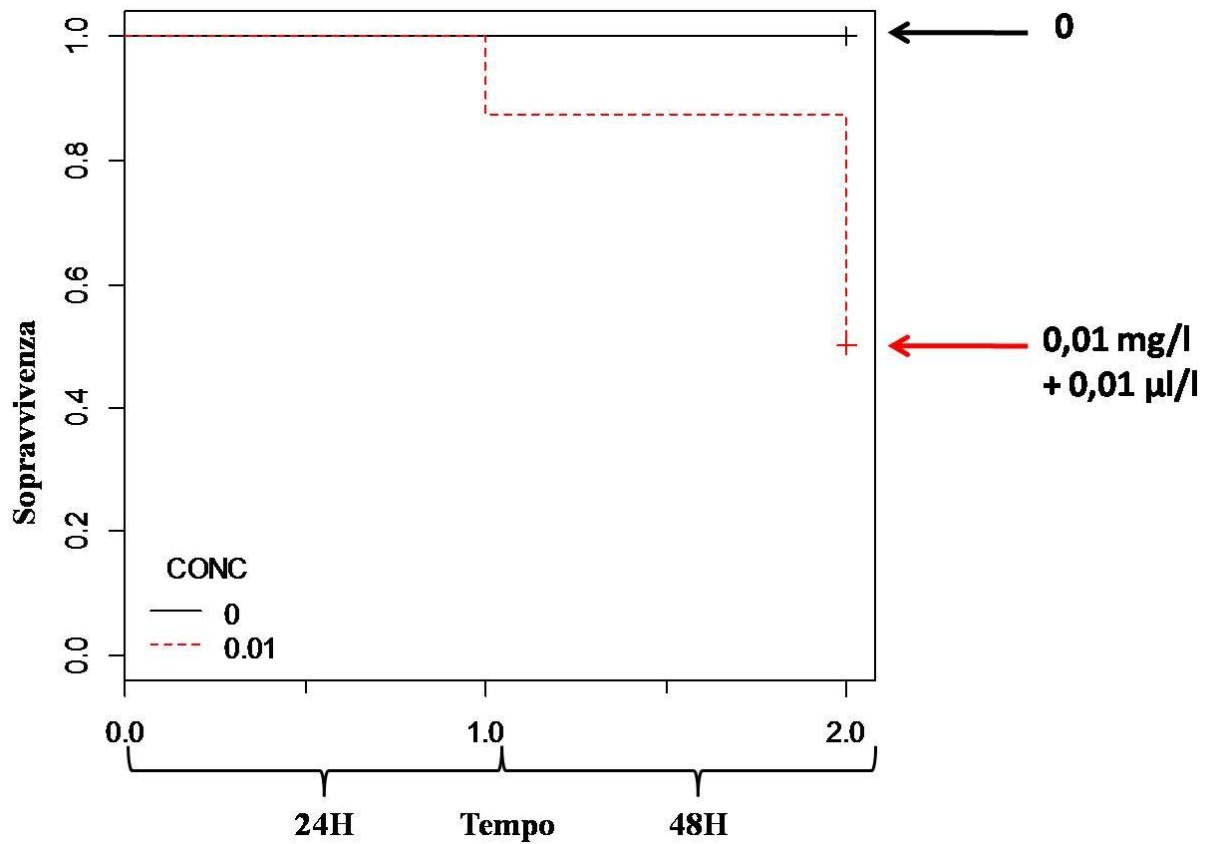


Grafico 9: andamento della mortalità nelle *D. magna* trattate con la miscela dei due insetticidi. $\text{Chisq}=26,2$ con 3 gradi di libertà, $p<0,001$

I risultati relativi alla miscela dei due insetticidi, infine, indicano una differenza significativa ($p<0,01$) tra la sopravvivenza degli organismi trattati con la miscela di Contest e Diflubenzuron e quelli di controllo (Grafico 9).

DISCUSSIONE

In questo studio ci si è posti due obiettivi: il primo è stato di individuare eventuali differenze nella crescita e nella mortalità delle larve di *Ischnura elegans* derivanti da femmine di morfotipo diverso in ambienti abiotici differenti, creati grazie alla somministrazione di due insetticidi e di una miscela di questi. Lo scopo è stato quello di evidenziare un eventuale differenza nella resistenza delle larve dei due morfotipi agli stress ambientali, al fine di ricercare possibili cause delle differenti frequenze dei due morfotipi in campo (vedi Cap.1).

I risultati non evidenziano differenze nella crescita corporea e nel tasso di sopravvivenza tra le larve provenienti da femmine di morfotipo diverso. Questi risultati rappresentano una novità, poiché non ci sono studi che abbiano indagato su differenti resistenze ai pesticidi delle uova o delle larve distinguendo tra il morfotipo delle femmine che le hanno prodotte.

Questi dati indicano che la maggior frequenza in campo di un morfotipo non può essere la conseguenza di una differente resistenza ai contaminanti ambientali, perlomeno alle concentrazioni elevate presenti negli ambienti di origine agraria.

Potrebbe senz'altro essere interessante indagare, a concentrazioni più basse, l'esistenza di possibili differenze nella tolleranza agli stress chimici. In effetti, per quanto riguarda un importante fattore fisico, la temperatura, è stato osservato che i morfotipi presentano reazioni differenti a diverse temperature. In *Ischnura elegans*, Abbott (2013) ha riscontrato una maggiore crescita nelle larve provenienti da femmine androcrome a basse temperature, mentre Gosden *et al.* (2011) hanno trovato una maggiore frequenza del morfotipo androcromo nei climi più freddi dell'Europa settentrionale. E' quindi possibile che anche dei fattori chimici possano influenzare la distribuzione e la frequenza dei diversi morfotipi femminili a larga scala. I dati del presente studio suggeriscono, però, che eventuali differenze di risposta tra i vari morfotipi debbano essere cercate in ambienti più naturali, mentre più difficilmente possano essere trovate in ambienti fortemente antropizzati, quali ad esempio le colture intensive in cui la concentrazione di pesticidi è molto elevata e gli effetti sugli organismi non target sono molto forti (Relyea, 2005).

Il secondo obiettivo è stato quello di valutare gli effetti di due pesticidi comunemente utilizzati in ambiente risicolo sulla specie *Ischnura eleganse* su *Daphnia magna* in modo da individuare l'impatto che queste sostanze hanno su specie non target.

Alle uova e alle larve di *I. elegans* sono stati somministrati, in fasi sperimentali separate e a differenti concentrazioni, il diflubenzuron, l'alfa-cipermetrina ed una miscela delle due sostanze.

I risultati di questa ricerca indicano un significativo calo nel tasso di sopravvivenza nelle larve trattate con diflubenzuron, con alfa-cipermetrina e con la miscela.

E' dimostrato come diversi insetticidi possano influire sull'abbondanza dei taxa nelle comunità di macroinvertebrati e sulla struttura della stessa (Suhling *et al.*, 2000; Berenzen *et al.*, 2005; Hurd *et al.*, 2006; Schafer *et al.*, 2007; Janssen *et al.*, 2003).

Diversi studi hanno inoltre indagato gli effetti di determinate sostanze sugli Odonati i quali, oltre a rivelarsi degli organismi ottimali su cui effettuare test tossicologici, presentano, in particolare le damigelle, una suscettibilità ai contaminanti che può ritenersi rappresentativa anche di altri insetti acquatici (Hardersen & Wratten, 1996). I risultati ottenuti con gli Odonati risultano, quindi, esportabili anche ad altri ordini.

Nel sottordine degli Anisotteri le larve di *Sympetrum infuscatum* (Odonata: Libellulidae) sottoposte agli effetti di imidacloprid, un insetticida che agisce come una neurotossina negli insetti, presentano un aumento significativo della mortalità già nei primi giorni successivi alla somministrazione. Inoltre è verificato che questa sostanza causa una diminuzione nello zooplancton presente nella comunità acquatica impattando indirettamente sulla possibilità di nutrizione delle larve di *S. infuscatum* (Jinguji *et al.*, 2013).

Numerosi sono invece gli autori che hanno scelto le damigelle per effettuare test tossicologici relativi a differenti contaminanti. Hardersen & Wratten (2000) hanno testato gli effetti di un organofosfato e di un carbammato sulla specie *Xanthocnemis zealandica*, appartenente al sottordine degli Zigotteri, individuando diminuzioni nel tasso di schiusa. Dhin Van *et al.* (2014) hanno individuato significative variazioni negli indicatori comportamentali, endpoint tipici dei predatori, tra cui ad esempio l'assunzione di cibo, che può ridurre la fitness nelle larve di *Ischnura elegans* (Stoks & Cordoba-Aguilar, 2012). Essa può inoltre ritardare il momento dello sfarfallamento e influenzarne il successo

(Pestana *et al.*, 2009) e ridurre la massa corporea della fase immaginale (Janssens *et al.*, 2014) diminuendone conseguentemente la fitness (Stoks & Cordoba-Aguilar, 2012).

Analogamente anche Van Gossum (2009) ha individuato una diminuzione nelle performance correlate al tasso di sopravvivenza in larve di *Enallagma cyathigerum* (Odonata: Coenagrionidae) trattate con crescenti concentrazioni di PFOS (acido perfluorooottansolfonico). In questo studio i primi effetti sono stati osservati a concentrazioni pari a 100 µg/l.

Beketov (2004) ha studiato l'effetto della miscela tra deltametrina ed esfenvalerate (piretroidi) su diversi organismi, tra cui larve di *Lestes sponsa* (Odonata: Lestidae), dimostrando un'elevata tossicità della sostanza per le damigelle a concentrazioni inferiori a 0,01 µg/l. Questi risultati sono paragonabili a quelli di questo studio relativi agli esperimenti effettuati con cipermetrina e diflubenzuron, in cui si riscontra un'elevata e rapida mortalità delle larve a concentrazione paragonabile.

I risultati dei test effettuati indicano anche un effetto significativo della concentrazione degli insetticidi sulla mortalità delle larve.

In particolare la risposta dose-dipendente della mortalità risulta essere più evidente nei gruppi sperimentali in cui gli insetticidi sono stati somministrati alle uova; la differenza tra i livelli di concentrazione sperimentati è statisticamente significativa in tutti i gruppi sperimentali ma le analisi statistiche effettuate sui risultati del trattamento alle uova indicano un maggiore divario tra le tre concentrazioni testate.

Considerato che la somministrazione della sostanza sulle uova avviene in modo indiretto verso la larva in questi casi, è plausibile ipotizzare che l'uovo offra qualche tipo di protezione all'embrione che si trova all'interno, filtrando la concentrazione effettivamente presente nell'acqua. Nel caso del trattamento successivo alla schiusa invece il contatto è diretto e di conseguenza, sebbene compaia un certo effetto dose-dipendente, la mortalità è più simile se si confrontano i tre livelli di concentrazione.

Non ci sono altri studi che abbiano cercato differenze derivanti dalla fase di somministrazione del contaminante. Tuttavia uno studio effettuato su *Libellula depressa* evidenzia alcune proprietà del corion delle uova di questa specie, tra cui è annoverata la capacità di proteggere l'embrione da microrganismi o funghi durante la segmentazione dell'uovo, nonché una generale protezione della larva al suo interno (Gaino *et al.*, 2008).

Gli studi esistenti che hanno analizzato la struttura delle uova sono tutti su specie di Anisotteri e, considerato che esistono differenze sostanziali tra la struttura delle uova di specie che compiono deposizione esofitica, come molti Anisotteri, o endofitica (Takahashi & Kawata, 2013, futuri studi potrebbero incentrarsi sulle uova degli Zigotteri per meglio comprendere le funzioni che esse svolgono, anche riguardo alla protezione dagli inquinanti.

I risultati ottenuti dalla sperimentazione dei due insetticidi su *Daphnia magna* indicano una mortalità, negli individui trattati con le due sostanze e la miscela, correlata al livello di concentrazione somministrato. In particolare i risultati mostrano come la mortalità più alta sia legata alla concentrazione maggiore, che conseguentemente è il livello che presenta una maggiore differenza con i controlli.

Altri studi hanno evidenziato un effetto tossico e una sensibilità elevata nella *D. magna* nei confronti del diflubenzuron e degli insetticidi piretroidi come l'alfa-cipermetrina.

Uno studio effettuato su popolazioni di invertebrati non target in alcuni laghi artificiali (Ali & Mulla, 1978) hanno evidenziato una diminuzione nelle popolazioni di entrambe le specie del genere *Daphnia* presenti in quell'habitat e ricerche più recenti (Kashian & Dodson, 2002) effettuate analizzando endpoint subletali su questa specie indicano una diminuzione della sopravvivenza.

Abe *et al.* (2014) hanno riscontrato un'elevata tossicità del diflubenzuron su *D. magna*, indicando che l'utilizzo di questa sostanza potrebbe risultare in un elevato rischio ambientale per questa specie; inoltre, analogamente ai risultati di questa ricerca, la mortalità di *D. magna* è stata osservata a concentrazioni inferiori rispetto a quelle che vengono comunemente somministrate in campo.

Anche i piretroidi sono stati indicati da diversi studi come molto tossici per *D. magna*. Toumi *et al.* (2013) hanno analizzato gli effetti tossici acuti e cronici della deltametrina su due popolazioni di *Daphnia magna* in laboratorio, rilevando effetti sulla sopravvivenza correlati con la concentrazione somministrata, fino ad arrivare ad un aumento nelle deformazioni embrionali. La deltametrina è risultata essere un interferente endocrino che agisce sulla determinazione del sesso e porta significative anomalie nello sviluppo.

Un altro studio ha rilevato risposte dose-dipendente nel trattamento di *D. magna* con il piretroide fenvalerate (Reynaldi & Liess, 2005); in particolare è stato osservato che questa sostanza ritarda l'età della prima riproduzione. Questo ritardo è associato, a concentrazioni più basse, ad una riduzione nel numero di giovani per femmina viva mentre, a concentrazioni più elevate, si verifica un'inibizione nella crescita della popolazione.

Nello studio effettuato da Christensen *et al.* (2005), in seguito a sperimentazioni effettuate con cipermetrina, sono stati osservati effetti sub letali sul contenuto intestinale di pigmenti di clorofilla e sostanze carboidrate nonché sull'abilità di nuotare di *D. magna*; questi effetti si sono verificati a quantità che rientrano del range di concentrazioni presenti nei sistemi di acque dolci successivamente all'applicazione di pesticidi. Anche in questo caso la diminuzione nella capacità di nuotare nella colonna d'acqua presenta una dipendenza dalla concentrazione somministrata.

In generale, i risultati di questo studio e di studi precedenti indicano che la dose attualmente utilizzata in risaia può pesantemente compromettere le popolazioni di *Ischnura elegans* e *Dahnia magna*.

In questo campo risultano evidenti gli effetti che gli insetticidi presentano su specie non target, individuando una problematica relativa alla gestione degli agro-ecosistemi e all'attuale utilizzo di pesticidi per le specie acquatiche.

BIBLIOGRAFIA

Abbott J.K., 2013. Morph-specific and sex-specific temperature effects on morphology in the colour polymorphic damselfly *Ischnura elegans*. *Animal Biology*, 63(2):149-167.

Abe F.R., Coleone A.C., Machado A.A., Gonçalves Machado-Neto J., 2014. Ecotoxicity and environmental risk assessment of larvicides used in the control of *Aedes aegypti* to *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera). *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A*, 77(1-3):37-45.

Ali A., Mulla M.S., 1978. Effects of chironomid larvicides and diflubenzuron on nontarget invertebrates in residential-recreational lakes. *Environmental Entomology*, 7(1):21-27.

Al-Shami S.A., Hishamuddin S.N., Che Salmah M.D.R., Abdul N.H., Hassan A., 2014. Developmental instability in Odonata larvae in relation to water quality of Serdang River, Kedah, Malaysia. *Life Science Journal*, 11(7).

Ahnesjö J., Forsman A., 2006. Differential habitat selection by pygmy grasshopper color morphs; interactive effects of temperature and predator avoidance. *Evolutionary Ecology*, 20(3), 235-257.

Beketov M.A., 2004. Comparative sensitivity to the insecticides deltamethrin and esfenvalerate of some aquatic insect larvae (Ephemeroptera and Odonata) and *Daphnia magna*. *Russian Journal Ecology*, 35:200-204.

Berenzen N., Kumke T., Schulz H.K., Schulz R., 2005. Macroinvertebrate community structure in agricultural streams: impact of runoff-related pesticide contamination. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60(1):37-46.

Bouton N., Iserbyt A., Van Gossum H., 2011. Thermal plasticity in life-history traits in the polymorphic blue-tailed damselfly, *Ischnura elegans*: no differences between female morphs. *Journal of Insect Science*, 11(1):112.

Bots, J. De Bruyn L., Van Damme R., Van Gossum H., 2008. Effects of phenotypic variation onto body temperature and flight activity in a polymorphic insect. *Physiological entomology*, 33(2):138-144.

Bots J., De Bruyn L., Van Dongen S., Smolders R., Van Gossum H., 2009. Female polymorphism, condition differences, and variation in male harassment and ambient temperature. *Biological Journal of the Linnean Society*, 97(3):545-554.

Buckland-Nicks A., Hillier K.N., Avery T.S., O'Driscoll N.J., 2014. Mercury bioaccumulation in dragonflies (Odonata: Anisoptera): examination of life stages and body regions. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(9):2047-2054.

Chang H.W., Emlen J.M., 1993. Seasonal variation of microhabitat distribution of the polymorphic land snail *Cepaea nemoralis*. *Oecologia*, 93(4):501-507.

Chang X., Zhai B., Liu X., Wang M., 2007. Effects of temperature stress and pesticide exposure on fluctuating asymmetry and mortality of *Coperia annulata* (Selys)(Odonata: Zygoptera) larvae. *Ecotoxicology and environmental safety*, 67(1):120-127.

Chang X., Zha, B., Wang B., Sun C., 2009. Effects of the mixture of avermectin and imidacloprid on mortality and developmental stability of *Coperia annulata* (Odonata: Zygoptera) larvae. *Biological Journal of the Linnean Society*, 96(1):44-50.

Chovanec A., Schindler M., Waringer J., Wimmer R., 2015. The dragonfly association index (Insecta: Odonata): a tool for the type-specific assessment of lowland rivers. *River Research and Applications*, 31:627-638.

Chovanec A., Waringer J., 2001. Ecological integrity of river-floodplain systems: assessment by dragonfly surveys (Insecta: Odonata). *Regulated Rivers: Research & Management*, 17(4-5):493-507.

Christensen B.T., Lauridsen T.L., Ravn H.W., Bayley M., 2005. A comparison of feeding efficiency and swimming ability of *Daphnia magna* exposed to cypermethrin. *Aquatic Toxicology*, 73(2):210-220.

Corbi J.J., Froehlich C.G., Trivinho-Strixino S., dos Santos A., 2011. Evaluating the use of predatory insects as bioindicators of metals contamination due to sugarcane cultivation in neo-tropical streams. *Environmental Monitoring Assessment*, 177:545-554.

Cordero A., 1994. The effect of sex and age on survivorship of adult damselflies in the laboratory (Zygoptera: Coenagrionidae). *Odonatologica*, 23(1):1-12.

Cordoba-Aguilar A., 2008. Dragonflies: model organisms for ecological and evolutionary research. *Oxford University Press*, Oxford.

D'Amico F., Darblade S., Avignon S., Blanc-Manel S., Ormerod S.J., 2004. Odonates as indicators of shallow lake restoration by liming: comparing adult and larval responses. *Restoration Ecology*, 12:439-446.

Edmonds S.T., O'Driscoll N.J., Hillier N.K., Atwood J.L., Evers D.C., 2012. Factors regulating the bioavailability of methylmercury to breeding rusty blackbirds in northeastern wetlands. *Environmental Pollution* 171:148-154.

Friberg-Jensen U., Wendt-Rasch L., Woin P., Christoffersen K., 2003. Effects of the pyrethroid insecticide, cypermethrin, on a freshwater community studied under field conditions. I. Direct and indirect effects on abundance measures of organisms at different trophic levels. *Aquatic Toxicology*, 63(4):357-371.

Funk A., Reckendorfer W., Kucera-Hirzinger V., Raab R., Schieme, F., 2009. Aquatic diversity in a former floodplain: remediation in an urban context. *Ecological engineering*, 35(10):1476-1484.

Gaino E., Piersanti S., Rebori M., 2008. Egg envelope synthesis and chorion modification after oviposition in the dragonfly *Libellula depressa* (Odonata, Libellulidae). *Tissue and Cell*, 40(5):317-324.

Golfieri B., Hardersen S., Maiolini B., Surian N., 2016. Odonates as indicators of the ecological integrity of the river corridor: development and application of the Odonate River Index (ORI) in northern Italy. *Ecological Indicators*, 61: 234-247.

Gosden T.P., Stoks R., Svensson E.I., 2011. Range limits, large-scale biogeographic variation, and localized evolutionary dynamics in a polymorphic damselfly. *Biological Journal of the Linnean Society*, 102(4):775-785.

Hardersen S., Wratten S.D., 1996. The sensitivity of the nymphs of two New Zealand damselfly species (Odonata: Zygoptera) to azinphos-methyl and carbaryl. *Australasian Journal of Ecotoxicology*, 2(2):55-60.

Hardersen S., Wratten S.D., 2000. Sensitivity of aquatic life stages of *Xanthocnemis zealandica* (Odonata: Zygoptera) to azinphos-methyl and carbaryl. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 34(1):117-123.

Hedrick P.W., 1986. Genetic polymorphism in heterogeneous environments: a decade later. *Annual review of ecology and systematics*, 17:535-566.

Heintzman L.J., Anderson T. A., Carr D.L., McIntyre N.E., 2015. Local and landscape influences on PAH contamination in urban stormwater. *Landscape and Urban Planning*, 142:29-37.

Hurd M.K., Perry S.A., Perry W.B., 1996. Non target effects of a test application of diflubenzuron to the forest canopy on stream macroinvertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15(8):1344-1351.

Janssens L., Van K.D., Stoks R., 2014. Extreme temperatures in the adult stage shape delayed effects of larval pesticide stress: a comparison between latitudes. *Aquatic Toxicology*, 148:74-82.

Jean-Michel G., Delorme D., Jean-Marie B., Van Laere G., Boisaubert B., Pradel R., 1993. Roe deer survival patterns: a comparative analysis of contrasting populations. *Journal of Animal Ecology*, 62(4):778-791.

Jinguji H., Ueda T., Goka K., Hidaka K., & Matsura T., 2010. Effects of Imidacproprid and Fipronil insecticide application on the larvae and adults of *Sympetrum frequens* (Libellulidae: Odonata). *Transactions of the Japanese Society of Irrigation, Drainage and Rural Engineering*, 77(1):35-41.

Jinguji H., Thuyet D.Q., Uéda T., Watanabe H., 2013. Effect of imidacloprid and fipronil pesticide application on *Sympetrum infuscatum* (Libellulidae: Odonata) larvae and adults. *Paddy and Water Environment*, 11(1-4):277-284.

Johnson W.W., Finley M.T., 1980: Handbook of acute toxicity of chemicals to fish and aquatic invertebrates. *Resource Publication - United States Fish and Wildlife Service*, 137. Washington, D.C.

Kashian D.R., Dodson S.I., 2002. Effects of common-use pesticides on developmental and reproductive processes in *Daphnia*. *Toxicology and Industrial Health*, 18(5):225-235.

Kohler H.R., Triebkorn R., 2013. Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we track effects to the population level and beyond? *Science*, 341:759-765.

Malaj E., Peter C., Grote M., Kühne R., Mondy C.P., Usseglio-Polatera P., Brack W., Schäfer R.B., 2014. Organic chemicals jeopardize the health of freshwater ecosystems on the continental scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(26):9549-9554.

Matson P.A., Parton W.J., Power A.G., Swift M.J., 1997. Agricultural intensification and ecosystem properties. *Science*, 277:504-509.

Mckinnon J. S., Pierotti M.E., 2010. Colour polymorphism and correlated characters: genetic mechanisms and evolution. *Molecular Ecology*, 19(23):5101-5125.

Muirhead-Thomson R.C., 1987. Pesticide impact on stream fauna with special reference to macroinvertebrates. *Cambridge University Press*, Cambridge, 275.

Munday P.L., Eyre P.J., Jones G.P., 2003. Ecological mechanisms for coexistence of colour polymorphism in a coral-reef fish: an experimental evaluation. *Oecologia*, 137:519-526.

Paterson M.J., Blanchfield P.J., Podemski C., Hintelmann H.H., Gilmour C.C., Harris R., Ogrinc N., Rudd J.W.M., Sandilands K.A., 2006. Bioaccumulation of newly deposited mercury by fish and invertebrates: an enclosure study using stable mercury isotopes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 63:2213-2224.

Pestana J.L., Loureiro S., Baird D.J., Soares A.M., 2009. Fear and loathing in the benthos: responses of aquatic insect larvae to the pesticide imidacloprid in the presence of chemical signals of predation risk. *Aquatic Toxicology*, 93(2):138-149.

Piersanti S., Rebora M., Salerno G., Cordero-Rivera A., Frati F., 2015. A method for rearing a large number of damselflies (*Ischnura elegans*, Coenagrionide) in the laboratory. *International Journal of Odonatology*, 18(2):125-136.

Ponyi J.E., 1994. Abundance and feeding of wintering and migratory aquatic birds in two sampling areas of Lake Balaton in 1983-1985. *Hydrobiologia*, 279/280:63-69.

R Development Core Team, 2008. R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria.

Relyea R.A., 2005. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. *Ecological Applications*, 15(2):618-627.

Reynaldi S., Liess M., 2005. Influence of duration of exposure to the pyrethroid fenvalerate on sublethal responses and recovery of *Daphnia magna* Straus. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(5):1160-1164.

Sahlén G., Ekestubbe K., 2001. Identification of dragonflies (Odonata) as indicators of general species richness in boreal forest lakes. *Biodiversity and Conservation*, 10(5):673-690.

Schäfer R.B., Caquet T., Siimes K., Mueller R., Lagadic L., Liess M., 2007. Effects of pesticides on community structure and ecosystem functions in agricultural streams of three biogeographical regions in Europe. *Science of the Total Environment*, 382(2):272-285.

Schemske D.W., Bierzychudek P., 2007. Spatial differentiation for flower color in the desert annual *Linanthus parryae*: was Wright right?. *Evolution*, 61(11):2528-2543.

Schoenly K.G., Justo H.D., Barrion A.T., Harris M.K., Bottrell D.G., 1998. Analysis of invertebrate biodiversity in a Philippine farmer's irrigated rice field. *Environmental Entomology*, 27:1125-1136.

Settle W.H., Ariawan H., Astuti E.T., Cahyana W., Hakim A.L., Hindayana D., Lestari, A.S., 1996. Managing tropical rice pests through conservation of generalist natural enemies and alternative prey. *Ecology*, 77:1975-1988.

Siegfried B.D., 1993. Comparative toxicity of pyrethroid insecticides to terrestrial and aquatic insects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12:1683- 1689.

Siegfried B.D., Young L.J., 1993. Activity of detoxification enzymes in aquatic and terrestrial insects. *Environmental Entomology*, 22(5):958-964.

- Smith J., Samways M.J., Taylor S., 2007.** Assessing riparian quality using two complementary sets of bioindicators. *Biodiversity and Conservation*, 16(9):2695-2713.
- Stoks R., Debecker S., Van K.D., Janssens L., 2015.** Integrating ecology and evolution in aquatic toxicology: insights from damselflies. *Freshwater Science*, 34(3):1032.
- Stoks R., Córdoba-Aguilar A., 2012.** Evolutionary ecology of Odonata: a complex life cycle perspective. *Annual Review of Entomology*, 57:249-265.
- Stewart A.J., 1996.** Ambient bioassays for assessing water quality conditions in receiving streams. *Ecotoxicology*, 5:377-393.
- Suhling F., Befeld S., Häusler M., Katzur K., Lepkojus S., Mesléard F., 2000.** Effects of insecticide applications on macroinvertebrate density and biomass in rice-fields in the Rhône-delta, France. *Hydrobiologia*, 431(1):69-79.
- Swift M.J., Anderson J.M., 1994.** Biodiversity and ecosystem function in agricultural systems pp:15-41. In (Springer Berlin Heidelberg) Biodiversity and ecosystem function.
- Takahashi Y., Morita S., Yoshimura J., Watanabe M., 2011.** A geographic cline induced by negative frequency-dependent selection. *BMC Evolutionary Biology*, 11(1):256.
- Takamura K., Hatakeyama S., Shiraishi H., 1991.** Odonata larvae as an indicator of pesticide contamination. *Applied Entomology and Zoology*, 26(3):321-326.
- Tang J.X., Siegfried B.D., 1995.** Comparative uptake of a pyrethroid and organophosphate insecticide by selected aquatic insects. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 55:130- 135.
- Therneau T., 2012.** Survival: A package for Survival analysis in S. R package version 2.36-12.

Tollett V.D., Benvenuti E.L., Deer L.A., Rice T.M., 2009. Differential toxicity to Cd, Pb, and Cu in dragonfly larvae (Insecta: Odonata). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 56(1):77-84.

Toumi H., Boumaiza M., Millet M., Radetski C.M., Felten V., Fouque C., Férard J.F., 2013. Effects of deltamethrin (pyrethroid insecticide) on growth, reproduction, embryonic development and sex differentiation in two strains of *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera). *Science of the Total Environment*, 458:47-53.

Van Gossum H., Bots J., Snijkers T., Meyer J., Van Wassenbergh S., De Coen W., De Bruyn L., 2009. Behaviour of damselfly larvae (*Enallagma cyathigerum*) (Insecta, Odonata) after long-term exposure to PFOS. *Environmental Pollution*, 157(4):1332-1336.

Van K.D., Janssens L., Debecker S., Stoks R., 2014. Warming increases chlorpyrifos effects on predator but not antipredator behaviours. *Aquatic Toxicology*, 152:215-221.

Van Praet N., Covaci A., Teuchies J., de Bruyn L., Van Gossum H., Stoks R., Bervoets L., 2012. Levels of persistent organic pollutants in larvae of the damselfly *Ischnura elegans* (Odonata, Coenagrionidae) from different ponds in Flanders, Belgium. *Science of the Total Environment*, 423:162-167.

Van Praet N., de Bruyn L., de Jonge M., Vanhaecke L., Stoks R., Bervoets L., 2014a. Can damselfly larvae (*Ischnura elegans*) be used as bioindicators of sublethal effects of environmental contamination? *Aquatic Toxicology*, 154:270-277.

Van Praet N., de Jonge M., Blust R., Stoks R., Bervoets L., 2014b. Behavioural, physiological and biochemical markers in damselfly larvae (*Ischnura elegans*) to assess effects of accumulated metal mixtures. *Science of the Total Environment*, 470:208-215.

Way M.J., Heong K.L., 1994. The role of biodiversity in the dynamics and management of insect pests of tropical irrigated rice: a review. *Bulletin of Entomological Research*, 84:567-587.

CONCLUSIONI

Il presente studio ha analizzato il polimorfismo femminile in due specie di Odonati (*Ischnura elegans* e *Ceriagrion tenellum*), in cui sono presenti tre morfotipi femminili, uno dello stesso colore della maschio (forma androcroma) e due di colori differenti (femmine ginocrome). I risultati ottenuti dimostrano che diversi sono i fattori che contribuiscono, almeno in parte, al mantenimento del polimorfismo.

Nella specie *Ischnura elegans* sono stati individuati diversi fattori che differiscono tra i morfotipi femminili, quali le maggiori dimensioni e il minor grado di parassitismo della femmina ginocroma, e la minore mortalità degli stadi larvali prodotti da femmine androcrome. In *Ceriagrion tenellum*, invece, i risultati non evidenziano differenze significative tra i morfotipi, suggerendo che il determinismo genetico sia il fattore principale che regola il polimorfismo in questa specie. In *Ischnura elegans* le preferenze maschili (analizzate sia in campo che con test di scelta binaria) indicano un maggior successo della femmina ginocroma.

Ciò nonostante ulteriori e più ampi studi sono necessari per comprendere le dinamiche di questo fenomeno. In particolare nel caso di *Ischnura elegans* risulterebbe interessante valutare diversi fattori ambientali al fine di rivelare eventuali correlazioni di questi con la frequenza dei morfotipi femminili e con la crescita e mortalità degli stadi larvali.

Nel caso di *Ceriagrion tenellum*, considerata l'elevata variabilità nella frequenza dei morfotipi, si rivelano importanti analisi su di un numero più elevato di popolazioni; inoltre di fondamentale importanza per la comprensione del polimorfismo femminile di questa specie risulterebbe l'allevamento in laboratorio al fine di valutare possibili differenze negli stadi larvali.

Per quanto concerne la parte relativa alla somministrazione degli insetticidi sulle uova e sugli stadi larvali di *Ischnura elegans*, i risultati evidenziano un elevato effetto sulla mortalità nei tre livelli di concentrazione somministrati rispetto ai controlli. Gli stessi effetti negativi sono stati riscontrati in *Daphnia magna*. Questi dati indicano che la dose attualmente utilizzata in risaia può pesantemente compromettere le popolazioni di questa specie.

In questo campo risultano evidenti gli effetti che gli insetticidi presentano su specie non target, individuando una problematica relativa alla gestione degli agroecosistemi e all'attuale utilizzo di pesticidi per le specie acquatiche.