

Tesi di Dottorato in Scienze della Vita XXXII ciclo

Settore scientifico disciplinare di afferenza BIO/05

**MONITORAGGIO DI UN GRUPPO DI INSETTI
PREDATORI, I COLEOTTERI CARABIDI, AI FINI
DELLA CONSERVAZIONE E DELLO SVILUPPO
SOSTENIBILE DELL'AGRICOLTURA NEL PARCO
NAZIONALE DELLA SILA.**

CANDIDATO

Dott. Francesco Cavaliere

Francesco Cavaliere

COORDINATORE

Prof. Maria Carmela Cerra

M. Cerra

SUPERVISORE

Prof. Pietro Brandmayr

Pietro Brandmayr

TUTOR

Dott.ssa Anita Giglio

Anita Giglio

*A Giusy, la ragione più profonda della mia vita
e ai miei genitori, con immensa stima*

INDICE

Abstract	7
Riassunto	9
INTRODUZIONE	11
CAPITOLO 1	
1.1 Coleotteri Carabidi	13
1.1.1 Coleotteri carabidi come bioindicatori	13
1.1.2 Effetti delle pratiche agricole sui coleotteri carabidi	15
1.1.3 I coleotteri carabidi come agenti di controllo	18
1.2 Effetti dei pesticidi su specie benefiche	21
1.2.1 Insetticidi	21
1.2.2 Erbicidi	23
1.2.3 Effetti dei pesticidi sui Coleotteri Carabidi	26
1.3 Sistema immunitario	30
1.3.1 La risposte immunitarie	30
1.3.1.1 Risposta cellulare	33
1.3.1.2 Risposta umorale	33
Fenolossidasi (PO)	33
Peptidi antimicrobici	36
Lisozima	36
1.3.2 Effetti dei pesticidi sul sistema immunitario	37
1.4 Effetti genotossici da esposizione a pesticidi	39
1.4.1 Comet Assay	40
1.5 Morfometria	44
1.5.1 Effetti delle perturbazioni ambientali a livello morfometrico ...	46

CAPITOLO 2

MATERIALI & METODI

2.1 Siti campionati	48
2.2 Raccolta campioni	57
2.3 Analisi della biodiversità	58
2.3.1. Indici di similarità	59
2.3.1.a Coefficiente di correlazione di Pearson.....	60
2.3.1.b Coefficiente di Sørensen	61
2.3.1.c Indice di Rényi	62
2.4 Allevamento in laboratorio	63
2.5 Analisi Enzimatiche	64
2.5.1 Prelievo emolinfe	64
2.5.2 Attività basale e totale dell'enzima Fenolossidasi (PO)	64
2.5.3 Attività litica emolinfa	66
2.5.4 Elaborazione dati	67
2.6 Analisi genotossiche	69
2.6.1 Elaborazione dati	72
2.7 Analisi morfometriche	73
2.7.1 Elaborazione dati	73

CAPITOLO 3

RISULTATI

3.1 Comunità dei Coleotteri Carabidi nei campi agricoli	75
3.2 Confronto generale dei dati	84
3.3 Similarità tra le comunità	88
3.4 Diversità tra le comunità	90
3.5 Effetti dell'esposizione in campo sulla risposta immunitaria costitutiva	93
3.5.1 Fenolossidasi (PO) basale e totale (proPO)	93
3.5.2 Analisi attività litica dell'emolinfa	95

3.6 Effetti genotossici dell'esposizione a trattamenti in campo	96
3.7 Effetti dell'esposizione in campo a livello morfologico	100
CAPITOLO 4	
DISCUSSIONE	
4.1 Effetti delle pratiche agricole sull'assemblaggio delle specie	104
4.2 Effetti causati dall'esposizione in campo a livello fisiologico	106
CONCLUSIONE	110
BIBLIOGRAFIA	111

Abstract

Agricultural management practices are known to cause lethal and sub-lethal effects on animals inhabiting croplands. The persistence and residual accumulation of pesticides in the soil are detrimental to the environment and pose a risk for human health and for species providing biocontrol ecosystem services. Carabid beetles are useful bioindicators to evaluate the ecological effects of agrochemicals due to their ecological role as predators in farmland. In order to assess the sub-lethal effects at the community, species and organism levels, on non-target species caused by regular pesticide applications, an environmental monitoring was performed over a period of two years, in two sites around the agricultural area to Sila National Park. One site is a conventional farm (39°16'58.05"N, 16°38'43.26"E, 1240 m a.s.l., Torre Garga Farm, Calabria, Italy), it was treated with herbicides, pesticides and fungicides used for pest control. The second site, chosen as control, is an organic farm (39°17'10.28"N, 16°42'28.33"E, 1150 m a.s.l., Macchia di Tuono Farm, Calabria, Italy). To check the direct sublethal effect of field exposure on species abundance and density at the community level, carabid beetles were collected *in vivo* by pitfall traps and identified using dichotomous keys. To assess the direct sub-lethal effect of field exposure at the organism level, the body size, the constitutive immune responses and genotoxicity were quantified in adults of *Harpalus rufipes*, a generalist predator taxonomically and ecologically well known, widely distributed and easy to collect in crops. The findings of this study indicated that chemical treatments admitted in the conventionally managed fields have negative effects on the abundance and density of species inhabiting croplands, the low level of PO and lysozyme-like enzyme activities and the DNA damage recorded in haemocytes indicated that field treatments might influence this non-target soil-dwelling species. However, field treatments did not cause morphometric changes in the body size of adults. The reduction of humoral responses and the genotoxic effect recorded on haemocytes may result in an increased susceptibility of this species to pathogens. From an ecoimmunological point of view, a modification of other basic life history traits such as reproduction,

dispersal activity and predation may occur with effects on the adult fitness, resulting in changes of the population structure and in a reduction of the biocontrol activity for pest species in agroecosystem.

Riassunto

È noto che le pratiche di gestione agricola causano effetti letali e sub-letali sugli animali che vivono nei sistemi agricoli. La persistenza e l'accumulo residuo di pesticidi nel suolo sono dannosi per l'ambiente e comportano un rischio per la salute umana e per le specie che forniscono servizi ecosistemici di biocontrollo. I Coleotteri Carabidi, a causa del loro ruolo ecologico di predatori nei terreni agricoli, sono utili bioindicatori per valutare gli effetti ecologici dei prodotti chimici per l'agricoltura. Al fine di valutare gli effetti sub-letali a livello di comunità, di specie e di organismo sulle specie non bersaglio, causate da regolari applicazioni di pesticidi, è stato effettuato un monitoraggio ambientale per un periodo di due anni, in due siti agricoli intorno al Parco Nazionale della Sila. Il primo sito è un'azienda a conduzione convenzionale (39° 16' 58.05 " N, 16° 38' 43.26" E, 1240 m s.l.m., Torre Garga Farm, Calabria, Italia), trattata con erbicidi, pesticidi e fungicidi usati per il controllo dei parassiti. Il secondo sito, scelto come controllo, è un'azienda agricola a conduzione organica (39° 17' 10.28" N, 16° 42' 28.33" E, 1150 m s.l.m., Azienda Agricola Macchia di Tuono, Calabria, Italia). Per verificare l'effetto sub-letale diretto dell'esposizione in campo sull'abbondanza e la densità delle specie a livello di comunità, i Coleotteri Carabidi sono stati raccolti *in vivo* mediante trappole a caduta e identificati attraverso chiavi dicotomiche. Per valutare l'effetto sub-letale diretto dell'esposizione in campo a livello di organismo, sono state quantificate le dimensioni del corpo, la risposta immunitaria costitutiva e la genotossicità negli adulti di *Harpalus rufipes*, un predatore generalista ben noto tassonomicamente ed ecologicamente, ampiamente distribuito e facile da catturare nei campi coltivati. I risultati di questo studio hanno indicato che i trattamenti chimici ammessi nei campi gestiti in modo convenzionale hanno effetti negativi sull'abbondanza e la densità delle specie che abitano i sistemi agricoli, il basso livello di attività enzimatica di PO e di lisozima e il danno al DNA registrato negli emociti indicano che i trattamenti in campo potrebbe influenzare questa specie di coleottero non bersaglio che vive sul suolo. Tuttavia, i trattamenti in campo non hanno causato cambiamenti morfometrici

nella dimensione corporea degli adulti. La riduzione delle risposte umorali e l'effetto genotossico registrato sugli emociti possono comportare una maggiore suscettibilità di questa specie ai patogeni. Da un punto di vista ecoimmunologico, può verificarsi una modifica di altri tratti fondamentali della *life history* come la riproduzione, l'attività di dispersione e la predazione con effetti sulla forma fisica dell'adulto, con conseguenti cambiamenti nella struttura della popolazione e una riduzione dell'attività di biocontrollo per le specie infestanti negli agroecosistemi.

INTRODUZIONE

Il Parco Nazionale della Sila dal 2014 è diventato area MAB (Man and Biosphere), unendosi così alla rete mondiale UNESCO (*United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization*). Questa affiliazione comporta che le aree agricole circostanti del distretto dovranno essere convertite in una gestione organica per un uso sostenibile dell'ambiente. Poiché l'altopiano della Sila ha un'importante area agricola, è urgentemente necessario esaminare la sostenibilità delle catene alimentari dell'agrobiocenosi delle diverse colture. Nella fase di conversione dell'agroecosistema in gestione organica, è necessario monitorare i bioindicatori scelti tra gli insetti benefici più frequenti del suolo, per testare la presenza e gli effetti dei residui di pesticidi.

È noto che le pratiche di gestione agricola causano effetti letali e sub-letali sugli animali che abitano i terreni coltivati. La persistenza e l'accumulo di residui di pesticidi nel suolo sono dannosi per l'ambiente e comportano un rischio per la salute umana e per le specie che forniscono servizi ecosistemici di biocontrollo. I Coleotteri Carabidi, per il loro ruolo ecologico di predatori nei terreni agricoli, sono utili bioindicatori per valutare gli effetti ecologici dei prodotti chimici impiegati in agricoltura. L'associazione dei Coleotteri Carabidi negli agroecosistemi è correlata alla stabilità temporale dell'*habitat*, al tipo di lavorazione del terreno applicata alla coltura annuale, al tipo e diversificazione delle colture, alla disponibilità di prede e ai fattori abiotici come temperatura e umidità che ne influenzano la diversità e l'abbondanza numerica.

In questa tesi di dottorato è stato effettuato un monitoraggio ambientale per un periodo di due anni al fine di valutare gli effetti sub-letali causati da regolari applicazioni di pesticidi a livello delle comunità di Carabidi che abitano i sistemi agricoli. Per valutare l'effetto sub-letale diretto dell'esposizione sul campo a livello di organismo, è stata scelta come specie modello *Harpalus rufipes*. Essendo un predatore onnivoro, ampiamente distribuito negli agroecosistemi (Holland, 2002; Irmeler, 2003; Zaller *et al.*, 2008; Brygadyrenko & Reshetniak, 2014), si ipotizza che

gli erbicidi possano influenzare la dieta di tale specie, in quanto si nutre di semi (Honek *et al.*, 2003; Saska *et al.*, 2010; Talarico *et al.*, 2016) e piccoli invertebrati (Holland, 2002; Monzó *et al.*, 2011; Brygadyrenko & Reshetniak, 2014). Questa specie è ampiamente distribuita dal Paleartico Occidentale fino all’Africa Nord-Occidentale (Irmeler, 2003; Kataev & Liang, 2015). Inoltre è una delle specie più comuni nei sistemi agricoli e nelle foreste, ha moderate capacità di dispersione sia in superficie che in volo e ben si adatta a vivere in ambienti antropizzati (Lövei & Sarospataki, 1990; Zhang *et al.*, 1998; Kromp, 1999; Holland & Luff, 2000; Thomas *et al.*, 2001; Holland, 2002; Irmeler, 2003; Miñarro & Dapena, 2003; Farinós *et al.*, 2008; Zaller *et al.*, 2008; Miñarro *et al.*, 2009; Brygadyrenko & Reshetniak, 2014; Faly & Brygadyrenko, 2014). In relazione al loro range di distribuzione geografica, gli adulti sono attivi da fine Marzo inizi di Aprile, fino a fine Settembre inizi di Ottobre, l’ovideposizione avviene dai primi di Maggio fino a Luglio, e durante i mesi invernali sia larve che adulti si ibernano (Zhang *et al.*, 1997; Traugott, 1998; Matalin, 2007). In questo studio, come biomarker di esposizione sono state misurate le dimensioni del corpo, la risposte immunitaria costitutiva e la genotossicità negli individui adulti.

L’obiettivo di questa tesi è quello di fornire informazioni utili sugli effetti dei trattamenti di campo a livello di organismo, popolazione e comunità per preservare la biodiversità degli agroecosistemi, ridurre l'uso di alcune classi di pesticidi ad ampio spettro e preservare importanti predatori che agiscono come agenti di controllo di diversi parassiti delle colture o erbe infestanti, riducendo così il rischio di esposizione per la salute umana.

CAPITOLO 1

1.1 Coleotteri Carabidi

1.1.1 Coleotteri Carabidi come bioindicatori

I bioindicatori sono organismi utilizzati per monitorare gli effetti dei cambiamenti ambientali che si verificano sia negli ecosistemi acquatici che in quelli terrestri. Secondo McGeoch (1998) possono essere divisi in indicatori ambientali, indicatori ecologici ed indicatori di biodiversità. Gli indicatori ambientali ed ecologici sono utilizzati per individuare cambiamenti nell'ambiente mentre gli indicatori di biodiversità riflettono la diversità di tutto il biota.

Gli effetti dei cambiamenti ambientali sui bioindicatori si possono manifestare a differenti livelli: 1) a livello di specie, come numero di specie e abbondanza; 2) a livello di comunità, come relazioni tra specie (per es. preda-predatore); 3) a livello di organismo, come variazioni nelle risposte fisiologiche e morfologiche.

I Coleotteri Carabidi sono potenzialmente degli ottimi bioindicatori in quanto sono molto sensibili alle variazioni dei fattori biotici e abiotici dell'ambiente (Holland & Luff, 2000; Honek & Jarošik, 2000; Rainio & Niemelä, 2003; Kotze *et al.*, 2011), come la frammentazione dell'habitat, la deforestazione, la gestione delle pratiche agricole, le emissioni industriali (Holland & Luff, 2000; Koivula, 2011; Kotze *et al.*, 2011).

Essi, inoltre, sono utili indicatori biologici per le seguenti caratteristiche: 1) sono organismi che possono essere campionati con continuità, in modo automatico (trappole a caduta), e permettono di ottenere dati di tipo quantitativo sulla presenza delle specie; 2) sono facilmente manipolabili sia in fase di determinazione, che nelle esigenze di esperimenti di laboratorio; 3) presentano attività vitali abbastanza uniformi per la maggioranza delle specie. Sono predatori polifagi nella maggior parte dei casi, vivono a livello della superficie ed entro i primi centimetri di spessore del suolo, producono (con alcune eccezioni) una generazione l'anno (Brandmayr *et al.*,

2005); 4) sono un gruppo di artropodi ben conosciuto dal punto di vista tassonomico, biologico e autoecologico (Rainio & Niemelä, 2003; Brandmayr *et al.*, 2005); 5) rappresentano un elemento importante nella rete alimentare, essendo predatori di piccoli invertebrati, e facendo parte della dieta di anfibi, rettili, uccelli e piccoli mammiferi; 6) si distribuiscono nell'ambiente secondo chiare preferenze di *habitat*, tali da permettere l'identificazione di carabidocenosi, intese come raggruppamenti di specie definibili su base faunistico-statistica, tipici di biomi, ecosistemi, o unità ecologiche inferiori (Brandmayr *et al.*, 2005).

Sono distribuiti su vaste aree geografiche, ad eccezione delle zone più aride, e in base alla loro distribuzione si possono dividere in ubiquitarie (specie generaliste geograficamente ampie), euritope (specie che occupano una vasta gamma di *habitat*), stenotope (specie che sono legate a uno o pochi *habitat*) (Rainio & Niemelä, 2003). Poiché le varie specie hanno esigenze ecologiche diverse, alcune sono indicatori migliori rispetto ad altre. Alcune specie sono generaliste, e vivono in una vasta gamma di *habitat*, mentre altre sono specialiste, e richiedono un tipo di *habitat* con determinate caratteristiche, e queste di solito sono quelle più sensibili ai cambiamenti ambientali (Rainio & Niemelä, 2003).

I Coleotteri Carabidi sono stati ampiamente usati per diversi tipi di studi e di indagine, come l'uso del suolo, la classificazione e la frammentazione degli *habitat*, la deforestazione, l'urbanizzazione, i cambiamenti climatici, la biodiversità (Rainio & Niemelä, 2003), e il monitoraggio dei sistemi agricoli (Kromp, 1999; Rainio & Niemelä, 2003).

Le praterie e campi di cereali sono i due tipi di *habitat* più intensamente studiati per quanto riguarda i Coleotteri Carabidi. Uno dei motivi è che i carabidi sono visti come importanti predatori di specie parassite che infestano i sistemi agricoli.

L'intensificazione dell'agricoltura in Europa, ha determinato una grave perdita di *habitat* naturali e semi – naturali, di conseguenza si è avuto un grande cambiamento nelle popolazioni di Carabidi che vivono sul suolo. Alcune specie comuni sono diventate più comuni a scapito di molte specie rare, che sono diventate

ancora più rare.

I Coleotteri Carabidi sono interessati da diverse pratiche di gestione agricola, tra cui il pascolo, l'utilizzo di concimi, il taglio e altre misure di miglioramento del pascolo. Un generale principio sembra essere che le pratiche di gestione e l'aumento del disturbo antropico, diminuiscono il numero di specie e di individui. Questo può essere causato dalla relazione che si crea tra le pratiche di gestione agricola e la riproduzione dei Coleotteri Carabidi. Il tempo di riproduzione è un fattore importante che influenza la sopravvivenza di una popolazione di Carabidi. Le specie che si riproducono durante il periodo delle pratiche di gestione intensiva (primavera) sono più colpite delle specie che si riproducono in periodi di minore disturbo (autunno). Tuttavia, non tutte le specie declinano in seguito a tale disturbo, poiché la risposta di una specie dipende dal potere di dispersione e dalle preferenze dell'*habitat* della specie stessa.

Sebbene le pratiche di gestione agricola abbiano un forte impatto sull'abbondanza di specie, a volte è difficile individuare la causa principale di questo impatto. Il declino delle specie può essere causato direttamente dalle pratiche di gestione, ma anche indirettamente, ad es. mediante la frammentazione dell'*habitat*.

La frammentazione dell'*habitat* è uno dei maggiori problemi ambientali in tutto il mondo ed è uno dei motivi più importanti per il declino della biodiversità. Le specie incapaci di volare possono spostarsi fino a poche centinaia di metri camminando utilizzando dei corridoi ecologici, le specie con una buona capacità di volo possono spostarsi più a lungo, e non dipendono da corridoi di dispersione (Rainio & Niemela, 2003).

1.1.2 Effetti delle pratiche agricole sui Coleotteri Carabidi

I cambiamenti avvenuti negli anni '50 sia nelle pratiche di gestione agricola, che a livello di *habitat*, hanno prodotto grandi cambiamenti nella distribuzione di alcune specie di Coleotteri Carabidi, che sono diventate relativamente più diffuse a

discapito di altre specie (Kromp, 1999; Rainio & Niemelä, 2003), è evidente quindi l'importanza dei margini di campo come zona di rifugio da operazioni agricole avverse, e come luoghi di sopravvivenza e di riproduzione.

La distribuzione della carabidofauna è governata da una serie di fattori biotici come tipo di suolo, pH del suolo, umidità del terreno, quantità di copertura vegetale. Uno dei principali fattori che determinano l'assemblaggio delle specie è l'umidità del suolo, influenzata a sua volta dalla copertura vegetale (Holland & Luff, 2000).

La lavorazione del terreno può distruggere fisicamente o disturbare le popolazioni di Coleotteri Carabidi che vivono nei sistemi agricoli, con effetti meno pronunciati nei terreni più leggeri, rispetto ai terreni pesanti. Secondo alcuni studi larve e pupe sono più vulnerabili alla lavorazione del terreno, secondo altri autori invece, lo stadio adulto è quello più vulnerabile all'aratura perchè ha meno capacità di sopravvivere sepolto. La suscettibilità alla lavorazione del terreno, può essere influenzata anche dalle dimensioni degli individui appartenenti ad una determinata specie, ad esempio le specie appartenenti al genere *Bembidion* riescono a tollerare una lavorazione minima del suolo; o dalle capacità di dispersione, le specie che hanno maggiori capacità di dispersione riescono ad uscire più facilmente dal campo arato e quindi hanno maggiori capacità di sopravvivere (Holland & Luff, 2000). La coltivazione profonda del terreno, con l'utilizzo dell'aratro, ha avuto un effetto dannoso sull'abbondanza dei carabidi rispetto alla coltivazione superficiale, ma dagli anni '50 in poi sono stati sviluppati sistemi di coltivazione alternativi per proteggere il suolo, come l'accumulo di residui colturali sulla superficie del terreno (Dubrovskaya, 1970). Già negli anni 80, negli Stati Uniti, circa un terzo dei terreni coltivati era gestito in maniera conservativa, che a differenza di quella convenzionale lascia almeno il 30% o più dei precedenti residui colturali sulla superficie del suolo (Stinner & House, 1990; Kromp, 1999).

Molti studi hanno rivelato che la carabidofauna differisce con il tipo di coltura. Anche se nessuna specie è stata collegata ad una particolare coltura, sono state individuate alcune associazioni: alle colture invernali sono state associate specie come *Agonium dorsale*, *Carabus auratus*, *C. cancellatus*, *C. granulatus*, *Nebria*

brevicollis e *Pterostichus cupreus*; alle colture estive invece *Amara bifrons*, *A. fulva*, *Bembidion lampros*, *B. quadrimaculatum*, *Calathus ambiguus*, *C. erratus*, *C. fuscipes*; mentre specie come *Harpalus rufipes* sono state associate a tutti i tipi di coltivi. In alcuni casi i Carabidi hanno adottato i loro modelli di attività in base al raccolto, ritardando la loro attività fino al più tardi nel corso dell'anno per le colture primaverili, come è stato visto in *Pterostichus melanarius* e *Agonum dorsale* nelle coltivazioni di barbabietola da zucchero. Il microclima differisce notevolmente tra una coltivazione di tuberi e una di cereali, essendo molto più secco e caldo nei cereali, e più fresco nei tuberi.

L'*intercropping* è un tipo di coltura che prevede la coltivazione di due o più specie di colture in modo da interagire agronomicamente, genera beneficio ai Carabidi in quanto fornisce un'ambiente più stabile, un microhabitat più favorevole e una maggiore copertura del suolo, inoltre poiché il terreno non viene arato come nelle coltivazioni convenzionali, le specie di Coleotteri Carabidi svernanti non vengono disturbate, e questo determina un aumento delle popolazioni nella primavera successiva (Holland & Luff, 2000).

Nonostante l'uso di fertilizzanti nell'agricoltura convenzionale esistono pochissime informazioni degli effetti di queste sostanze sulla carabidofauna. In uno studio di Idinger *et al.*, (1996), che comparava l'effetto del compost rispetto ai fertilizzanti inorganici sulle popolazioni di Carabidi che vivono nei campi di cereali, è stato registrato che la diversità diminuisce all'aumentare dell'intensità della fertilizzazione.

Sono stati testati gli effetti dell'applicazione di dosi elevate di azoto (80, 160, 320 e 480 kg / ha) sull'entomofauna di un terreno da pascolo, e si è visto che alcune specie di Carabidi come *Pterostichus melanarius*, *Bembidion lampros* e *Amara plebeja*, hanno evitato le trame di terreno con le più alte concentrazioni, e si sono rifugiati nelle trame di terreno non fertilizzate (Honczarenko, 1975).

Secondo altri studi, l'utilizzo di concime organico e compost ha dimostrato di incoraggiare la carabidofauna del suolo, ma questo non si verifica sempre, infatti in uno studio condotto da Zhang *et al.* (1997) su *Harpalus rufipes*, si è visto che le

popolazioni non differivano tra un campo concimato con fertilizzanti organici e uno con fertilizzanti inorganici. Il tipo di fertilizzante, organico o inorganico, può influire sulla carabidofauna attraverso una serie di meccanismi. In primo luogo, le applicazioni di concimi organici possono aumentare la quantità di materiale biologico contenuta nel terreno, successivamente, la capacità di trattenere l'acqua, e quindi una maggiore umidità che a sua volta influenza l'idoneità del suolo per lo svernamento di molte specie. In secondo luogo l'apporto di concimi organici può aumentare la disponibilità di prede, come i lombrichi o altri organismi saprofiti e detritivori (Holland & Luff, 2000).

1.1.3 I Coleotteri Carabidi come agenti di controllo

I Coleotteri Carabidi sono una componente essenziale della biodiversità dei sistemi agricoli, in quanto sono implicati nel controllo naturale delle specie infestanti (Holland & Luff, 2000). Sono uno dei più numerosi e diversificati gruppi di artropodi presenti negli agro-ecosistemi, e sono la più grande famiglia di coleotteri adefagi. La dieta delle specie dei Coleotteri Carabidi diffuse in Europa e nel Nord America include varie specie di afidi, uova, larve e pupe di ditteri, uova e larve di coleotteri, lepidotteri parassiti, lumache, semi di erba infestante (Kromp, 1999; Holland & Luff, 2000; Talarico *et al.*, 2016).

Per molti secoli la capacità dei predatori generalisti di controllare i parassiti delle colture, è stata sfruttata con successo dagli agricoltori (Symondson *et al.*, 2002).

E' stato dimostrato che i coleotteri carabidi si nutrono di lumache, lombrichi, larve di crisomelidi, larve di elateridi, afidi, termiti (Holland, 2002). In uno studio condotto da Asteraki (1993) sul controllo naturale delle lumache, è stato dimostrato che *Abax parallelepipedus* e *Pterostichus madidus* sono due specie ideali di Coleotteri Carabidi per il controllo biologico. La capacità di *Abax parallelepipedus* nel controllo biologico delle lumache nelle coltivazioni di lattuga, è stata dimostrata anche in un precedente studio condotto da Symondson (1989), mentre Renkema *et*

al., (2013) stabilirono che *Pterostichus melanarius* e *Harpalus rufipes* sono utili agenti di biocontrollo per le larve di *Rhagoletis mendax*.

In uno studio condotto da Collins *et al.*, (2002) per valutare l'impatto dei Carabidi sugli afidi, si è visto che in aree dove la densità dei Carabidi era bassa, aumentava la densità degli afidi (Fig. 1).

Questo tipo di controllo consente la riduzione, o addirittura l'esclusione dei pesticidi, ed è potenziato dalle pratiche di gestione agricola che promuovono la biodiversità. Tuttavia, l'agricoltura moderna ha aumentato la produttività ma a spese della biodiversità degli invertebrati, in particolar modo una perdita di prede disponibili per i predatori (Harwood *et al.*, 2009). Gli invertebrati non nocivi formano una componente importante della dieta dei Coleotteri Carabidi (Holland, 2002). La dieta ha un profondo effetto sui dei predatori, sul numero di uova deposte, sul periodo di schiusa delle uova, sui tassi di schiusa delle uova e sulla sopravvivenza dei predatori. Una dieta poco varia può influenzare negativamente lo sviluppo dei predatori, come ridurre la fecondità, di conseguenza una maggiore diversità di prede può avere benefici o effetti dannosi, a seconda del valore nutrizionale o carico di tossine dei componenti dietetici (Harwood *et al.*, 2009).

La perdita della diversità delle prede deriva da molte cause. Ad esempio, eliminando le erbe infestanti si escludono anche gli invertebrati che vivono sopra e sotto di loro, molti pesticidi hanno effetti negativi su popolazioni di invertebrati non bersaglio, i fertilizzanti inorganici possono provocare una perdita di materia organica nel terreno e così una perdita di molti invertebrati associati ad essa. Gli invertebrati - preda aiutano a mantenere stabili le popolazioni di predatori generalisti all'interno delle colture. Nelle colture dove ci sono molti parassiti da mangiare, ma poco in termini di prede alternative, a causa del calo della diversità degli invertebrati, i predatori generalisti diminuiranno rapidamente in numero, e probabilmente contribuiranno poco al controllo dei parassiti, e questo potrebbe limitare seriamente le opzioni di gestione delle colture (Harwood *et al.*, 2009). I predatori possono rispondere alla diversità delle prede e quindi ottimizzare le loro diete, in due modi: seguendo una dieta più diversificata o essendo più selettivi nella scelta della preda. I

predatori generalisti ad esempio, possono normalmente predare quantità non ottimali di cibo e adottare strategie di predazione meno selettive per la maggior parte del tempo (Symondson *et al.*, 2002).

E' stato dimostrato che la dieta ha un profondo effetto sui predatori, come il peso dell'adulto, e la fitness riproduttiva. In uno studio condotto su *Pterostichus melanarius*, questi parametri misurati negli esemplari nutriti solo con afidi risultano più bassi di quelli nutriti con una dieta mista, e ciò indica che la scarsità di diversità di prede induce i predatori ad essere meno selettivi in fatto di cibo. La conservazione della diversità delle prede quindi è così importante come la conservazione della diversità dei predatori, al fine di ottenere una regolamentazione naturale dei parassiti (Harwood *et al.*, 2009).

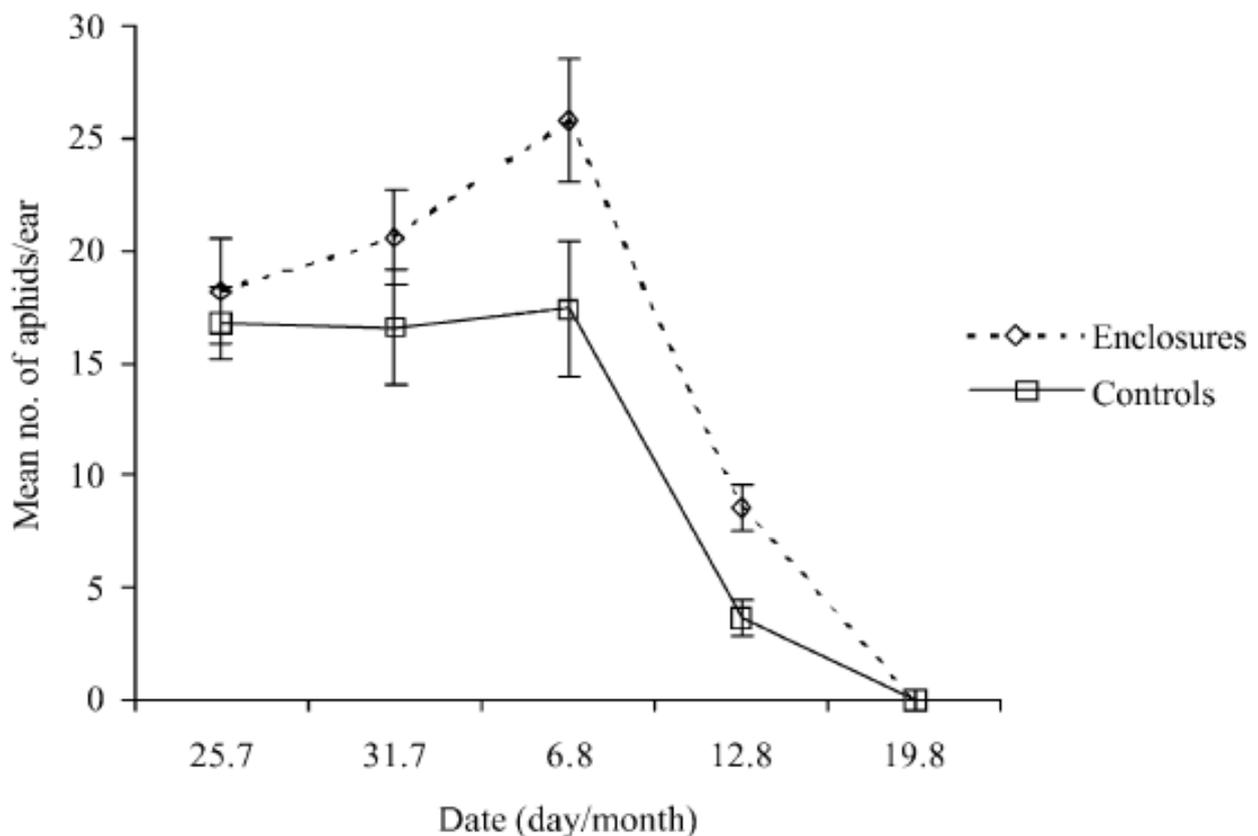


Fig. 1 – Numero di afidi nelle aree di campo private dei Carabidi (controls) e nelle aree dove i Carabidi potevano muoversi liberamente senza barriere (Enclosures). Da Collins *et al.*, 2002.

1.2 Effetti dei pesticidi su specie benefiche

I pesticidi (erbicidi, fungicidi, insetticidi) sono largamente utilizzati in ambienti agricoli, sanitari e domestici, e hanno la capacità di contrastare insetti, parassiti, malattie ed erbe infestanti. Il loro largo impiego ha reso noti, molto presto, i rischi che questi trattamenti causano all'ambiente, e per questo motivo tra gli anni 80 e i primi del 90, sono stati introdotti pesticidi che appaiono maggiormente selettivi rispetto ai predecessori (Sánchez-Bayo *et al.*, 2013).

1.2.1 Insetticidi

Gli insetticidi sistemici, a differenza dei tipici insetticidi da contatto furono sviluppati per la prima volta negli anni '50, con l'introduzione di composti organo-fosforati (OP) come il dimetoato. Il loro uso espone a rischio specie non bersaglio come impollinatori e predatori come i Coleotteri Carabidi (Sánchez-Bayo *et al.*, 2013). Gli effetti sub-letali che gli insetticidi causano sugli artropodi utili nei sistemi agricoli, sono stati oggetti di molti studi, tali effetti sono divisi in comportamentali e fisiologici (Desneux *et al.*, 2007).

Gli effetti comportamentali sono causati maggiormente da intossicazione diretta, con un conseguente effetto sulla coordinazione dei movimenti, effetto know-down, tremore; conseguenze secondarie di modifiche comportamentali, come l'interruzione nella rilevazione di caïromoni; effetti irritanti. Variazioni nel movimento sono state osservate in *Coccinella septempunctata*, se rilasciata in un'area trattata con deltametrina. Tali variazioni erano dovute principalmente a causa dell'irritazione causata dal pesticida. I pesticidi possono influire anche sul coordinamento tra il sistema nervoso e ormonale degli insetti, con conseguente rottura della complessa serie di eventi comportamentali e fisiologici relativi alla deposizione delle uova. Le perturbazioni indirette nel comportamento della deposizione delle uova possono essere indotte dall'effetto repellente dei pesticidi e

anche dalla comparsa di movimenti scoordinati dopo l'esposizione ai pesticidi (Desneux *et al.*, 2007). Gli insetti esposti ai pesticidi, possono modificare anche il loro comportamento alimentare, alcune sostanze chimiche possono avere effetti repellenti sugli insetti e questo effetto può essere in conflitto con il comportamento alimentare, altri pesticidi invece utilizzati appositamente per le loro proprietà di soffocare nell'insetto il desiderio di nutrirsi, possono anche indurre insetti utili a non alimentarsi quando esposti; in terzo luogo, gli insetti, dopo l'esposizione ai pesticidi, a causa della ridotta capacità olfattiva possono avere difficoltà nel localizzare il cibo.

Oltre a compromettere il comportamento alimentare, gli insetticidi possono compromettere anche la navigazione e l'orientamento, che coinvolgono segnali sensoriali, chimici e visivi. Molti studi riportano effetti negativi sul comportamento dell'orientamento.

Per gli impollinatori l'apprendimento visivo dei punti di riferimento è importante per l'orientamento spaziale. Le api (*Apis mellifera*) utilizzano punti di riferimento visivi per comunicare con precisione alle loro compagne di nido la distanza e la direzione per volare e raggiungere una fonte di cibo. Un'ape esposta ad antiparassitari nel corso di un viaggio di foraggiamento può erroneamente acquisire o integrare modelli visivi causando disorientamento che potrebbero influenzare l'accuratezza delle informazioni trasmesse attraverso le danze dei raccoglitori di ritorno (Desneux *et al.*, 2007).

I pesticidi possono avere effetti fisiologici a diversi livelli, i carbammati e i composti organo-fosforati sono inibitori dell'enzima acetilcolinesterasi (AChE), bloccando così la trasmissione dell'impulso nervoso attraverso le sinapsi neuronali. Il legame dei carbammati con l'enzima è lentamente reversibile e temporaneo, mentre quello degli organo-fosforati (OP) alchilici è irreversibile (Sanchez-Bayo *et al.*, 2013).

In un studio condotto da George e Ambrose (2004) si è constatato che in presenza di pesticidi i plasmotociti, che hanno un ruolo diretto nella risposta immunitaria degli insetti consentendo l'incapsulamento di corpi estranei, possono diminuire di numero, ma gli ematociti granulari che svolgono un ruolo nella

disintossicazione attraverso la fagocitosi possono aumentare. Si ipotizza che tale aumento sia dovuto alla trasformazione da plasmaciti in ematociti. Nei rapporti ospite-parassitoide, i pesticidi possono indirettamente influenzare i parassitoidi abbassando la reazione immunitaria dell'ospite.

I pesticidi possono indurre anche l'alterazione del rapporto tra i sessi degli insetti utili tramite la sopravvivenza differenziale in funzione del sesso, ma gli effetti possono essere ulteriori poichè i pesticidi possono indurre deformazioni di ovaie e testicoli. Generalmente le cause principali che possono alterare il rapporto sessuale della prole quando gli adulti sono sottoposti ai pesticidi, sono gli effetti sulla fecondazione degli ovuli, e la sopravvivenza dei sessi. Effetti fisiologici a livello di sviluppo, sono stati registrati in molti studi, e possono derivare da perturbazioni nello sviluppo dei tessuti neuronali da parte di sostanze neurotossiche (Desneux *et al.*, 2007). Composti come l'alofenozide, che è l'unico composto sistemico tra le idrazine, imitano l'ormone steroideo ecdisone, promuovendo la muta negli artropodi. La muta prematura nelle larve di alcuni taxa di insetti, in particolare nei lepidotteri, impedisce loro di raggiungere la fase adulta. Data la loro modalità di azione, tutti questi composti sono insetticidi ad ampio spettro, estremamente tossici per la maggior parte dei taxa animali, dai vermi ai mammiferi (Sanchez-Bayo *et al.*, 2013).

1.2.2 Erbicidi

Gli erbicidi sono ampiamente utilizzati per il controllo selettivo delle erbe infestanti, per aumentare la resa e la qualità delle colture. Anche se sono stati progettati per avere effetti solo sulle piante infestanti bersaglio, recenti studi hanno evidenziato che gli erbicidi applicati nei sistemi agricoli hanno anche effetti negativi su specie non bersaglio negli *habitat* di bordo campo (Freemark & Boutin, 1995; Damalas & Eleftherohorinos, 2011; Prosser *et al.*, 2016). Erbicidi a base di metribuzina, clomazone, pendimethalin, e cicloxydim sono alcuni degli erbicidi pre e post emergenza di maggior successo e ampiamente utilizzati. Gli erbicidi sono caratterizzati da un controllo delle erbe infestanti ad ampio spettro a tassi di utilizzo

molto bassi e hanno una buona selettività delle colture. Portano alla rapida cessazione della divisione della cellula vegetale (Cobb & Reade, 2011) e agiscono fungendo da inibitori della fotosintesi (metribuzina); della biosintesi dei carotenoidi (clomazone); dell'acetil-CoA carbossilasi, che catalizza il primo passo nella sintesi degli acidi grassi coinvolti nella sintesi di membrane (cicloxydim) e nell'assemblaggio dei microtubuli che influenza la divisione cellulare (pendimethalin) (Naylor, 2008).

L'effetto dell'esposizione ad erbicidi può influenzare direttamente (ad es. perdita o riduzione in abbondanza o idoneità delle piante non bersaglio) o indirettamente (ad esempio perdita o riduzione dell'abbondanza o idoneità di organismi a causa della perdita delle risorse alimentari o distruzione dell'*habitat*) gli invertebrati del suolo (Prosser *et al.*, 2016) (Fig. 2), che forniscono servizi ecosistemici nella rete alimentare come primari e consumatori secondari o decompositori inclusi lombrichi (Stellin *et al.*, 2018), collemboli, isopodi (Niemeyer *et al.*, 2018), ragni (Michalková & Pekár, 2009; Korenko *et al.*, 2016; Godfrey & Rypstra, 2018) e insetti (González-Tokman *et al.*, 2017; Prosser *et al.*, 2016).

Erbicidi come atrazina, simazina, paraquat e glifosato alterano il comportamento o possono causare mortalità nei coleotteri del suolo (Prosser *et al.*, 2016). Attività residua degli erbicidi nell'ambiente possono danneggiare direttamente gli invertebrati del suolo attraverso il contatto diretto o l'alimentazione di alimenti contaminati), causando in tal modo mortalità o disturbi comportamentali e fisiologici (Brust, 1990; Godfrey & Rypstra, 2018). Tuttavia, a causa della specifica modalità di azione della maggior parte degli erbicidi, gli effetti diretti sulle specie animali si verificano in genere solo a concentrazioni molto maggiori di quelle che possono derivare dalla dispersione e dal deflusso. L'esposizione degli organismi non bersaglio ai vari erbicidi, è più probabile che si verifichi in *habitat* di bordo campo, poichè a seguito dell'applicazione di routine, gli erbicidi possono entrare in questi *habitat* come deriva da spruzzo (goccioline e vapori liquidi), o essere trasportati fuori campo attraverso l'erosione del suolo provocata dal vento e dall'acqua (Prosser *et al.*, 2016).

In uno studio condotto su *Pardosa agrestis*, una specie di ragno comune negli agroecosistemi dell'Europa centrale e importante per il controllo dei parassiti, sono

stati testati otto diversi erbici a base di glifosato sull'attività predatoria di tale specie, i dati ottenuti hanno dimostrato che i ragni esposti a tutti i trattamenti antiparassitari hanno mostrato un'attività predatoria totale inferiore rispetto al gruppo di controllo (Korenko *et al.*, 2016).

In un altro studio condotto da Kaya *et al.* (2000) sono stati testati cinque erbicidi per la genotossicità, quattro dei quali sono triazine (amitrolo, metrybuzina, prometryn e terbutryn) e diquat, un composto bipiridilico. Queste sostanze sono ampiamente usate per controllare le erbacce a foglia larga nell'area mediterranea, e agiscono bloccando la fotosintesi attraverso l'inibizione del trasporto degli elettroni, provocando così l'inedia delle piante trattate (Bülent Kaya *et al.*, 2000).

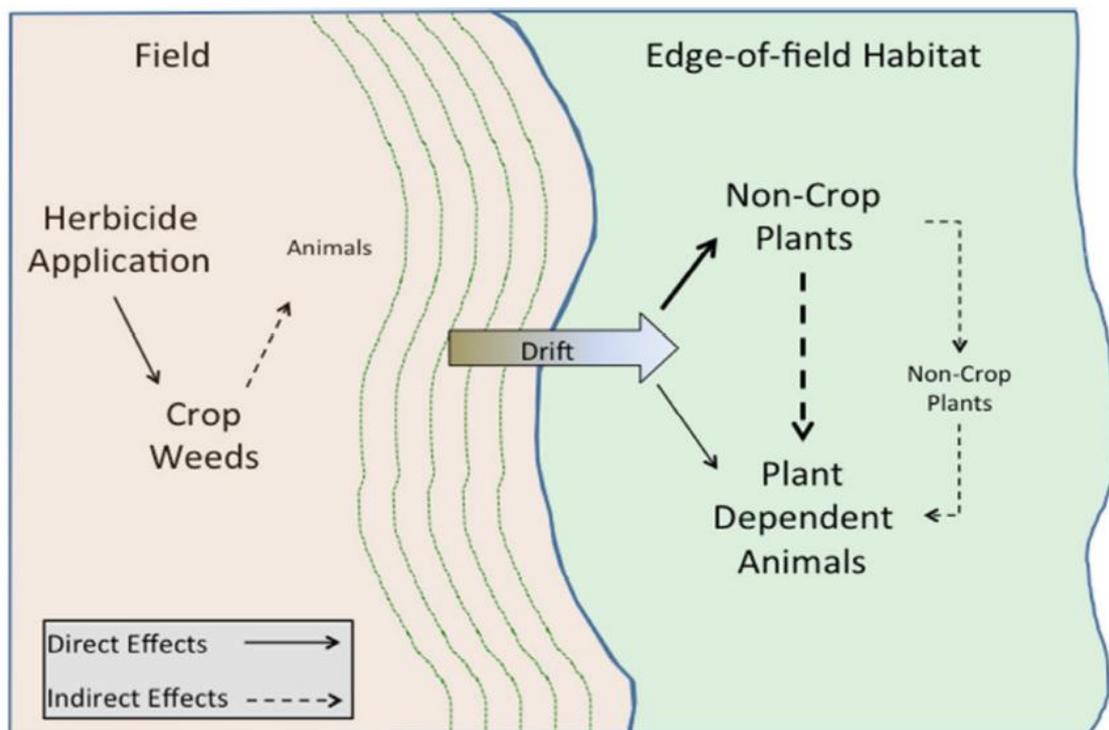


Fig. 2– Modello che illustra la deriva dei pesticidi verso gli *habitat* di bordo campo. L'applicazione effettuata ha effetti diretti sulle specie vegetali (linea continua), e indiretti sulle specie animali (linea tratteggiata), attraverso percorsi di esposizione (linee spesse e caratteri grandi), o percorsi di minore esposizione (linee sottili e icaratteri piccoli). Da Prosser *et al.*, 2016.

1.2.3 Effetti dei pesticidi sui Coleotteri Carabidi

Negli insetti, gli effetti letali e subletali degli erbicidi sono stati registrati a diversi livelli dell'organizzazione biologica (Prosser *et al.*, 2016; Sharma *et al.*, 2018): a livello di comunità, come le relazioni quantitative tra le specie (Honek & Jarošik, 2000); a livello di specie, come il numero di specie e l'abbondanza (Holland & Luff, 2000); a livello di organismo, come i cambiamenti morfologici e fisiologici (Magura *et al.*, 2006).

L'utilizzo di sostanze chimiche nell'ambiente per il controllo di specie infestanti, può avere effetti su tutti i componenti della rete trofica, effetti tossici dovuti sia al principio attivo e sia ai prodotti di degradazione che si accumulano nel suolo. Alcuni metaboliti di imidacloprid, thiamethoxam, fipronil e il 50% di carbammati sono tossici come i composti progenitori. Tuttavia, poiché gli insetticidi sistemici non creano bioaccumulo negli organismi, il rischio di avvelenamento secondario attraverso la catena alimentare è nullo (Sanchez-Bayo *et al.*, 2013).

L'impatto dei pesticidi sui Coleotteri Carabidi, è stato ampiamente studiato, soprattutto per il ruolo che svolgono come predatori di specie nocive. Questi organismi possono subire gli effetti tossici sia direttamente sottoforma di cambiamenti fisiologici morfologici e comportamentali, che indirettamente.

La maggior parte delle ricerche sugli effetti dei pesticidi sui Coleotteri Carabidi, si è concentrata sulla tossicità diretta di insetticidi, sebbene effetti sub-letali possono anche avere un impatto sulle popolazioni a lungo termine. Queste possono avvenire attraverso una risposta fisiologica o come risultato di una scarsa alimentazione dovuta alla mortalità delle prede.

Generalmente erbicidi e fungicidi non sono direttamente tossici per i Coleotteri Carabidi, ma possono influenzare la sopravvivenza delle specie in quanto agiscono sulle risorse trofiche di cui si nutrono, e di conseguenza possono modificare gli *habitat*.

Per esempio gli erbicidi possono alterare la densità, la distribuzione e la composizione delle erbacce. Questi forniscono foglie e semi per fitofagi e specie

polifaghe, controllano il microclima e, quindi, l'umidità del suolo, governano il grado di protezione fisica dai predatori e influenzano la facilità di movimento. Così le applicazioni di erbicidi favoriranno specie xerofobiche che preferiscono *habitat* più aperti, mentre le specie xerofile saranno confinate ai margini di campo (Holland & Luff, 2000).

Il livello di tossicità degli insetticidi è molto complesso poiché dipende da un gran numero di fattori come le caratteristiche chimiche dell' insetticida, le caratteristiche biologiche e fisiologiche della specie, le tecniche di indagine (Fig. 3). Comparando quindi risultati ottenuti da trattamenti in campo con quelli fatti in laboratorio in condizioni controllate, si possono riscontrare molte differenze (Holland & Luff, 2000).

In uno studio condotto in due anni, mirato a valutare gli effetti di alcuni insetticidi (deltametrina, dimetoato, carbofurano e chlorpyrifos) su due specie di Coleotteri Carabidi, *Bembidion obscurellum* e *B. quadrimaculatum*, si è visto che una maggiore mortalità è stata causata dal carbofurano e dal chlorpyrifos, che hanno causato una mortalità superiore all'83%. Il dimetoato ha causato una mortalità del 73%, mentre la deltametrina è risultato essere l'insetticida meno tossico, poiché ha causato una mortalità del 30% in entrambe le specie (Floate et al., 1989).

Negli ultimi anni sono stati effettuati studi anche sugli effetti che i pesticidi causano sui comportamenti di base dei Coleotteri Carabidi, come locomozione, alimentazione e termoregolazione.

In uno studio condotto su *Platynus assimilis*, mirato a valutare gli effetti sub-letali di basse dosi di alfa-cipermetrina, sull'attività motoria, è stato osservato che l'attività locomotoria a concentrazioni elevate ($10 - 100 \text{ mg/L}^{-1}$) viene ridotta, mentre a basse concentrazioni ($0,01 - 0,1 \text{ mg/L}^{-1}$) si ha un notevole aumento a breve termine, che dura dai 90 ai 120 minuti dopo una breve esposizione, indicando così che anche dosi sub-letali possono alterare significativamente le generali attività motorie della specie (Tooming et al., 2014).

Basse dosi di alfa cipermetrina ($0.1-10\text{mgL}^{-1}$) possono ridurre anche la capacità degli scarabei di termoregolazione comportamentale. Adulti di *Platynus*

assimilis sottoposti a trattamento, se esposti alle alte temperature (45°C) morivano per shock termico, e quelli che sopravvivevano mostravano anomalie comportamentali, a differenza degli esemplari di controllo, che se sottoposti a temperature elevate, cercavano rifugio in zone fresche (20°C). La perdita della tendenza a nascondersi in rifugi freschi, in presenza di temperature elevate, aumenta così la probabilità di esposizione alle radiazioni e ad un aumento della temperatura corporea fino a livelli letali (Merivee *et al.*, 2015).

In un altro studio, condotto sempre su *Platynus assimilis* per quantificati gli effetti sub-letali di tiamethoxam sulla locomozione e sull'alimentazione, è stato osservato che il tiamethoxam, somministrato per via orale a diverse dosi (1.1; 10.8 e 108.1 ng / g), induce cambiamenti notevoli nella locomozione e nell'alimentazione. Una notevole riduzione nell'alimentazione si ha già il primo giorno di esposizione in esemplari trattati con la massima dose, e dal secondo giorno dopo l'esposizione, anche gli esemplari trattati con dosi estremamente basse, presentavano lo stesso fenomeno (Tooming *et al.*, 2017).

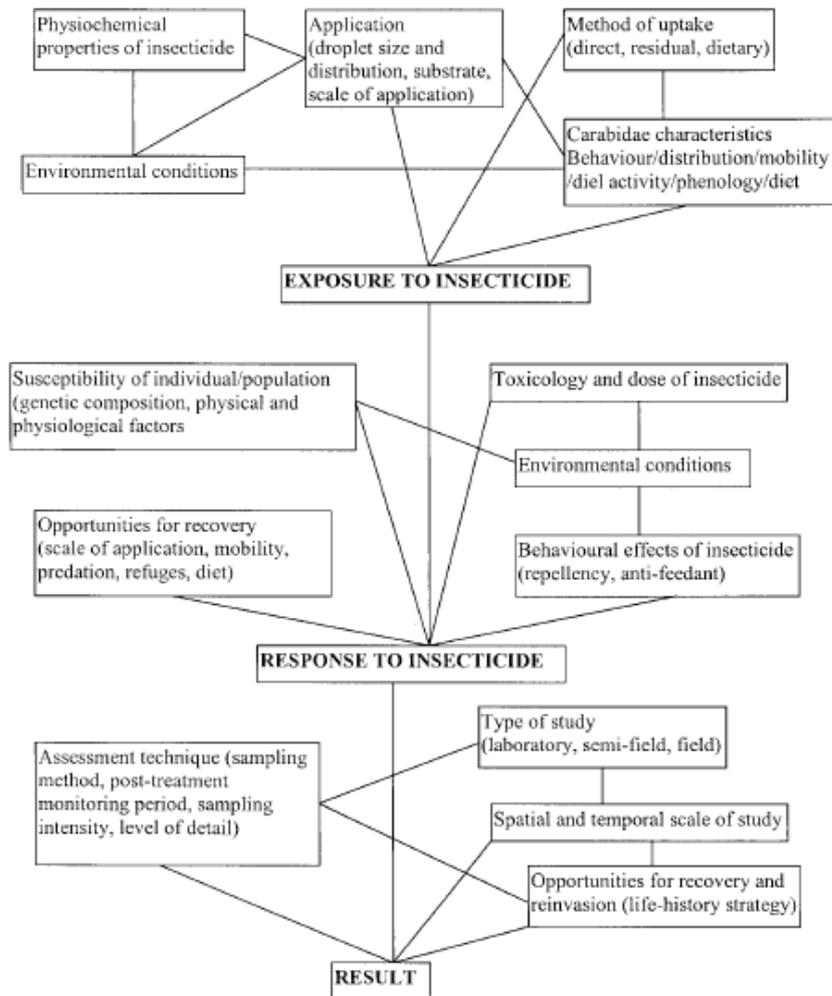


Fig. 3 – Rappresentazione schematica dell'interazione tra insetticidi e Carabidi. La risposta ad un insetticida è determinata da una serie di fattori, come le caratteristiche dell'insetticida stesso, le caratteristiche biologiche della specie presa in esame, le condizioni ambientali (Holland & Luff, 2000)

1.3 Sistema immunitario

1.3.1 La risposta immunitaria

Tutti gli organismi viventi hanno la necessità di proteggersi da agenti patogeni, infezioni e di rimuovere cellule o tessuti danneggiati, per fare ciò hanno sviluppato una serie di meccanismi di difesa. Il sistema immunitario degli insetti riconosce un'ampia varietà di target, sia abiotici naturali che artificiali come nylon, lattice e sfere cromatografiche, sia biotici come funghi, batteri, nematodi, insetti parassitoidi e tessuti danneggiati. (Lavine & Strand, 2002; Schmid-Hempel, 2005; Siva-Jothy *et al.*, 2005). Il sistema immunitario negli insetti agisce mettendo in gioco sia una risposta immunitaria cellulare che umorale. La risposta cellulare coinvolge una serie di emociti che operano mediante fagocitosi, incapsulamento, nodulazione e melanizzazione mentre quella umorale coinvolge peptidi antimicrobici (AMP), cascate enzimatiche come la proPO e altre molecole immunitarie secrete nel plasma.

La risposta immunitaria si basa su tre reazioni strettamente interconnesse tra loro, la prima è l'induzione di una cascata di enzimi proteolitici, è il caso del sistema della profenolossidasi e della coagulazione, la seconda è la reazione di difesa cellulare che consiste in fagocitosi e/o incapsulamento, la terza è la sintesi di peptidi antimicrobici da parte del grasso corporeo. La sintesi di peptidi antimicrobici per la difesa dell'ospite è caratteristica degli ordini di insetti olometaboli, come coleotteri, ditteri, lepidotteri, e pochi eterometaboli, ad esempio gli emitteri; al contrario, tale fenomeno sembra essere assente in ordini di insetti più antichi come gli ortotteri, in cui sembra prevalere la fagocitosi e l'incapsulamento (Hoffmann *et al.*, 1996).

Le cellule presenti nell'emolinfa degli insetti, sono chiamate comunemente emociti (Thepold *et al.*, 2004), e appaiono con proprietà morfo-funzionali simili ai globuli bianchi dei mammiferi (Ottaviani, 2005). Gli insetti hanno diversi tipi di emociti che sono identificati secondo caratteristiche morfologiche e funzionali (Lavine e Strand, 2002), e sono responsabili di una serie di risposte di difesa, come la fagocitosi, la nodulazione, l'incapsulamento e la melanizzazione (Marmaras e

Lampropoulou, 2009). Gli emociti si formano durante due fasi di sviluppo di un insetto, la prima popolazione di emociti viene prodotta durante l'embriogenesi dal mesoderma dorsale e cefalico, mentre la seconda popolazione viene prodotta durante la fase larvale o ninfae dagli organi ematopoietici del mesoderma. Tale fenomeno chiamato ematopoiesi, è noto principalmente da studi condotti su *Drosophila* (Strand, 2008). Il numero e il tipo di emociti in circolazione nell'emolinfa varia da specie a specie (Fig. 4). Negli insetti sono state descritte morfologicamente e funzionalmente diverse classi di emociti: plasmaciti, granulociti, coagulociti, cellule sferule, oenociti, proemociti, che sono presenti nella maggior parte delle specie, e trombociti e podociti, presenti in un numero limitato di specie (Brehelin *et al.*, 1978).

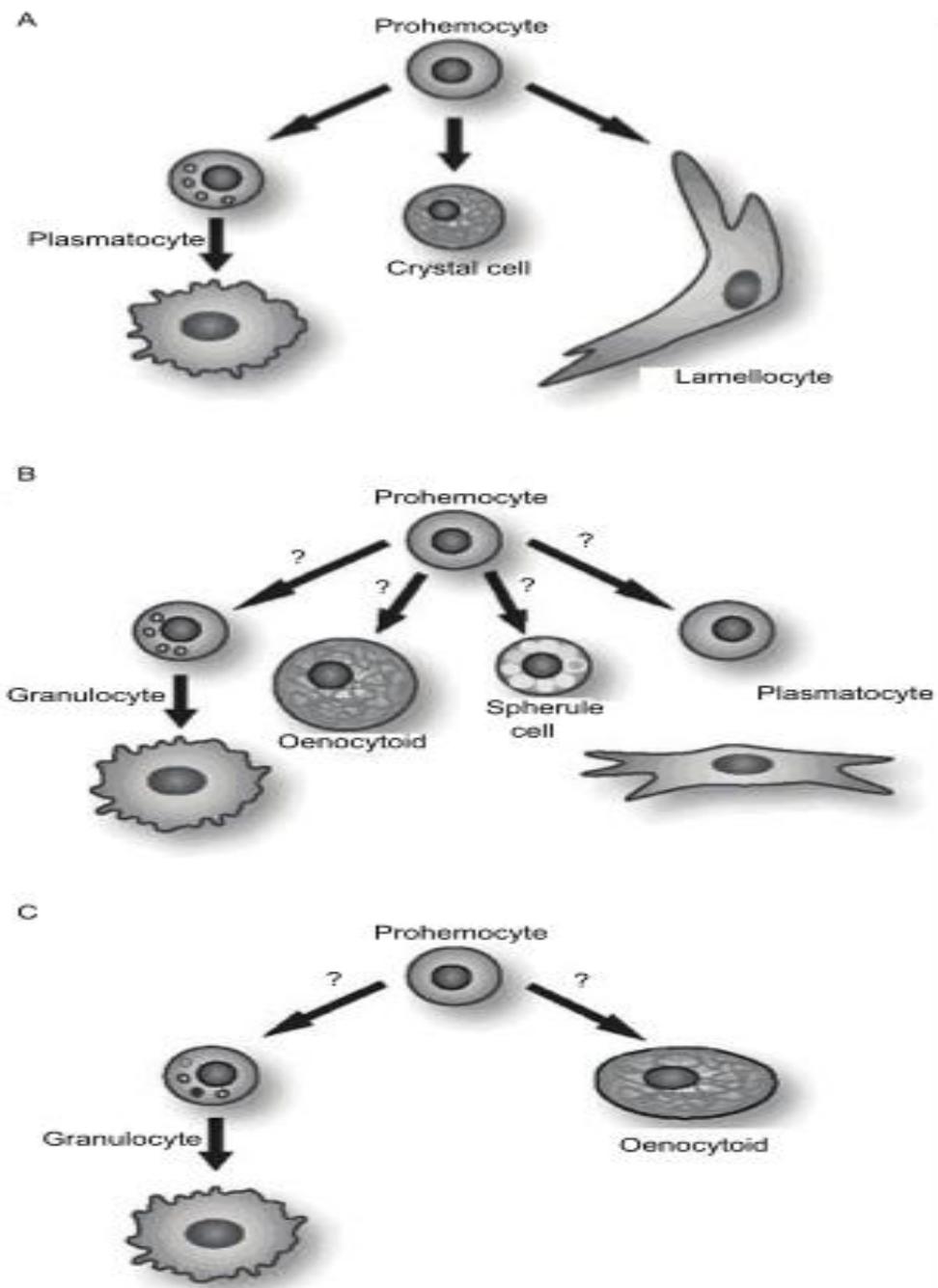


Fig. 4 - Differenziazione tipi di emociti circolanti in alcuni insetti studiati; nelle larve di *Drosophila* (A) vi sono: plasmatociti, cellule di cristallo e lamellociti; in alcune specie di lepidotteri (B) troviamo granulociti, plasmatociti, cellule sferule e oenociti; *Anopheles gambiae* e *Aedes aegypti* (C) contengono 3 tipi di emociti in circolazione, proemociti, granulociti e oenociti (Strand, 2008).

1.3.1.1 Risposta cellulare

FAGOCITOSI

Questo processo gioca un ruolo chiave contro le infezioni da parassiti e parassitoidi come dimostrato da studi condotti sul campo e da osservazioni fatte in laboratorio (Danilova, 2006), e negli insetti è realizzata essenzialmente da plasmaciti e granulociti circolanti nell'emolinfa (Siva-Jothy *et al.*, 2005; Marmaras e Lampropoulou, 2009).

NODULAZIONE E INCAPSULAMENTO

Nodulazione e incapsulazione sono meccanismi cellulari che intervengono quando il patogeno è troppo grande per essere fagocitato. Il meccanismo di difesa predominante negli insetti è la nodulazione, e si riferisce ad aggregati di emociti che intrappolano un gran numero di batteri. (Lavine & Strand, 2002; Marmaras & Lampropoulou, 2009). Il nodulo una volta che si è formato viene melanizzato, e rimane nel corpo dell'insetto fin quando esso non muore (Siva-Jothy *et al.*, 2005). I primi emociti che rispondono con la nodulazione e l'incapsulamento sono i granulociti (Siva-Jothy *et al.*, 2005).

1.3.1.2 Risposta umorale

Fenolossidasi (PO)

Secondo recenti studi, l'enzima PO è un effettore importante usato contro vari agenti patogeni: virus, funghi, batteri Gram positivi e negativi, e parassiti; inoltre è responsabile dell'attivazione della melanogenesi (Schmind-Hempel, 2005; Cerenius *et al.*, 2008; Gonzalez & Cordoba, 2012). PO è un enzima chiave nella riparazione di ferite, produzione di citotossine per agenti patogeni e incapsulamento di patogeni grandi, l'enzima inoltre è responsabile in alcune specie di insetti, della produzione di caratteri sessuali secondari. Come nei maschi di *Ceromitia xanthostoma* dove è

responsabile della comparsa di una macchia sulle ali durante il periodo di corteggiamento (Rolff & Siva-Jothy, 2004). Due diversi tipi di PO sono stati individuati negli insetti, il tipo tirosinasi, che si trova in emociti, plasma e tegumento, e il tipo laccasi che si trova solo nel tegumento. Il tipo tirosinasi è indicato come fenolossidasi. L'enzima PO è espresso in tutti gli insetti nella sua forma inattiva, e viene convertita nella forma attiva. L'enzima PO richiede un complicato sistema di attivazione e inibizione, che coinvolge diversi tipi di cellule, molecole di segnalazione, zimogeni PO, ovvero la forma inattiva della proPO, enzimi inibitori di PO, e persino PO stesso (Gonzalez & Cordoba, 2012). Il sistema proPO (profenolossidasi) è un complesso basato su enzimi-emolinfa, che se attivato genera peptidi e proteine adesive, che mediano molte delle reazioni di difesa negli artropodi (Marmaras *et al.*, 1996).

Il sito di sintesi della proPO sono soprattutto gli emociti, con specifiche variazioni in base al tipo di emociti. La proPO viene attivata da diversi fattori, sia naturali che artificiali, tra i naturali vi sono lipidi anfilitici come la lisolectina, cellule danneggiate, β -1,3-glucani, lipopolisaccaridi e peptoglicani. Tra i fattori artificiali, utilizzati per condurre studi di laboratorio sull'attivazione di proPO vi sono detergenti, acidi grassi, alcoli. Un eccesso di PO attiva può danneggiare l'ospite, pertanto è necessaria la presenza di un meccanismo di regolazione della PO. Nell'emolinfa degli insetti sono stati individuati diversi inibitori di serina proteasi che inibiscono l'attivazione di PO (Gonzalez & Cordoba, 2012). L'attivazione della PO sembra giochi un ruolo importante nelle reazioni cellulari come fagocitosi, formazione di noduli, melanizzazione e nelle reazioni di difesa umorale (Marmaras *et al.*, 1996).

MELANIZZAZIONE E COAGULAZIONE

Melanizzazione e coagulazione sono senza dubbio i processi di primaria importanza nell'immunità innata degli insetti per combattere le infezioni (Hoffmann *et al.*, 1996).

Il processo di melanizzazione inizia quando un target viene individuato dagli emociti mediante una cascata di segnali, gli emociti circondano tutto il corpo estraneo e rilasciano proteine chemoattrattive, queste proteine attirano i plasmotociti che formano un muro multicellulare di plasmotociti, gli strati interni della parete di plasmotociti aumentano e diventano densi e scuri, fenomeno dovuto alla produzione di melanina. La melanina, depositata sul bersaglio estraneo, impedisce la crescita e la riproduzione del patogeno portandolo a morte (Fig. 5) (Gonzalez & Cordoba, 2012).

La coagulazione è la formazione di una matrice insolubile nell'emolinfa degli insetti, o nel sangue dei vertebrati che contribuisce alla riparazione delle ferite, e all'arresto delle emorragie; il coagulo inoltre serve come impalcatura per la riparazione della cuticola danneggiata (Dushay, 2009).

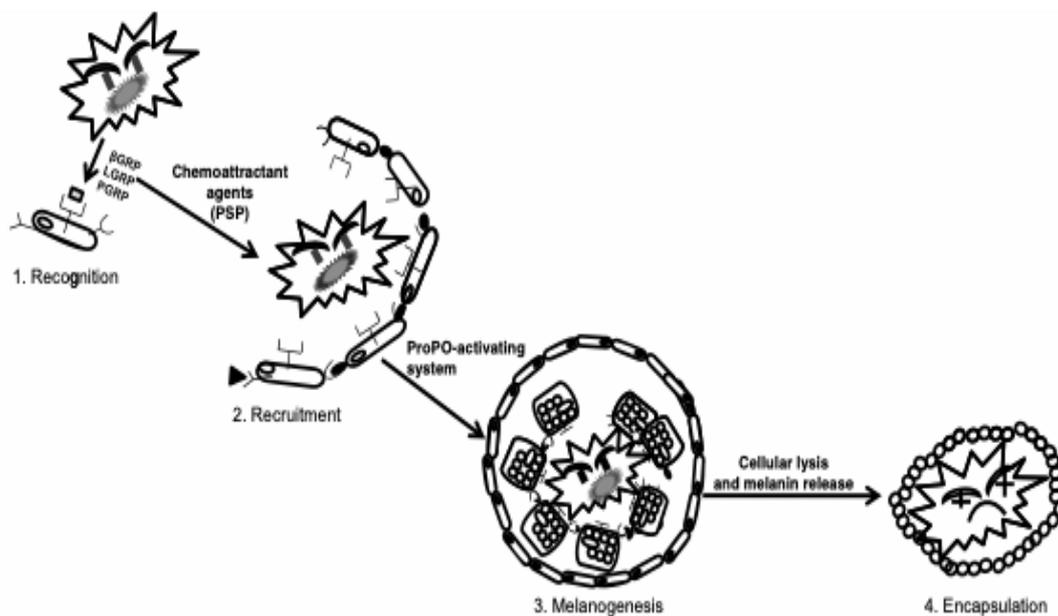


Fig. 5 – Il processo della melanizzazione include quattro fasi: 1) riconoscimento del patogeno attraverso molecole di membrana specifiche; 2) gli emociti circondano il corpo estraneo, rilasciando proteine chemoattrattive e attirando così i plasmotociti; 3) inizia la produzione di melanina; 4) rilascio della melanina e incapsulamento del patogeno (Gonzalez & Cordoba, 2012).

Peptidi antimicrobici

I peptidi antimicrobici sono molecole costituite da brevi sequenze di amminoacidi, presenti in una vasta varietà di organismi vegetali, animali, funghi e batteri (Ghosh *et al.*, 2011). Sono dei potenziali agenti terapeutici in quanto forniscono attività immunitaria contro batteri Gram positivi e negativi, virus, funghi, parassiti e cellule tumorali (Li *et al.*, 2012).

Il sito principale di produzione dei peptidi antimicrobici negli insetti sono i corpi grassi (Hoffmann *et al.*, 1996; Ottaviani, 2005). Alcuni peptidi come il lisozima e/o le defensine possono anche essere prodotte da cellule intestinali, ghiandole salivari e in alcune specie anche dalle ghiandole genitali sia maschili che femminili.

Lisozima

Il lisozima è un enzima ad azione battericida presente in tutti gli organismi viventi del Regno Animale (Callewaert & Michiels, 2010), e in differenti tessuti, emolinfa, vie alimentari, cuticola (Nappi & Ottaviani, 2000). Nel Regno Animale sono stati individuati tre principali tipi di lisozima che si distinguono tra loro per le sequenze degli amminoacidi e le proprietà biochimiche ed enzimatiche: il tipo C, prodotto dalla maggior parte dei vertebrati e individuato in alcune specie di lepidotteri, ditteri ed emitteri; il tipo G considerato insieme al tipo C il principale lisozima delle specie aviarie, e individuato in *Anopheles gambiae*, *Drosophila sp.*, *Apis mellifera*; e il tipo I, designato agli invertebrati.

Il lisozima di Tipo I si riscontra negli insetti dove tuttavia non è universalmente presente (Callewaert & Michiels, 2010). Il lisozima non è implicato solo in azioni battericide, ma anche in molte altre attività fisiologiche, come la digestione: i lisozimi prodotti dagli organismi viventi possono avere funzioni complementari o diverse. Alcuni tipi di lisozima contribuiscono alla difesa contro i batteri, e vengono espressi generalmente in fluidi e tessuti corporei esposti all'ambiente o coinvolti nella difesa contro i batteri, altri tipi di lisozima come quelli

coinvolti nella funzione digestiva, si trovano nello stomaco e/o nell'intestino (Callewaert & Michiels, 2010).

1.3.2 Effetti dei pesticidi sul sistema immunitario

I pesticidi possono interagire anche con la capacità immunitaria degli insetti, interagendo a diversi livelli della risposta immunitaria sia cellulare che umorale, come la cascata della profenolossidasi e l'attività litica dell'emolinfa (Fig. 6). Potrebbero interferire con il processo della melanizzazione, interrompendo l'attività della serina proteasi o interferendo con la cascata della fenolossidasi. Questo è probabilmente correlato a un meccanismo di disintossicazione per l'insetticida, ed ha probabilmente implicazioni sull'immunità. La cascata della fenolossidasi è molto vulnerabile ai pesticidi, perché i processi di ossidazione e idrolisi sono coinvolti anche nei meccanismi di detossificazione degli insetti (James & Xu, 2012).

Gli insetticidi regolatori della crescita hanno la capacità di influenzare sia la risposta cellulare che la risposta umorale. L'ormone giovanile in *Tenebrio molitor* sopprime sia la cascata della fenolossidasi che l'incapsulamento, mentre lo stesso aumenta l'attività di fenolossidasi nelle larve di *Musca domestica* (James & Xu, 2012). In uno studio condotto da Nasr *et al.*, (2010) è stato dimostrato che buprofezin e pyriproxyfen, due insetticidi regolatori della crescita, riducono l'attività di fenolossidasi nelle larve di *Spodoptera littoralis*. Alcuni insetticidi di origine botanica (terpinen-4-olo) hanno dimostrato di ridurre l'attività della fenolossidasi in *Mythimna separate* (Ma *et al.*, 2008), mentre l'estratto di *Artemisia annua* riduce la risposta della fenolossidasi e il numero di plasmaciti e granulociti in *Eurygaster integriceps* (Zibae & Bandani, 2010). In uno studio condotto su *Rhynocoris kumarii*, esposto a un organofosfato, è stato dimostrato che il numero totale degli emociti aumenta, con un aumento dei granulociti ma una diminuzione di proemociti e plasmaciti (James & Xu, 2012). E' stato dimostrato che alcuni organoclorurati (endosulfan) riducono l'incapsulamento nelle larve di *Drosophila melanogaster* alle uova di *Leptopilina boulardi*, mentre altri (lindano) non hanno nessun effetto su questo tipo di risposta

(Delpuech *et al.*, 1996). Si è visto che i valori di fenolossidasi basale registrati in adulti di *Calathus fuscipes* catturati in un campo trattato con lambda-cialotrina e cimoxanil, erano molto più alti rispetto a quelli registrati negli individui di controllo (Giglio *et al.*, 2017), e che il numero totale degli emociti di *Pterostichus melas italicus* esposto in laboratorio a concentrazioni sub-letali di dimetoato, si abbassa significativamente dopo 72 ore rispetto ai campioni di controllo (Giglio *et al.*, 2011).

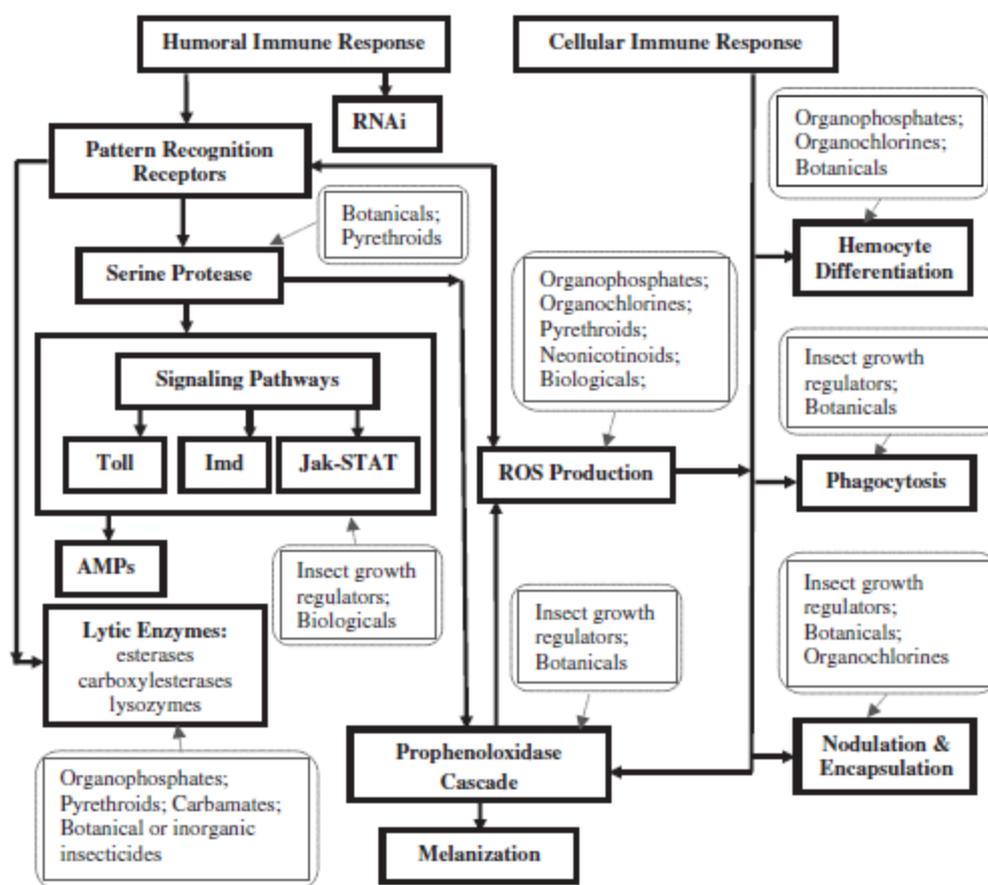


Fig. 6 - Effetto degli insetticidi sull'immunità degli insetti. I box e le frecce spesse e nere rappresentano uno schema del sistema immunitario degli insetti. Le caselle con il doppio contorno e le frecce punteggiate indicano quali pesticidi sono stati documentati per influenzare particolari risposte immunitarie (da James & Xu, 2012).

1.4 Effetti genotossici da esposizione a pesticidi

La genotossicità dei pesticidi per gli organismi non bersaglio e la loro influenza sugli ecosistemi, è un argomento di interesse globale. Il pendimethalin è un erbicida sistemico ampiamente utilizzato su riso, cotone, piselli, grano, patate, frutta, noci e altre colture residenziali e non residenziali; tuttavia, esercita contemporaneamente effetti tossici su organismi benefici come i lombrichi, gli invertebrati acquatici e altri animali non bersaglio, inclusi gli esseri umani. In uno studio condotto da Ahmad *et al.*, (2016), per valutare la genotossicità e lo stress ossidativo generato nei pesci da questa sostanza, sono stati effettuati test su campioni di sangue, fegato e cellule branchiali, e si è visto che il pendimethalin causa effetti genotossici in tutti e tre i tessuti. Studi genotossici sono stati effettuati anche per insetticidi come spinosad e deltametrina, che sono quelli più utilizzati nei programmi di gestione dei parassiti, su insetti bersaglio (*Bactrocera olea*) e non bersaglio (*Drosophila melanogaster*). I risultati ottenuti mediante il test di mutazione e ricombinazione somatica mostrano che entrambi gli insetticidi non causano effetti genotossici nelle specie prese in esame (Akmoutsou *et al.*, 2011). Effetti genotossici sono stati riscontrati in maschio e femmina di *Xerolycosa nemoralis* esposti in condizioni controllate di laboratorio al dimetoato. Il danno al DNA è stato misurato negli emociti e nelle cellule della ghiandola dell'intestino mediante il comet assay. I risultati hanno mostrato valori di danno al DNA più alti nei maschi che nelle femmine (Wilczek *et al.*, 2016). In uno studio condotto su *Drosophila melanogaster*, mirato a valutare la genotossicità di cinque erbicidi, amitrolo, metribuzina, prometryn, terbutryn e diquat, è stato dimostrato che solo due di questi, amitrolo e terbutryn causano effetti genotossici (Kaya *et al.*, 2000).

Gli effetti genotossici a livello cellulare possono essere valutati mediante tecniche di tipo molecolare, o tecniche come il *Comet Assay*, un metodo affidabile per la valutazione del danno al DNA nelle cellule eucariotiche ampiamente utilizzato per valutare gli effetti genotossici negli organismi acquatici e terrestri, come gli insetti (Avishai *et al.*, 2003; Augustiniak *et al.*, 2016)

1.4.1 Comet assay

Il *Comet assay*, o *Single Cell Gel Electrophoresis assay* (SCGE), è una tecnica di laboratorio molto sensibile, che viene utilizzata per rilevare eventuali danni a livello del DNA nucleare (Avishai *et al.*, 2003; Azqueta *et al.*, 2014; Azqueta & Collins, 2013; Augustyniak *et al.*, 2016). Può essere effettuato in condizioni neutre, consentendo di rilevare rotture del doppio filamento, o in condizioni alcaline, dove oltre a rilevare anche le rotture del singolo filamento del DNA (Cotelle & Férard, 1999; Avishai *et al.*, 2003; Collins, 2004; Azqueta & Collins, 2013; Augustyniak *et al.*, 2016), è in grado di rilevare altri danni, come danni ossidativi, legami incrociati DNA-DNA/proteine e la degradazione del DNA dovuta alla necrosi e all'apoptosi delle cellule (Avishai *et al.*, 2003). Il danno più importante a livello molecolare è l'induzione di vari tipi di lesioni indotte nel DNA, comprese le rotture dei filamenti. Tali interruzioni provocano aberrazioni cromosomiche che possono portare alla morte cellulare, e di conseguenza a diverse condizioni patofisiologiche (Jha, 2008).

Il Comet assay ha dimostrato che l'esposizione di spermatozoi di pesce e di spermatidi a radiazioni ionizzanti (che sono molto efficaci nell'indurre le rotture del filamento di DNA) induce anche mutazioni nelle cellule somatiche della crescita di embrioni F1 che portano a conseguenze letali (Jha, 2008).

Il *Comet assay*, utilizzato per il monitoraggio ambientale, può avere due scopi: valutare l'integrità biologica dell'ambiente, valutando il rischio di sostanze contaminanti per animali e piante presenti in un determinato *habitat*; valutare il rischio per l'uomo esposto al consumo di acqua contaminata. I primi a quantificare il danno nel DNA cellulare applicando questo metodo, furono Ostling e Johanson nel 1984, usando tecniche elettroforetiche a pH 9,5. Essi irradiarono le cellule con raggi γ e descrissero la migrazione del DNA verso l'anodo come risultato del rilassamento del superavvolgimento (Avishai *et al.*, 2003; Dhawan *et al.*, 2009; Azqueta e Collins, 2013). In seguito, la metodica ha subito una serie di modifiche (Singh *et al.*, 1988; Olive *et al.*, 1990; Avishai *et al.*, 2003; Azqueta & Collins, 2013) che hanno portato a

una versione più sensibile della tecnica in grado da valutare sia le rotture del DNA, sia i siti labili alcalini espressi come frazioni di filamenti franchi nel DNA.

La tecnica del *Comet assay* inizialmente è stata ideata per studiare gli effetti genotossici sui mammiferi e negli ultimi anni è stata applicata con successo anche su altri organismi, come funghi, batteri, piante e insetti (Fig. 7) (Jha, 2008; Augustyniak *et al.*, 2016), questo suggerisce chiaramente che non solo i pesci ma anche molti invertebrati ecologicamente rilevanti, potrebbero essere usati come specie sentinella per il rischio sulla salute umana (Jha, 2008).

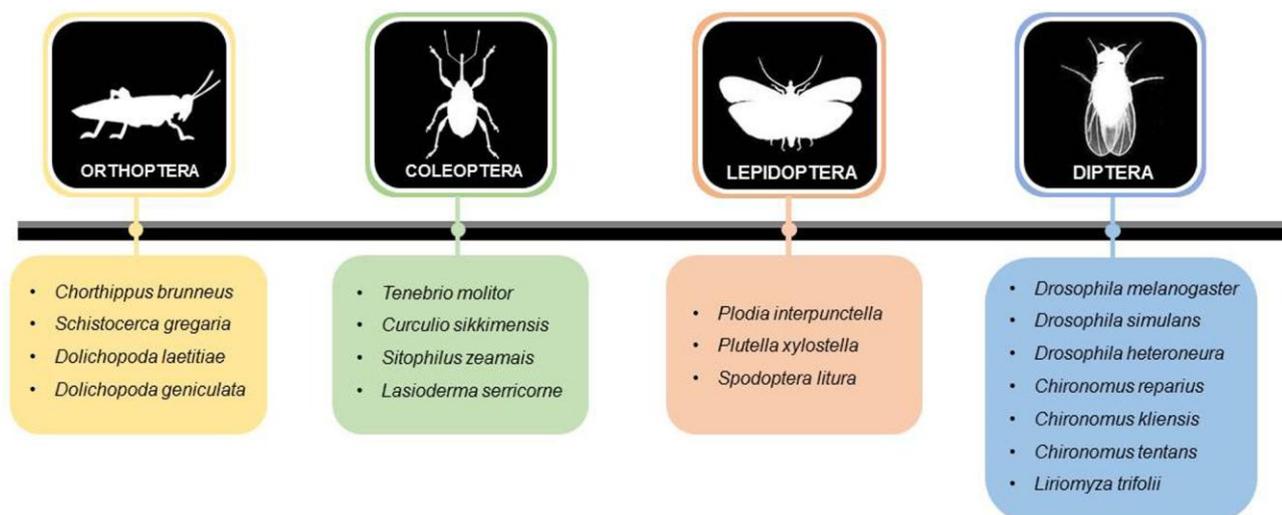


Fig. 7 – Specie su cui è stata applicata la matodica del *Comet assay*. Da Augustyniak *et al.*, 2016

Questo saggio ha offerto l'opportunità di studiare il danno al DNA, la riparazione e la morte cellulare in diversi tipi cellulari (Jha, 2008). Sono stati condotti studi mirati alla determinazione degli effetti dell'esposizione a diversi contaminanti, come ad esempio: erbicidi, insetticidi, e altri xenobiotici come metil metansolfonato, fungicidi, contaminanti petrolchimici, inquinanti organici persistenti (POPs), etil metansolfonato, benzo (a) pirene, coloranti di zolfo, antibiotici e dimetilsolfossido (DMSO) (De Lapuente *et al.*, 2015) facendo ricorso ad una tecnica che consiste nel miscelare una sospensione di cellule con agarosio e di formare un gel sottile su un vetrino. I vetrini così ottenuti vengono immersi in soluzione di lisi, contenente NaCl

2 M, per rimuovere le membrane cellulari e nucleari, ed estrarre gli istoni in modo da interrompere così l'organizzazione nucleosomiale del DNA, ma non il superavvolgimento negativo (imposto dai giri superelicali del DNA attorno al nucleo dell'istone). I corpi inglobati nel gel somigliano a nuclei per dimensioni e forma e sono noti come nucleidi.

Secondo il modello strutturale dei nucleidi sviluppato da Cook *et al.*, negli anni '70, si suppone che ogni molecola di DNA sia attaccata a intervalli ad una matrice o impalcatura nucleare, in modo da essere vista come una serie di anelli, ognuno dei quali è una singola unità strutturale. Se il superavvolgimento viene rilassato in un ciclo mediante una rottura del filamento di DNA, tale anello, in presenza di un campo elettroforetico, è in grado di estendersi verso l'anodo. Più interruzioni sono presenti, più anelli di DNA vengono rilassati, e più DNA appare nella coda della cometa. (Azqueta & Collins, 2013).

Sebbene la metodologia del *Comet assay* sia semplice e non richiede attrezzature sofisticate, l'analisi delle immagini della cometa non è così semplice. Per misurare la rottura del DNA nel Comet assay sono utilizzati due metodi di analisi: analisi visiva e analisi di immagini computerizzate. Nell'analisi visiva le comete sono classificate in base alla loro morfologia e il danno al DNA viene valutato come un aumento della percentuale di cellule con comete. Tale analisi non richiede nessuna attrezzatura speciale, a parte un microscopio. Ogni cellula viene valutata visivamente come appartenente a uno dei cinque stadi di danno specifici, dal DNA non danneggiato (stadio 0), privo di coda, al DNA con danno più elevato (stadio D) (Avishai *et al.*, 2003) Fig. 8.

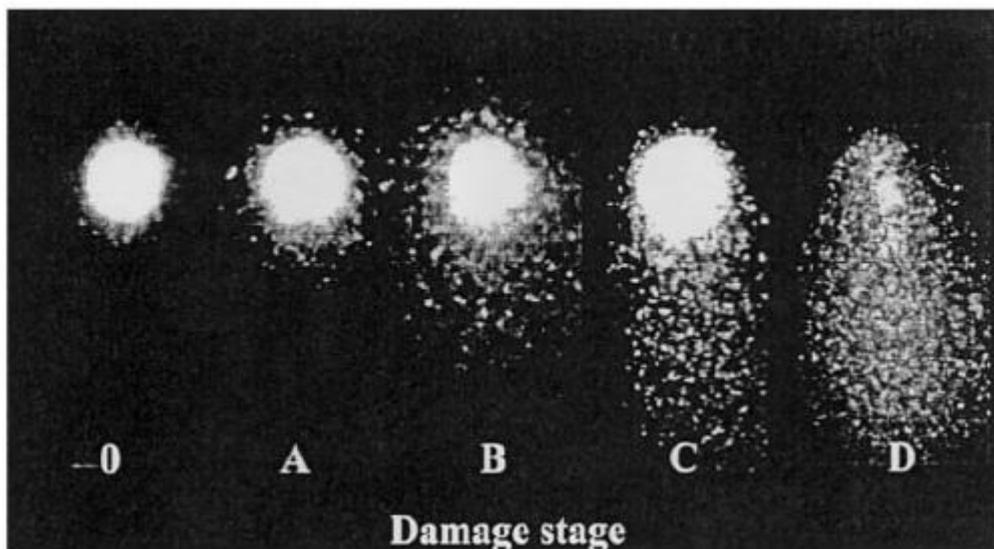


Fig. 8 - Diversi stadi di danno cellulare (0-D) utilizzati per calcolare il valore del *comet assay* mediante approccio visivo. Da Avishai *et al.*, 2003.

E' possibile valutare l'entità del danno mediante analisi di immagini computerizzate, che richiedono una fotocamera ad alta risoluzione per ottenere la massima sensibilità, e i software commerciali comunemente usati (Komet [Kinetic Imaging, UK], il sistema di analisi Comet [Loats Associates, USA], Viscomet [Impuls, Germania] e il test Comet [Perceptive Instruments, Regno Unito]) che forniscono ulteriori criteri di misurazione come le misure della lunghezza della coda, il momento di estensione della coda, il momento di coda e la percentuale di DNA nella coda (Avishai *et al.*, 2013). I parametri più utilizzati sono la percentuale di DNA nella coda e il momento di coda, che combina le informazioni di due parametri, lunghezza della coda e intensità della coda, ma questo non ha unità. L'uso della percentuale di DNA nella coda è più informativo e molto facile da interpretare (Azqueta *et al.*, 2013).

1.5 Morfometria

Gli insetti hanno variazioni morfologiche associate al loro ambiente, esistono numerosi caratteri morfologici che vengono considerati adattivi, come la lunghezza delle zampe posteriori o la curvatura delle elitre (De La Fuente *et al.*, 2010). Le dimensioni corporee negli insetti e i relativi parametri morfologici, sono generati da una serie di parametri, come i processi fisiologici e la pressione ambientale, fattori ontogenetici, vincoli biomeccanici, selezione sessuale e fecondità (Le Paire *et al.*, 2010; Sukhodolskaya 2014). La maggior parte di questi fattori può variare da un *habitat* a un altro, e influenzare così le dimensioni del corpo di una specie. Tuttavia, i meccanismi che sono alla base di una variazione del genotipo su un ampio intervallo di ambienti non sono completamente compresi. Ancor meno si sa sulla divergenza nell'espressione dei tratti morfologici a livello locale su scale geografiche, dove le risorse trofiche e la competizione trofica appaiono come fattori determinanti. Negli insetti olometaboli, e quindi nei Coleotteri Carabidi, la restrizione nella qualità e quantità della dieta larvale può portare ad un'alterata morfologia e forma fisica dell'adulto (Le Paire *et al.*, 2010).

DIMORFISMO SESSUALE

Le differenze tra i sessi nei caratteri morfologici sono un fenomeno comune in molti taxa di animali; la più evidente è la dimensione corporea. La direzione della differenza (se maschi o femmine sono più grandi) è diversa tra i vari gruppi (De La Fuente *et al.*, 2010). Negli insetti generalmente i maschi sono più piccoli delle femmine (Chown & Gaston, 2010; De La Fuente *et al.*, 2010), il che dà loro alcuni vantaggi adattivi come maggiore fecondità e miglior cure parentali (De La Fuente *et al.*, 2010). Lo schema opposto è relativamente raro, è conosciuto in specie come *Scatophaga stercoraria*, la mosca gialla dello sterco, e in *Stator limbatus*, una specie di coleottero appartenente alla famiglia dei Chrysomelidae. Secondo la regola di Rensch, all'interno di una stessa specie il dimorfismo sessuale aumenta quando i

maschi sono più grandi delle femmine, ma diminuisce quando le femmine sono più grandi dei maschi (De La Fuente *et al.*, 2010).

Uno studio condotto su *Stator limbatus* ha dimostrato che gli adulti di questa specie aumentano di dimensioni con l'aumentare della latitudine e all'aumentare della latitudine diminuisce il dimorfismo sessuale. Tale variazione è data dall'aumento della stagionalità e dall'aumento delle dimensioni dei semi di cui si nutrono, anche se sono necessari ulteriori lavori per comprendere l'interazione tra la variazione dimensionale latitudinale e la variazione dimensionale tra i sessi (Chown & Gaston, 2010).

ASIMMETRIA BILATERALE

La maggior parte degli animali ha almeno un piano di simmetria, alcune simmetrie morfologiche derivano dalla ripetizione di parti in diverse posizioni o orientamenti. La simmetria bilaterale può manifestarsi in due modi: come simmetria dell'oggetto o come simmetria corrispondente. Il primo caso si verifica ogni volta che una struttura è di per sé simmetrica e il piano di simmetria può dividere la struttura in due metà che sono immagini speculari l'una dell'altro. La simmetria corrispondente invece avviene ogni volta che la struttura è formata da una copia sinistra e una destra che possono essere abbinate, in quanto sono immagini speculari l'una dell'altra (Bravi & Benitez, 2013). È molto difficile trovare un vero organismo perfettamente simmetrico e le piccole asimmetrie possono riflettere adattamento fenotipico all'ambiente. Variazioni di asimmetria o fluttuazione asimmetrica (FA) in una popolazione possono indicare che gli individui hanno più difficoltà a mantenere uno sviluppo preciso, con conseguenti effetti negativi sulla popolazione nel tempo (Bravi & Benitez, 2013; De Anna *et al.* 2013), come l'impatto generato da vari aspetti ambientali (Garnier *et al.*, 2006), quindi più simmetrico è l'individuo, più avrebbe maggiori capacità di sopravvivere rispetto agli individui con bassi valori di simmetria. La FA è definita come le differenze individuali tra i lati sinistro e destro, tali deviazioni sono normalmente distribuite e hanno la media di zero (Bravi &

Benitez, 2013). L'asimmetria fluttuante (FA) è diventata un metodo popolare per misurare la risposta fenotipica allo stress ambientale. FA è definita come piccole deviazioni casuali di tratti bilaterali dalla perfetta simmetria dovuta a sottili variazioni nell'ambiente di sviluppo (Garnier *et al.*, 2006). Un ulteriore vantaggio di FA come biomarker include la relativa facilità di misurazione rispetto ad altri biomarcatori che richiedono attrezzature più costose (Beasley *et al.*, 2013).

Numerosi studi hanno evidenziato che l'asimmetria bilaterale può aumentare quando gli organismi si sviluppano in condizioni di stress. Per questo potrebbe fungere come un utile indicatore di cambiamenti ambientali causati in particolar modo da sostanze contaminanti (Swaddle *et al.*, 1994; Hoffmann *et al.*, 2005).

1.5.1 Effetti delle perturbazioni ambientali a livello morfometrico

Numerose attività antropogeniche, tra cui agricoltura, silvicoltura e urbanizzazione, hanno un significativo impatto sull'ambiente con la creazione di *patch* modificate (Magura *et al.*, 2006).

I cambiamenti morfologici e di simmetria bilaterale (asimmetria fluttuante), sono marcatori di esposizione ai disturbi ambientali, indicando che gli stadi pre-immaginali (larve e pupe) subiscono gli effetti sub-letali dell'esposizione a prodotti agrochimici (Hoffmann *et al.*, 2005). Molte sostanze interagiscono sui regolatori della crescita degli insetti interrompendo la muta, agendo quindi sull'ecdisone, e la formazione di cuticola, agendo come inibitori della chitina (Desneux *et al.*, 2007).

E' stato visto che adulti di *Apis mellifera*, derivanti da colonie sottoposte a residui di acetamipride, cipermetrina, endosulfan e profenofos, presentano alti valori di asimmetria fluttuante (FA) (Abaga *et al.*, 2011).

In uno studio condotto su *Calathus fuscipes* catturato in un campo di patate sull'altopiano Silano (Cosenza) trattato con lambda-cialotrina e cimoxanil, sono state riscontrate differenze morfometriche nella lunghezza delle elitre (Giglio *et al.*, 2017).

In un altro studio, condotto sulle comunità dei Carabidi lungo un gradiente urbano – rurale, dal centro della città di Amburgo verso le zone rurali fuori città, quattro specie di Carabidi hanno mostrato differenze nell'asimmetria fluttuante (FA) nei diversi siti campionati. La FA delle specie colpite negativamente dall'urbanizzazione aumentava verso il centro città e con crescente isolamento di un sito. Ciò corrispondeva alla previsione che FA indica la qualità dell'*habitat* (Weller & Ganzhorn, 2004).

Lungo un gradiente di urbanizzazione (città parco - area suburbana - rurale), che rappresenta un'intensità decrescente di perturbazioni ambientali, sono state riscontrate variazioni nelle dimensioni del corpo in 59 specie di Coleotteri Carabidi, e valori di asimmetria più alti nelle aree urbane rispetto alle periferie e alle zone rurali. Queste variazioni lungo un gradiente, sono correlate all'alterazione dell'*habitat* causato dall'urbanizzazione (Magura *et al.*, 2006).

In uno studio condotto per scoprire se la contaminazione del cibo con i metalli pesanti influisce sulla dimensione del corpo, sulle riserve energetiche e sull'instabilità dello sviluppo, esemplari di *Poecilus cupreus* sono stati nutriti, per tutto il loro ciclo vitale, con pupe di mosca contaminate da Cadmio e/o Zinco, e gli esemplari adulti di *P. cupreus* mostravano una riduzione delle dimensioni delle elitre, della tibia, e del femore, ma non è stato riscontrato alcun effetto sull'asimmetria fluttuante (FA). Questo indica che gli alimenti contaminati riflettono una riserva energetica più bassa che può influenzare la morfogenesi (Maryanski *et al.*, 2002).

In un campionamento effettuato dal 1996 al 2008 in diverse regioni della Russia, sono stati misurati sei tratti morfometrici (lunghezza e larghezza delle elitre, lunghezza e larghezza del pronoto, lunghezza del capo e distanza tra gli occhi) di circa 3000 esemplari di *Pterostichus malanarius*, e si è visto che i fattori ambientali, come il disturbo antropogenico, hanno contribuito, in modo significativo, alle dimensioni dei tratti morfometrici presi in esame (Sukhodolskaya, 2014).

CAPITOLO 2

MATERIALI E METODI

2.1 Siti di campionamento

I siti scelti per il campionamento erano collocati nell'aria agricola limitrofa al Parco Nazionale della Sila (bacino del Neto), all'interno di due aziende agricole, una a conduzione convenzionale e una a conduzione biologica o organica, che effettuano entrambe la rotazione annuale delle colture.

L'azienda convenzionale, Società Cooperativa Orti dei Monti, Azienda Torre Garga, si trova nel comune di San Giovanni in Fiore (CS), e produce ortaggi, patate, grano e fieno. L'area aziendale è attraversata da un fiume, il Garga, arginato da pioppi e ontani, è confinante con la strada statale 107, con un il sito di interesse comunitario *Domus Jure Vetere*, e con altri campi coltivati. I siti di campionamento individuati in questa azienda sono due (Fig. 9). Il primo sito (TG1; 39° 16' 54.08" N 16° 38' 52.02" E; 1236 m s.l.m) di 4,7866 ettari confina con la Strada statale 107 ed altri campi ed è stato coltivato a patate (Agraria IGP) nel 2017 e a grano nel 2018. Nel corso dei due anni di campionamento il campo è stato arato, fertilizzato (Tabella 1) e trattato con agrochimici (Tabella 2). Il secondo sito (TG2; 39° 16' 55.26" N 16° 38' 11.09" E; 1240 m s.l.m) di 10 ettari confina con bosco (*Domus Juri Vetere*), torrente Garga ed altri coltivi ed è stato lasciato ad inerbire per la produzione di fieno nel 2017 e coltivato a ortaggi nel 2018. Nel corso dei due anni di campionamento il campo è stato arato, fertilizzato (Tabella 3) e trattato con agrochimici (Tabella 4).

Gli erbicidi (Tabelle 2, 4) sono stati usati in pre-emergenza per il controllo delle infestanti quali graminacee e dicotiledoni (Song 70[®], Bismark[®], Sinis 70[®]) e per mono e dicotiledoni (Pendiwin[®]); e in post-emergenza per il controllo di graminacee e dicotiledoni (Stratos[®], U 46 fluid[®]); Gli insetticidi (Tabelle 2, 4) sono stati applicati in emergenza per il controllo di afidi (Karate zeon[®], Sparviero[®]), afidi e dorifora (Aphids[®], Contest[®]), e per spodopteri e nottuidi (Altacor[®]), il lumachidica (Tabella 4)

per il controllo delle lumache (Lumaplus[®]). I fungicidi (Tabelle 2,4) sono stati applicati in pre-emergenza per il controllo della peronospora della patata (Curzate 60[®] WD, Cabrio duo[®], Enervin duo[®], Volare[®], Pergado SC[®], poltiglia bordolese[®]), di *Botrytis cinerea* e *Sclerotinia sp.* (Zeolite cubana[®], Idrorame[®] 193, Swicth[®]).

L'azienda biologica "Macchia di Tuono", situata anch'essa nel comune di San Giovanni in Fiore (Cs) a 5 km di distanza in linea d'aria dalla prima, è un'azienda biologica certificata dove si coltivano patate, grano, e fieno, ed è circondata da bosco, pascoli e coltivi. In questa sono state individuate due stazioni di campionamento confinanti e separate da un canale naturale di scolo e da un sentiero interpoderale (Fig. 10). La prima di 6,18 ettari (MT1; 39° 17' 19.18" N 16° 42' 12.00" E; 1170 m s.l.m) è posta tra due strade interpoderali una delle quali in prossimità di un bosco (San Giovanni Cozzo Rocco) ad altri campi della stessa azienda. Nel 2017 il campo è stato coltivato a patate (Tabella 5) e trattato con agrochimici ammessi in agricoltura biologica (Tabella 6), mentre nel 2018 è stato coltivato a grano. I pesticidi sono stati usati in emergenza per il controllo di afidi (Afitin[®]) e per il controllo della dorifora (Laser[®]), i fungicidi per il controllo della peronospora della patata. Il secondo campo di 7 ettari (MT2; 39° 17' 25.35" N 16° 42' 15.87" E; 1170 m s.l.m) confina con un sentiero interpoderale (che lo separa da MT1) ed un bosco (San Giovanni Cozzo Felicetti) e durante i due anni di campionamento è stato lasciato inerbito e destinato alla produzione di fieno.

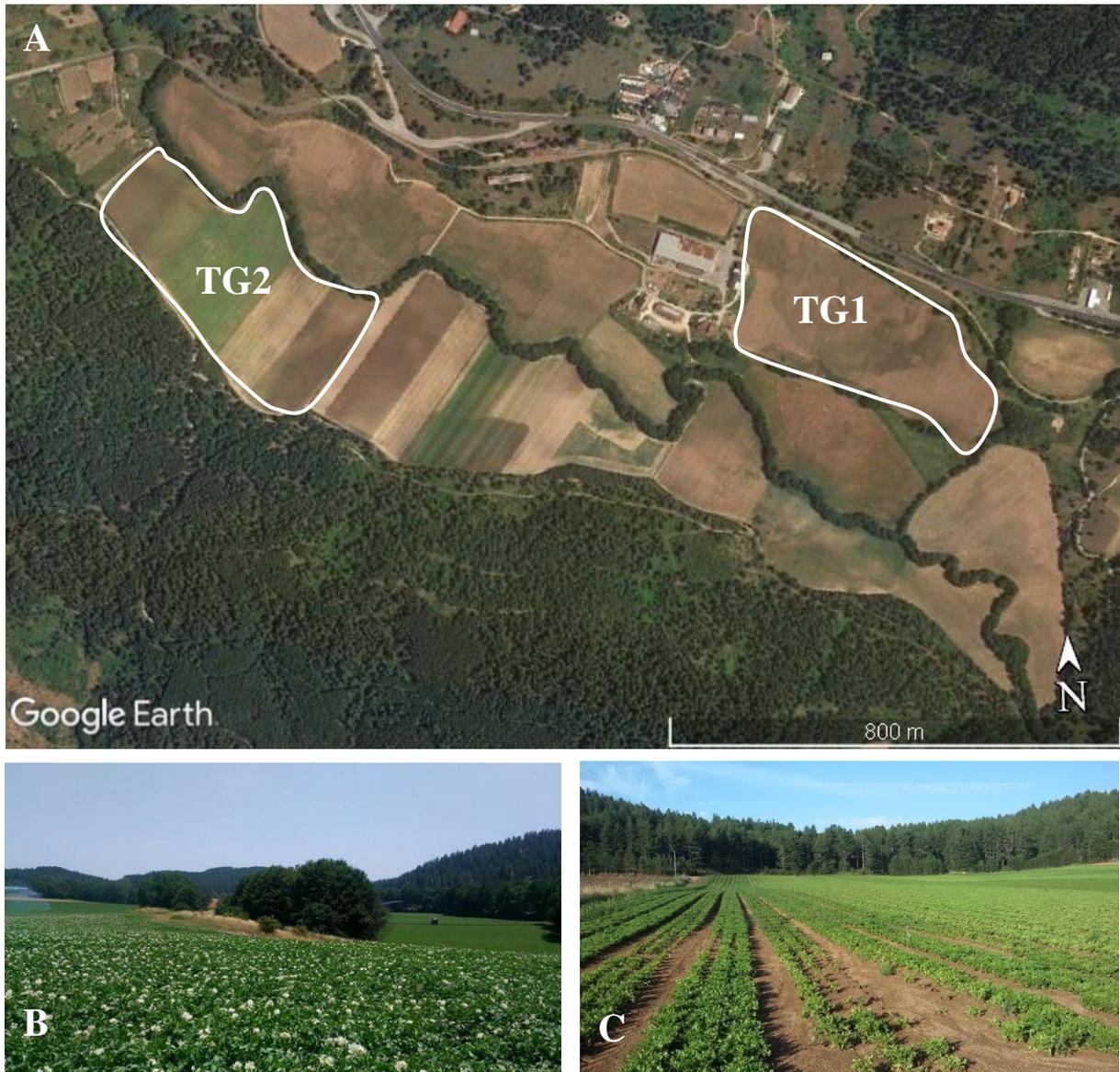


Fig. 9 – Azienda convenzionale Torre Garga; A: mappa dell'azienda, B: campo TG1, C: campo TG2.

Tabella 1. Coltivazioni e concimazioni effettuate nel campo TG1 nei due anni di campionamento.

Data	Operazione	Nome commerciale	Tipologia	Composizione	Quantità per ha
15/04/2017	aratura terreno				
16/05/2017	concimazione	Entec[®] perfect	Concime di fondo	N, P, K	12 q
		Entec[®] 0-12-26	Concime di copertura	N, P, K	4 q
	semina	Agria igp	patate		
19/06/2017	rincalzatura				
08/10/2017	raccolta				
18/10/2017	aratura				
20/10/2017	semina	Triticale	grano		
10/04/2018	Concimazione	Cosmo[®] N35	Concime di copertura	N	1,6 q
17/08/2018	mietitura				

Tabella 2. Trattamenti effettuati nel campo TG1 durante i due anni di campionamento.

Data	Nome commerciale (classe)	Tipologia	Principio attivo	Quantità per ha
03/04/2017	Song 70[®] Wdg (triazinoni)	erbicida	metribuzin 700g/kg	0,25 kg
	Bismark[®] (isossazoli; dinitroaniline)	erbicida	clomazone 55g/L; pendimetalin 275g/L	5 L
12/06/2017	Stratos[®] (cicloesanoni)	erbicida	cicloxidim 200g/L	2,50 L
01/07/2017	Aphids[®] (neonicotinoidi)	insetticida	imidacloprid 200g/L	1 L
	Etravon[®]	coadiuvante		0,5 L
	Curzate[®] 60 WD (acetammidi)	fungicida	cimoxanil 200g/kg	0,2 kg
	CabrioDuo[®] (morfoline; stroboline)	fungicida	dimetomorf 72g/L pyraclostrobin40g/L	2,50 L
11/07/2017	Zeolite cubana[®]	fungicida		3 kg
	Enervin Duo[®] (morfoline)	fungicida	ametocradin 300g/L dimetomorf 225g/L	1 L
	Curzate[®] 60WG (acetammidi)	fungicida	cimoxanil 200g/kg	0,2 kg
	Contest[®] (piretroidi)	insetticida	alfa-cipermetrina 145g/kg	0,25 kg
21/07/2017	Polt. Bord. Disp.	fungicida	rame 200g/kg	3 kg
	Contest[®] (piretroidi)	insetticida	alfa-cipermetrina 145g/kg	0,25 kg
	Volare[®] (benzammide; carbammati)	fungicida	fluopicolide 62,5g/L propamocarb idrocloruro 25g/L	1,50 L
01/08/2017	Etravon[®]	coadiuvante		0,50 L
	Curzate60[®] WG (acetammidi)	fungicida	cimoxanil 200g/kg	0,2 kg
	Planet C[®] (fenilammidi)	fungicida	metalaxil 42,2g/L rame 213g/L	5 L
11/08/2017	Etravon[®]	coadiuvante		0,50 L
	Polt. Bord. Disp.	fungicida	rame 200g/L	5 kg
16/04/2018	Pergado sc[®] (mandelammidi)	fungicida	mandipropamid 250g/L	0,60 L
	U 46 fluid[®] (acidi fenocarbossilici)	erbicida	acido 2,4- diclorofenossiacetico720g/L	0,80 L

Tabella 3. Coltivazioni e concimazioni effettuate nel campo TG2 nei due anni di campionamento

Data	Operazione	Nome commerciale	Tipologia	Composizione	Quantità per Ha
10/04/2018	aratura terreno				
17/05/2018	trapianto	Congo	Indivia liscia		
	concimazione	PG1 fluid[®]			1,50 L
		Solucat[®] 25.5.5	concime di copertura	N, P, K	25 kg
		Betabio[®]	concime di copertura	N, P, K	20 kg
		Kelpak[®]			3 kg
		NPK[®] 10.14.17	concime di copertura	N, P, K	5,50 kg
13/06/2018	concimazione	PG1 fluid[®]			1,50 L
		Solucat[®] 25.5.5	concime di copertura	N, P, K	25 kg
		Betabio[®]	concime di copertura	N, P, K	20 kg
		Kelpak[®]			3 kg
		NPK[®] 10.14.17	concime di copertura	N, P, K	5,50 kg
27/06/2018	concimazione	Razormir[®]	concime di copertura	N, P, K	240 kg
		Solucat[®] 25.5.5	concime di copertura	N, P, K	25 kg
		Betabio[®]	concime di copertura	N, P, K	18 kg
		Kelpak[®]			3 kg
		NPK[®] 10.14.17	concime di copertura	N, P, K	5,50 kg
07/07/2018	concimazione	Solucat[®] 25.5.5	concime di copertura	N, P, K	25 kg
		Vegetal[®] B60	concime di copertura	N	0,08 kg
		NPK[®] 10.14.17	concime di copertura	N, P, K	5,50 kg
11/07/2018	concimazione	Solucat[®] 25.5.5	concime di copertura	N, P, K	25 kg
		Betabio[®]	concime di copertura	N, P, K	20 kg
		Potassio liquido	concime di copertura	K ₂ O	2,8L
		NPK[®] 10.14.17	concime di copertura	N, P, K	5,50 kg
		Nitrato di magnesio	concime di copertura	N, MgO	20 kg
14/07/2018	concimazione	Solucat[®] 25.5.5	concime di copertura	N, P, K	25 kg
		Betabio[®]	concime di copertura	N, P, K	20 kg
		NPK[®] 10.14.17	concime di copertura	N, P, K	5,50 kg
		Nitrato di magnesio	concime di copertura	N, MgO	20 kg
16/07/2018	concimazione	Solucat[®] 25.5.5	concime di copertura	N, P, K	25 kg
		Betabio[®]	concime di copertura	N, P, K	20 kg
		NPK[®] 10.14.17	concime di copertura	N, P, K	5,50 kg
		Nitrato di magnesio	concime di copertura	N, MgO	20 kg
19/07/2018	raccolta				

Tabella 4. Trattamenti effettuati nel campo TG2 nei due anni di campionamento.

Data	Nome commerciale	Tipologia	Principio attivo	Quantità per Ha
14/05/2018	Pendiwin[®] (dinitroaniline)	erbicida	pendimetalin 400g/kg	3 L
	Sinis[®] 70 Df (triazinoni)	erbicida	metribuzin 700g/Kg	0,2 kg
15/06/2018	Lumaplus[®] (ossaciclottani)	lumachicida	metaldeide pura 49g/Kg	4 kg
30/06/2018	Karate Zeon[®] (piretroidi)	insetticida	lambda-cialotrina 100g/L	0,1 L
	Etravon[®]	coadiuvante		0,50 L
	Idrorame[®] 193	fungicida	solfoato tribasico di rame 193g/L	2,50 L
03/07/2018	Switch[®] (anilinopirimidine; finilpirroli)	fungicida	ciprodinil 375g/Kg fludioxonil 250g/Kg	0,6 kg
	Lumaplus[®] (ossaciclottani)	lumachicida	metaldeide pura 49g/Kg	4 kg
04/07/2018	Karate Zeon[®] (piretroidi)	insetticida	lambda-cialotrina 100g/L	0,15 L
	Altacor[®] (antronilammidi)	insetticida	chlorantraniliprole 350g/Kg	0,1 kg
16/07/2018	Lumaplus[®] (ossaciclottani)	lumachicida	metaldeide pura 49g/Kg	4 kg
18/07/2018	Etravon[®]	coadiuvante		0,50 L
	Sparviero[®] (piretroidi)	insetticida	lambda-cialotrina 95,3g/Kg	0,18 L
	Idrorame[®] 193	fungicida	solfoato tribasico di rame 193g/L	0,31 L
01/08/2018	Lumaplus[®] (ossaciclottani)	lumachicida	metaldeide pura 49g/Kg	4 kg
06/08/2018	Idrorame[®] 193	fungicida	solfoato tribasico di rame 193g/L	2 L

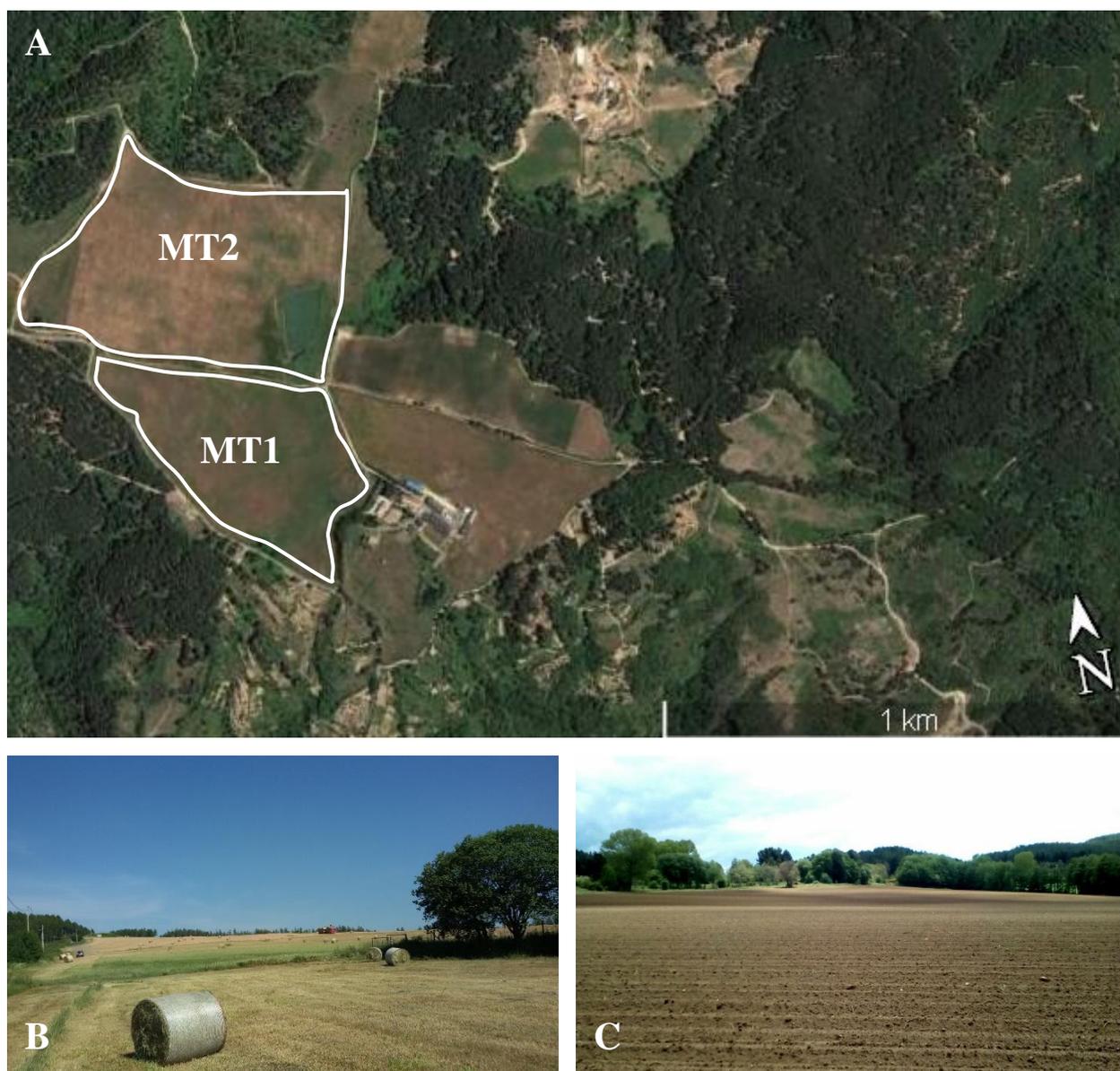


Fig. 10 – Azienda biologica Macchia di Tuono; A: mappa dell'azienda, B: campo MT1, C: campo MT2.

Tabella 5. Coltivazioni e concimazioni effettuate nel campo MT1 nei due anni di campionamento.

Data	Operazione	Nome commerciale	Tipologia	Composizione	Quantità per Ha
18/04/2017	aratura terreno				
02/05/2017	semina	Marabel ipp	patate		
02/05/2017	concimazione	Ricin-Xed[®]		N	900 kg
29/09/2017	raccolta				
02/10/2017	aratura				
5/10/2017	semina		grano		
3/07/2018	mietitura				

Tabella 6. Trattamenti effettuati nel campo MT1 durante i due anni di campionamento.

Data	Nome commerciale	Tipologia	Principio attivo	Quantità per ha
29/06/2017	Afitin L[®] (piretrine)	insetticida	piretrine 40g/L	6 L
01/07/2017	Cobre Nordox[®] 50	fungicida	ossido di rame 500g/Kg	9 kg
01/07/2017	Cobre Nordox[®] 50	fungicida	ossido di rame 500g/Kg	9 kg
	Laser[®] (spinosoidi)	insetticida	spinosad 480g/L	6 L

2.2 Raccolta campioni

Nel 2017 il campionamento si è svolto dai primi di Maggio ai primi di Luglio, e nel mese di Ottobre solo nelle stazioni TG1, e MT2 poiché nelle altre era in corso la lavorazione del terreno per l'ordinaria gestione agricola. Il campionamento non si è svolto durante i mesi estivi perché la forte siccità ha determinato una diminuzione dell'attività dei coleotteri. Nel 2018 il campionamento è iniziato i primi di Maggio ed è terminato agli inizi di Ottobre. La raccolta dei campioni è stata effettuata mediante pitfall traps in vivo (Fig. 11), costituite da bicchieri di plastica dal diametro di 9 cm e alte 11cm, interrate nel suolo. In ciascuna di esse veniva inserita uno stato di 2 cm di terra umida, della frutta marcescente come attrattivo ed accuratamente coperta con pietre. In ogni stazione di campionamento sono state poste 10 trappole che venivano svuotate settimanalmente. Gli animali, catturati vivi e divisi per campo, sono stati portati in laboratorio, smistati in modo da separare le specie da allevare dalle altre. Per lo studio della distribuzione delle specie e per gli studi di morfometria, i coleotteri sono stati uccisi in ghiaccio e conservati in etanolo al 70% in provette opportunamente siglate. I campioni, sono stati successivamente determinati mediante chiavi dicotomiche e contati. Numero di specie e numero di individui catturati in ogni campo separati per sesso, sono stati riportati in fogli excel predisposti per la compilazione della matrice dei dati raccolti.

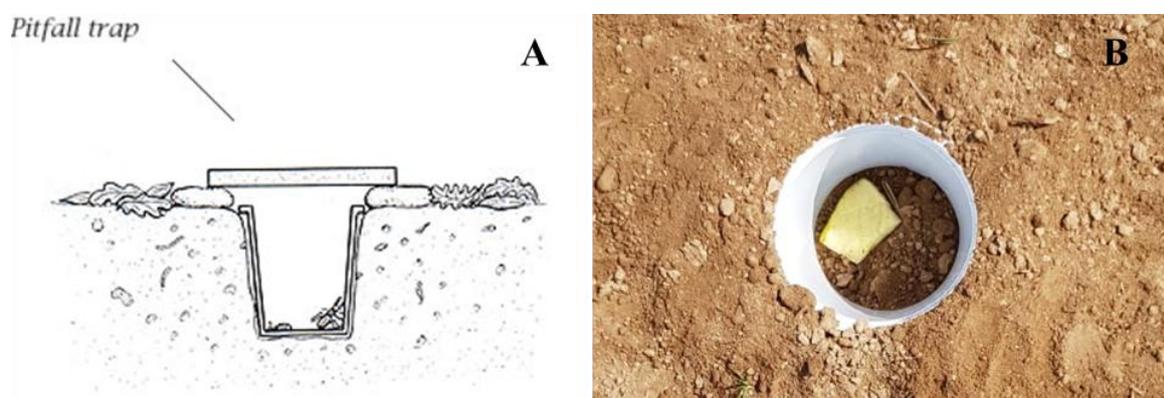


Fig. 11 – *Pitfall traps*. A: schema, B: *pitfall traps* attivata con della frutta in un campo monitorato.

2.3 Analisi della biodiversita'

Per stimare ed analizzare statisticamente il numero di individui e di specie raccolte per ogni campo in modo da ottenere informazioni qualitative e quantitative relative alla loro abbondanza nei campi campionati, i dati sono stati standardizzati valutando la densità di attività (**DA**) per ogni singola specie, calcolata dividendo il numero di individui catturati durante ogni periodo di raccolta per l'unità di sforzo (**us**).

$$\mathbf{DA} = \text{n. individui catturati} / \text{us}$$

Dove l'unità di sforzo (**us**) (Brandmayr & Zetto Brandmayr, 1987; Brandmayr *et al.*, 2005) normalizza i fattori di variabilità legati all'efficienza delle trappole ed al numero di giorni di campionamento in modo da rendere confrontabili raccolte fatte in anni diversi. **US** è stata calcolata come il numero delle trappole attive per il numero dei giorni di campionamento diviso 10 secondo la formula:

$$\mathbf{us} = \Sigma \text{n. trappole} \times (\text{giorni} / 10).$$

Sono stati inoltre valutati:

- 1) la Densità di Attività annua (**DAa**) per ogni singola specie, espressa come individui/trappola nel periodo standard di 10 g, calcolata dividendo il numero di individui catturati durante tutto il periodo di campionamento per la somma di tutte le unità di sforzo impiegate in quel sito di campionamento (Brandmayr *et al.*, 2005)

$$\mathbf{DAa} = \text{n.totale individui catturati} / \mathbf{US}$$

2) la dominanza (**DO**) per ogni singola specie, espressa in percentuale sul totale degli individui raccolti, data dalla sommatoria del rapporto tra il valore della densità di attività annua (DAa) di ciascuna specie e il valore di DAat complessivo di tutte le specie (Pizzolotto, 1993)

$$\mathbf{DO} = (DAa / \Sigma DAa) \times 100$$

I dati così ottenuti, sono riportati in tabelle, divise per campo e anno di campionamento, dove per ogni singola specie sono riportati anche i tratti ecologici.

2.3.1 Indici di similarità

Per quantificare le differenze tra le comunità dei siti campionati, i dati raccolti sono stati analizzati mediante l'indice di Sørensen e il coefficiente di Pearson per confrontare la similarità tra le comunità, e mediante l'indice di Rènyi per confrontare la diversità delle comunità.

I suddetti indici sono stati calcolati confrontando:

- le comunità dei campi con lo stesso coltivo ma a diversa conduzione organica e convenzionale

ANNO	CONFRONTO	COLTIVO
2017	MT1 vs TG1	patate
2017	MT2 vs TG2	erbaio
2018	MT1 vs TG1	grano

- la variazione delle comunità nel tempo dei due anni di campionamento nello stesso campo

CAMPO	CONFRONTO	CONDUZIONE
MT1	2017 VS 2018	organico
MT2	2017 VS 2018	organico
TG1	2017 VS 2018	convenzionale
TG2	2017 VS 2018	convenzionale

L'indice di Sørensen è stato calcolato mediante tabelle excell, correlazione di Pearson ed Indice di Rényi sono stati calcolati mediante il software statistico Rstudio versione 3.4.3.

2.3.1.a Coefficiente di correlazione di Pearson

Il coefficiente di Pearson viene utilizzato per misurare la similarità tra due comunità, calcolato in base alla densità di attività annua, è il coefficiente di correlazione di Pearson (ρ_{XY}) definito come la covarianza delle due comunità prese in esame diviso la loro deviazione standard (Sokal & Rohlf, 1981).

$$\rho_{XY} = \frac{\sigma_{xy}}{\sigma_x \sigma_y}$$

Dove:

σ_{xy} è la covarianza tra le due comunità prese in esame

σ_x è la deviazione standard della comunità X

σ_y è la deviazione standard della comunità Y

Se:

$\rho_{xy} > 0$ correlazione positiva

$\rho_{xy} = 0$ incorrelate

$\rho_{xy} < 0$ correlazione negativa

inoltre

$0 < |r_{xy}| < 0,3$ correlazione debole
 $0,3 < |r_{xy}| < 0,7$ correlazione moderata
 $|r_{xy}| > 0,7$ correlazione forte

2.3.1.b Indice di Sørensen

Il coefficiente di similarità di Sørensen (QS) è un quoziente qualitativo impiegato per misurare il livello di similarità tra due o più comunità (Hutchinson e Jones 1999), è stato calcolato su tabella excell mediante la seguente formula:

$$QS = \frac{2c \times 100}{a + b}$$

Dove:

A è il numero delle specie totali della prima comunità

B è il numero delle specie totali della seconda comunità

C è il numero delle specie in comune tra le comunità

2.3.1.c Indice di Rényi

Per confrontare statisticamente la diversità delle comunità dei campi monitorati, è stato eseguito, su base della densità di attività annua, l'indice di Rényi. L'indice di Rényi, **HR(a)**, è un indice di eterogeneità utilizzato per confrontare la diversità delle specie nelle comunità (Lövei *et al.*, 2013). Deriva dalla seguente formula:

$$HR(a) = \frac{1}{1-a} \log \sum_{i=1}^s p_i^a$$

2.4 Allevamento in laboratorio

Per effettuare le analisi enzimatiche e genotossiche, gli esemplari adulti di *Harpalus rufipes* (Fig. 12B) catturati come indicato in precedenza (par. 2.2), sono stati allevati in laboratorio in terrari di dimensioni variabili da (6-23 litri). Ciascun terrario è stato allestito con uno strato di circa 7cm di terreno proveniente dallo stesso luogo di cattura e delle pietre per fornire agli insetti un riparo sotto cui nascondersi (Fig. 12A). Gli animali, allocati nei terrari divisi per campo e data di cattura, sono stati nutriti *ad libitum* con carne tagliata a piccolissimi pezzi, semi di *Daucus carota* e frutta per fornire un apporto di acqua e zuccheri. Gli esemplari catturati nei campi organici MT1 e MT2 sono stati considerati come un'unica popolazione indicata nei test come la sigla MT, perché tali campi sono confinanti e non vi sono barriere naturali e/o artificiali che li dividano. I terrari, posti in condizioni di temperatura e fotoperiodo naturali, sono stati inumiditi regolarmente per mantenere un'umidità ottimale di circa 70%, e controllati ogni 2 giorni per verificare la vitalità dei coleotteri, per rimuovere il cibo non consumato e sostituirlo con quello fresco, in modo da evitare possibili muffe.



Fig. 12 – A: Terrari adibiti per l'allevamento di *H. rufipes* catturati nei vari siti campionati, B: adulti di *H. rufipes* in allevamento

2.5 Analisi enzimatiche

Al fine di individuare variazioni nella risposta immunitaria, causate dall'esposizione in campo ad agrochimici, utilizzati nei campi a conduzione convenzionale, le analisi enzimatiche sono state eseguite su adulti di *H. rufipes* catturati nel secondo anno di campionamento (2018), nel mese di Maggio nei campi TG1, e nel mese di Luglio nel campo TG2. Gli esemplari catturati nel campo MT sono stati usati come controllo. I coleotteri dopo la cattura, sono stati allevati in laboratorio come indicato nel paragrafo 2.4.

2.5.1 Prelievo emolinfa

Per le analisi enzimatiche, un pool di 10 μL di emolinfa è stato prelevato da 3 esemplari adulti di *H. rufipes*. Il prelievo è stato eseguito pungendo i coleotteri con un ago sterile di 0,29 mm di diametro nella porzione ventrale dell'articolazione pro-meso toracica. Per ogni individuo sono stati prelevati 3,3 μL di emolinfa (in modo da non comprometterne la sopravvivenza) mediante una pipetta automatica con puntale sterile. L'emolinfa di ciascun esemplare è stata raccolta in provette eppendorf da 1.5 mL contenenti 90 μL di PBS sterile (tampono fosfato 0.01M ph 7.4 a 25 °C) a 4 °C e centrifugata a 5000 rpm per 5 minuti in modo da separare il siero dagli emociti. Il sopranatante è stato rimosso, posto in provette eppendorf sterili da 1.5 mL e conservato a -20 °C. Gli esemplari dopo essere stati punti per il prelievo, sono stati addormentati in ghiaccio e conservati in alcool a 70° al fine di essere utilizzati per le analisi morfometriche.

2.5.2 Attività basale e totale dell'enzima fenolossidasi (PO)

L'attività basale e totale dell'enzima PO nell'emolinfa di *H. rufipes* è stata misurata mediante un metodo colorimetrico come la formazione di dopacrome da 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine in una quantità nota di emolinfa. Tale componente,

interagendo con l'emolinfa, attiva la formazione di melanina facendo virare la colorazione della soluzione ottenuta verso il nero. La fenolossidasi basale (PO) indica l'enzima attivo in circolo nell'emolinfa dell'insetto, mentre la PO totale corrisponde alla quantità di enzima attivo, più il suo proenzima attivabile (Brivio *et al.*, 1996; Zufelato *et al.*, 2004).

Il protocollo usato per misurare la quantità di questo enzima è riportato di seguito.

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

- 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (Sigma, L-DOPA)
L-DOPA non è solubile in acqua, quindi si discioglie in un piccolo volume di acetone e si porta a volume con il tampone fosfato (4mg in 1 mL di PBS).
- α -chimotripsina di pancreas di bovino (5mg in 1 mL di PBS)

FENOLOSSIDASI BASALE (PO)

- 10 μ L di sopranatante (composto da emolinfa diluita in PBS stabilizzata a 4 °C) sono stati posti in doppio nei pozzetti di una micropiastra;
- ad ogni pozzetto della micropiastra sono stati aggiunti 90 μ L di L_DOPA in PBS a temperatura ambiente.

FENOLOSSIDASI TOTALE (PROPO)

- 10 μ L di sopranatante sono stati posti in doppio nei pozzetti di una micropiastra;
- ad ogni pozzetto della micropiastra sono stati aggiunti 5 μ L di α -chimotripsina e incubati per 5 minuti a temperatura ambiente, in modo da attivare il proenzima presente nell'emolinfa.
- In seguito, ad ogni pozzetto della micropiastra, sono stati aggiunti 85 μ L di L_DOPA in PBS a temperatura ambiente.

REGISTRAZIONE DELL'ATTIVITA' ENZIMATICA

Mediante un lettore di micropiastre (SIRIO S, SEAC), è stato registrato l'incremento

lineare in assorbanza a 492 nm per un periodo di 30 minuti ad intervalli di 1 minuto. L'attività enzimatica è espressa come Assorbanza/min/ μ L, ed è stato considerato solo l'intervallo in cui la retta mostrava una crescita lineare.

2.5.3 Attività litica dell'emolinfa

L'analisi dell'attività litica dell'emolinfa, si basa su un metodo turbimetrico che consiste nel mettere a contatto una quantità nota di emolinfa con una soluzione contenente un batterio Gram + come *Micrococcus luteus* (DSM 1615), e misurare la riduzione di torbidità della soluzione nel tempo dovuta all'azione litica degli enzimi presenti nell'emolinfa.

Per misurare l'attività litica del lisozima presente nell'emolinfa di *H. rufipes*, è stato eseguito il protocollo riportato di seguito.

ALLESTIMENTO COLTURE BATTERICHE

Culture di *M. luteus* sono state allestite in laboratorio in provette contenenti brodo nutriente con la seguente composizione per 1 litro di terreno (pH $7,2 \pm 0,2$ a 25°C):

- Triptone 10,0 g
- Estratto di carne 5,0 g
- Sodio cloruro 5,0 g

Le sospensioni sono state centrifugate a 10000 rpm per 5 minuti a 4°C ed il pellet risospeso mediante PBS fino al raggiungimento di una concentrazione corrispondente ad una assorbanza compresa tra 0,3 e 0,5nm.

ALLESTIMENTO CURVA STANDARD

Una curva standard è stata preparata a concentrazioni note decrescenti di lisozima.

Per preparare la curva standard è stato utilizzato il seguente protocollo:

- Sono state preparate soluzioni decrescenti 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001, 0,0001 mg/mL di lisozima (Sigma) in PBS sterile a 4°C ;
- 10 μ L di ciascuna soluzione sopra citata sono stati posti in triplo in una

micropiastra;

- ad ogni pozzetto della micropiastra sono stati aggiunti 90 μL di soluzione batterica in PBS a temperatura ambiente;
- la densità ottica di ogni pozzetto è stata misurata a 450 nm mediante un lettore di micro piastre (Sirio S, SEAC) ad intervalli di 1 minuto per un tempo di 30 minuti.

ANALISI CAMPIONI

Per misurare l'attività litica degli enzimi presenti nell'emolinfa, è stato eseguito il seguente protocollo:

- 10 μL di sopranatante (composto da emolinfa diluita in PBS stabilizzata a 4 °C) sono stati posti in doppio nei pozzetti di una micropiastra;
- ad ogni pozzetto della micropiastra sono stati aggiunti 90 μL di sospensione batterica in PBS a temperatura ambiente;
- la densità ottica di ogni pozzetto è stata misurata a 450 nm mediante un lettore di micro piastre (Sirio S, SEAC) ad intervalli di 1 minuto per un tempo di 30 minuti.

L'attività enzimatica è stata espressa come assorbanza/ μL ed è stato considerato solo l'intervallo in cui la retta mostrava una decrescita lineare. Per ciascun gruppo sono stati caricati sulla piastra i campioni e la corrispondente curva standard.

2.5.4 Elaborazione dati

Tutti i valori di assorbanza, registrati per ogni campione, sono stati riportati come media \pm errore standard. L'attività enzimatica è stata riportata come variazione dell'assorbanza (assorbanza rispetto al tempo) della curva di reazione durante la fase lineare della reazione. La pendenza della curva di reazione, alla velocità massima, è stata tracciata come assorbanza per μL di emolinfa al minuto. Per il confronto dell'attività basale e totale dell'enzima PO e dell'attività litica dell'emolinfa tra i vari campioni catturati nei vari siti, poiché i dati analizzati non erano normalmente

distribuiti, è stato utilizzato il test statistico non parametrico Wilcoxon rank sum test (p-value <0.05) con le correzioni di Bonferroni per le comparazioni multiple.

2.6 Analisi genotossiche

Per valutare gli effetti genotossici dei trattamenti utilizzati nella primavera del 2017 nel campo convenzionale TG1, è stato eseguito il Comet Assay su coleotteri appartenenti alla specie *H. rufipes* catturati la fine di Maggio del 2017 nel campo (TG1) circa 8 settimane dopo il trattamento con erbicidi Song 70® wdg (metribuzina), e Bismark® (clomazone e pendimethalin), la fine di Giugno solo nel campo convenzionale TG1 (circa 12 settimane dopo il trattamento con Song 70® wdg (metribuzina), Bismark® (clomazone e pendimethalin), e 20 giorni dopo il trattamento con Statos® (ciclofidim)). Gli esemplari provenienti dal campo organico MT sono stati usati come controllo. I coleotteri, dopo la cattura, sono stati acclimatati in laboratorio su terreno proveniente dal luogo di cattura come descritto in precedenza (par 2.4).

Il Comet assay è stato eseguito utilizzando il Kit 42510 - 050 - K CometAssay® Silver (Trevigen®) seguendo il protocollo riportato di seguito.

PRELIEVO EMOCITI

Gli adulti di *H. rufipes* sono stati anestetizzati in ghiaccio e punti con un ago sterile di 0,29 mm di diametro nella porzione ventrale dell'articolazione pro-meso toracica. Da ogni esemplare sono stati raccolti i primi 4 µL di emolinfa e trasferiti immediatamente in una provetta Eppendorf da 1,5 mL contenente 50 µL di PBS freddo (tampone fosfato 0.01M ph 7.4 a 25 °C). Un pool di emolinfa di due esemplari è stato centrifugato a 2000 rpm per 5 minuti e a 4°C, il sopranatante è stato rimosso e alle cellule sono stati aggiunti 400 µL di LMPA (low-melting point agarose) 1% a 40°C e a bagnomaria. Dopo aver miscelato delicatamente la soluzione, la sospensione cellulare è stata trasferita in doppio su un vetrino pretrattato con NMPA (normal-melting point agarose) 1,5% e i vetrini posti orizzontalmente a 4°C per 20 minuti.

LISI CELLULARE

Dopo la solidificazione dell'agar, i vetrini sono stati posti in soluzione di lisi fredda

nella camera per vetrini per circa 4 ore ad una temperatura di 4°C. In seguito sono stati lavati 3 volte in acqua distillata fredda per 5 minuti in modo da rimuovere i sali della soluzione di lisi.

NEUTRALIZZAZIONE

I vetrini sono stati immersi per 20 minuti, e a 4°C in una soluzione alcalina preparata come di seguito:

- dose per 150 mL

0.18g NaOH 45mM

750 EDTA 200 mM

149.25mL acqua distillata

e lavati 2 volte per 5 minuti in soluzione elettroforetica fredda TBE 1X

SROTOLAMENTO DNA E CORSA ELETTROFORETICA

I vetrini sono stati posti in una camera elettroforetica orizzontale contenente buffer elettroforetico freddo (TBE 1X) con la parte terminale verso l'anodo (+) della camera, e lasciati riposare per 20 minuti. L'elettroforesi è stata condotta nello stesso buffer per 20 minuti con un potenziale elettrico di 12 volt (1 V cm⁻¹) e un'intensità di corrente di 300mA. Dopo l'elettroforesi i vetrini sono stati lavati in acqua distillata per 5 minuti in modo da rimuovere i residui di buffer, immersi in etanolo al 70% per altri 5 minuti, e lasciati asciugare in posizione orizzontale per 48 ore. Il buffer è stato preparato mediante il seguente protocollo:

- Soluzione elettroforetica madre di TBE 10X

108 g tris base

55 g acido bórico

9.3 g EDTA

900 mL acqua distillata

Aggiustare il volume ad 1L, autoclavare e conservare in frigo. Prima di ogni corsa diluire TBE da 10X a 1X con acqua distillata e mantenere a 4°C.

COLORAZIONE

Ogni campione è stato coperto con 100 µL di soluzione fissativa (preparata come di seguito) e lasciati incubare per 20 minuti

- dose per 10 campioni

100 µL fixation additive

300 µL acqua distillata

500 µL metanolo

100 µL acido acetico glaciale

In seguito i vetrini sono stati lavati in acqua distillata per 30 minuti, l'area di ogni campione è stata colorata con 100 µL di soluzione colorante (preparata come di seguito) e lasciati incubare per 15 minuti.

- dose per 10 campioni

350 µL acqua distillata

50 µL colorante R1

50 µL colorante R2

50 µL colorante R3

500 µL colorante R4

La reazione di colorazione è stata bloccata coprendo l'area del campione con 100 µL di acido acetico al 5% per 15 minuti, in seguito i vetrini sono stati lavati in acqua distillata per 5 minuti e conservati al buio.

I vetrini (Fig. 14) sono stati analizzati mediante un microscopio ottico a campo chiaro (Zeiss Primo Star) ad un ingrandimento 400x. Le immagini sono state acquisite mediante una fotocamera digitale (MU USB2.0 Camera with AmScope software for Windows) e analizzate con il software Come Score Pro (Fig. 13). Per quantificare il danno a livello di DNA, sono state prese in considerazione 3 misure; a) Tail DNA%,

definito come la percentuale di DNA nella coda della cometa, b) Tail moment, definito come il tempo di lunghezza della coda, c) Olive moment, definito come il prodotto del tail DNA% e la distanza tra i centroidi di intensità della testa e della coda. Tail moment e olive moment sono misure arbitrarie, che possono variare da un sistema di acquisizione di immagine ad un altro, mentre tail DNA% è il principale parametro usato poichè è facilmente comparabile (Glei *et al.*, 2016; Gyori *et al.*, 2014). Per ogni vetrino sono state escluse le cellule con un danno superiore al 40%, che rappresentato cellule morte in apoptosi (Singh, 2000) e sono state analizzate 50 cellule selezionate in maniera random. In totale sono stati analizzati 32 vetrini, 12 vetrini con cellule di *H. rufipes* catturati nel campo convenzionale il mese di Maggio, 12 il mese di Giugno, e 8 con cellule di *H. rufipes* catturati nel campo organico il mese di Maggio.

2.6.1 Elaborazione dati

I dati sono stati espressi come media \pm errore standard. Per confrontare i livelli di danno tra i due campi e tra i due mesi presi in considerazione, sono stati eseguiti i test statistici non parametrici quali Kruskal Wallis e Wilcoxon rank sum test (p -value <0.05) con le correzioni di Bonferroni per le comparazioni multiple. Le analisi statistiche sono state eseguite mediante il software R-studio versione 1.1.442 (R Development Core Team 2017).

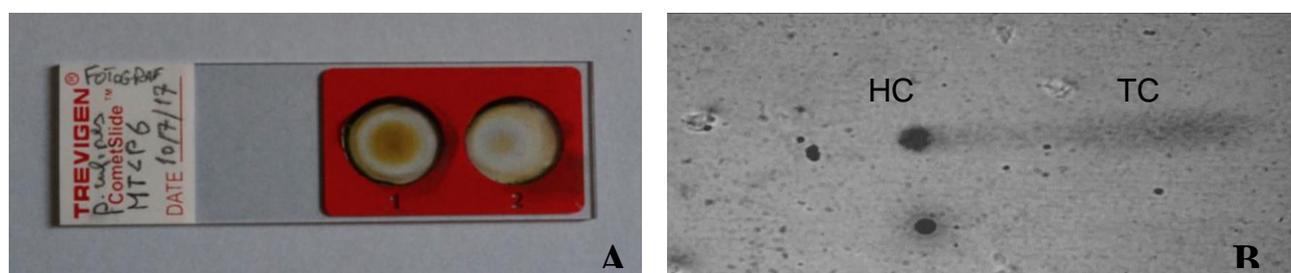


Fig. 13 – A: Vetrino sul quale sono state poste cellule di *H. rufipes* incluse in low-melting point agarose 1%; B: Cellule di *H. rufipes* fotografata al microscopio ottico a campo chiaro a 400X. È ben visibile la testa (HC) e la coda (TC) della cometa.

2.7 Analisi morfometriche

Le analisi morfometriche sono state eseguite su esemplari di *H. rufipes* catturati nel corso dei due anni di campionamento, e conservati in etanolo 70%, al fine di individuare eventuali variazioni morfologiche dovute all'uso degli agrochimici. Gli esemplari, divisi per sesso e per luogo di cattura, sono stati fotografati mediante uno stereomicroscopio (Zeiss Stemi SV 11Apo) e le immagini acquisite mediante il software Matrox PC-VCR (Windows 2000). Per ogni individuo è stata misurata la lunghezza del corpo (mm), la lunghezza e larghezza del capo (mm), la distanza inter oculare (mm), la lunghezza e larghezza del pronoto (mm), e la lunghezza e larghezza dell'elitra (mm) (Fig. 14 A,B,C,D). L'indice di asimmetria delle elitre, o fluttuazione asimmetrica (FA), è stato calcolato come il valore assoluto della differenza fra l'elitra destra e l'elitra sinistra ($|L-R|$), sia per la lunghezza che per la larghezza (Fig. 14 E) (Palmer, 1996). Tutte le misure sono state effettuate mediante il software Sigma Scan Pro 5 (SPSS®Inc.).

2.7.1 Elaborazione dati

I dati sono stati espressi come media \pm errore standard. Poiché non hanno mostrato una distribuzione normale e un'omogeneità della varianza, il dimorfismo sessuale è stato testato usando il test di Wilcoxon, le differenze morfologiche tra i vari siti campionati e tra i due anni di campionamento in ogni singolo sito, sono state testate mediante il test di Kruskal-Wallis, mentre per testare la fluttuazione asimmetrica, è stato effettuato il test di Levene (Palmer, 1996). Le analisi statistiche sono state eseguite mediante il software R-studio versione 1.1.442 (R Development Core Team 2017).

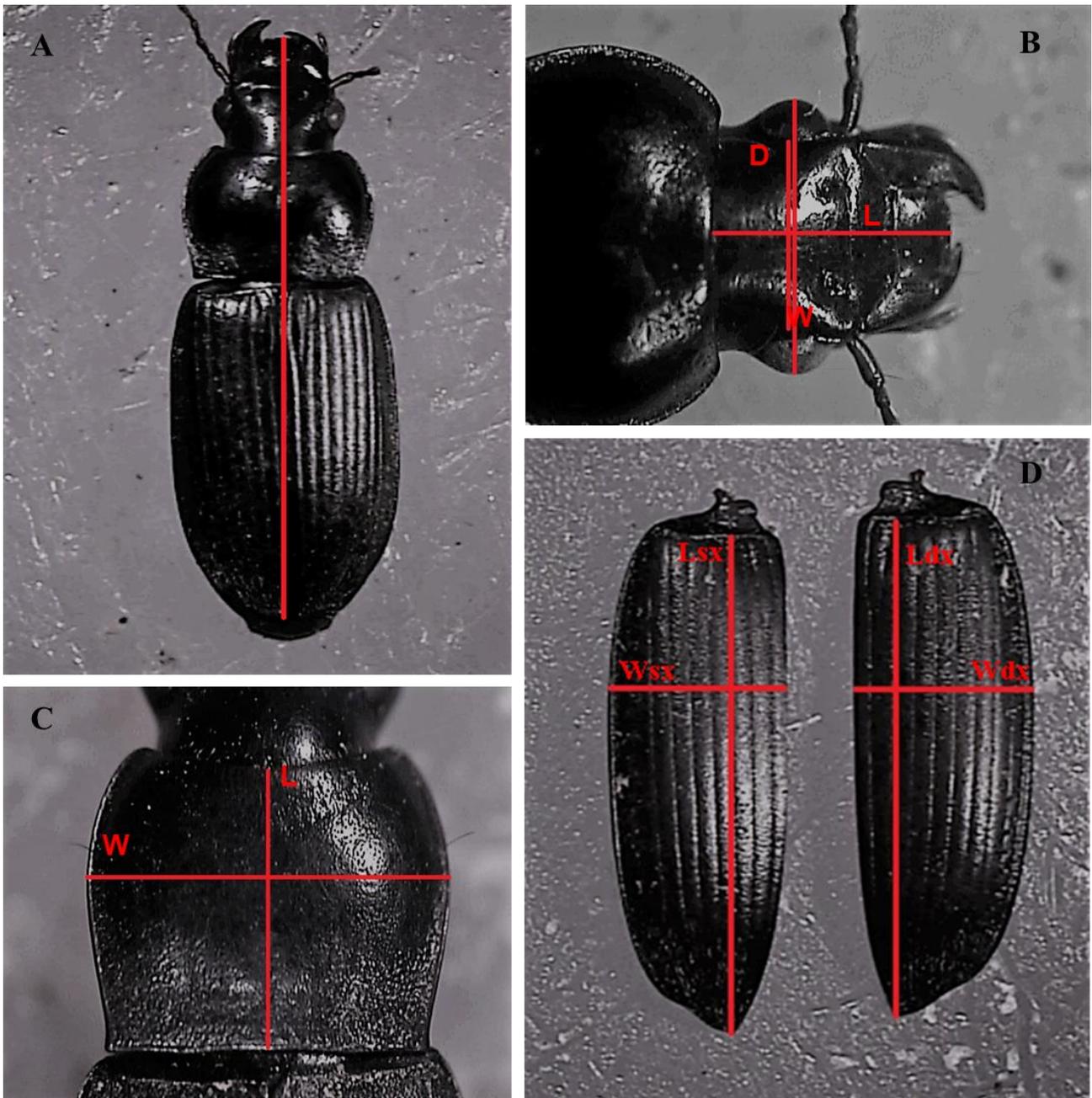


Fig. 14 – A: *H. rufipes* (80x). La lunghezza (L) del corpo è stata misurata dal *labrum* fino alla porzione terminale delle elitre; B: capo (200x); C: pronoto (200x); D: Elitre destra (dx) e sinistra (sx)(100x) per confrontare la differenza di asimmetria. Per testare la differenza della lunghezza e larghezza delle elitre tra i vari gruppi, è stata presa in considerazione l’elitra destra.

L: lunghezza; W: larghezza; D distanza inter oculare.

CAPITOLO 3

RISULTATI

3.1 Comunità dei Coleotteri Carabidi nei campi agricoli

Nel corso dei due anni di campionamento, sono stati catturati 4338 individui appartenenti a 43 specie diverse (Fig. 15). Dominanza (DO) e densità di attività totale (DAaT) sono riportate in tabella 7, insieme ai tratti ecologici di ogni singola specie.

La specie dominante è *Harpalus (Pseudoophonus) rufipes* (Do = 40,30%), con una densità di attività totale di 15,51, un onnivoro legato ad ambienti misti (tabelle 8 e 9).

Nel primo anno di campionamento nel campo organico MT1 la specie dominante è *Harpalus serripes* (DO = 35,61%), un onnivoro che predilige gli ambienti aperti, con una densità di attività annua di 3,26. Le specie esclusive, pure legate ad ambienti aperti, sono: *Harpalus anxius* (DAa= 0,17) un onnivoro, *Leistus cimmerius* (DAa= 0,02), un predatore generalista e *Leistus fulvibarbis* (DAa= 0,02), un predatore specialista. Nel campo organico MT2 la specie dominante è *Harpalus decipiens* (DO = 47,22%) un onnivoro legato anch'esso ad ambienti aperti, con una densità di attività annua di 4,30. Tra le specie esclusive troviamo onnivori legati a spazi aperti: *Amara fulvipes* (DAa= 0,02), *Harpalus attenuatus* (DAa= 0,02) e *Harpalus rubripes* (DAa= 0,02), e due predatori generalisti, uno legato a spazi aperti, *Microlestes fulvibarbis* (DAa= 0,02); e l'altro legato ad ambienti misti, *Synuchus vivalis* (DAa= 0,02).

Nel secondo anno di campionamento (tabelle 8 e 9) la specie dominante è *Poecilus cupreus* in entrambi i campi a conduzione organica (MT1 DO = 45,01%; DAa = 6,81 - MT2 DO = 32,20%; DAa = 2,10), le specie esclusive per il campo MT1 sono: *Abax parallelepipedus* (DAa= 0,01), un predatore generalista legato ad ambienti forestali, *Chlaenius chrysocephalus* (DAa= 0,01) e *Syntomus impressus* (DAa= 0,01), due predatori generalisti di spazi aperti, *Metallina lampros* (DAa= 0,02), un predatore generalista di ambienti misti, e *Ophonus puncticeps* (DAa= 0,01), un granivoro di

ambienti pascolivi; mentre per il campo MT2 le specie esclusive sono: *Amara fulvipipes* (DAa= 0,03), un onnivoro di ambienti aperti, e *Nebria kratteri* (DAa= 0,01), un predatore generalista legato ad ambienti forestali. Nei campi a conduzione convenzionale invece, la specie dominante è *Harpalus (Pseudoophonus) rufipes* in tutti e due i campi, sia nel primo (TG1 DO = 80,97%; DAa = 3,44 - TG2 DO = 35,34%; DAa= 3,45) che nel secondo anno di campionamento (TG1 DO = 85,96%; daa = 9,01 - TG2 DO = 81,77%; DAa = 10,19). Per il primo anno di campionamento le specie esclusive per il campo TG1 sono *Calathus montivagus* (DAa= 0,02) e *Carabus convexus* (DAa= 0,02), due predatori generalisti, il primo legato ad ambienti forestali e il secondo ad ambienti misti; nel campo TG2 invece come specie esclusive troviamo quattro specie legate a spazi aperti, *Harpalus affinis* (DAa= 0,02) e *Harpalus rufipalpis* (DAa= 0,91) che sono onnivori, *Ophonus cribricollis* (DAa= 0,02) un granivoro, *Syntomus impressus* (DAa= 0,04) un predatore generalista; e un predatore generalista legato ad ambienti forestali, *Platyderus neapolitanus* (DAa= 0,02). Le specie esclusive del secondo anno di campionamento sono nel campo TG1: *Harpalus attenuatus* (DAa= 0,01), un onnivoro di spazi aperti, e *Pterosichus (Plasma) niger* (DAa= 0,01), un predatore generalista di spazi misti. Nel campo TG2 invece come specie esclusive troviamo: *Amara sicula* (DAa= 0,02), e *Diachromus germanus* (DAa= 0,04), entrambi onnivori e legati ad ambienti forestali.

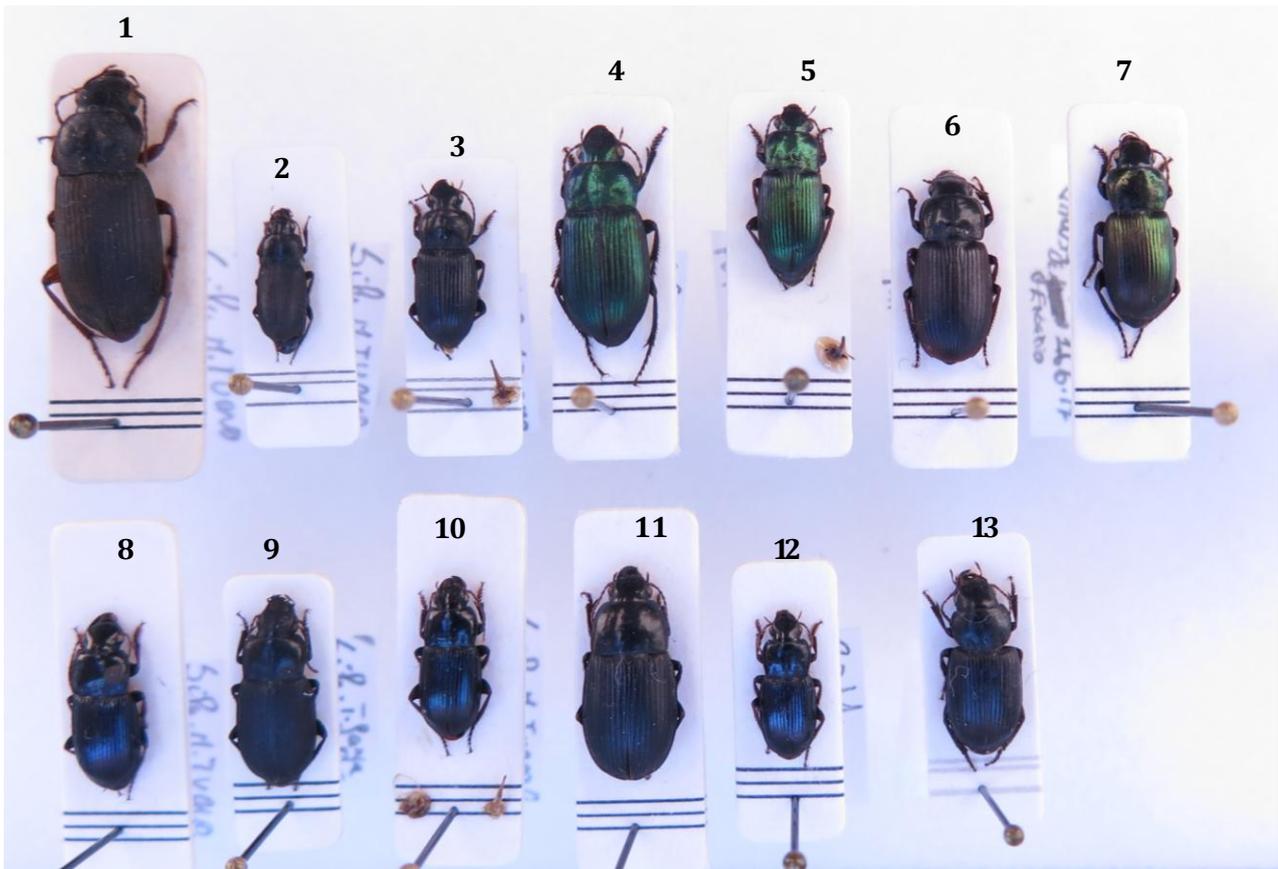


Fig. 15 – Alcune delle specie di Harpalini catturate nei due anni di campionamento: *H. rufipes* (1), *H. anxius* (2), *H. attenuatus* (3), *H. cupreus* (4), *H. distinguendus* (5), *H. oblitus* (6), *H. affinis* (7), *H. rubripes* (8), *H. rufipalpis* (9), *H. decipiens* (10), *H. serripes* (11), *H. sulphuripes* (12), *P. scaritides*(13).

Tabella 7 – Densità di attività annua totale (**DAat**) e dominanza (**DO**) delle specie catturate durante i due anni di campionamento. Tratti ecologici (**I** lunghezza: (1) ≤ 5 mm; (2) $> 5 \geq 10$ mm; (3) $> 10 \geq 15$ mm; (4) $> 15 \geq 20$ mm; (5) $> 20 \geq 25$ mm; (6) $> 25 \geq 30$ mm; (7) > 30 mm. **II** dieta adulto: (1) predatore specialista, (2) predatore generalista; (3) granivoro, (4) onnivoro. **III** morfologia alare: (1) brachittero, (2) dimorfico, (3) macrottero. **IV** corologia: (1) endemico Calabria, (2) endemico Italia, (3) europeo, (4) mediterraneo, (5) euroasiatico, (6) paleartico. **V** habitat: (1) foreste, (2) generalista, (3) spazi aperti.

SPECIE	TRATTI ECOLOGICI					DAaT	DO
	I	II	III	IV	V		
<i>Abax parallelepipedus curtulus</i> Fairmaire, 1856	4	1	1	3	1	0,01	0,02%
<i>Agonium (Punctagonium) viridicuperum</i> (Goeze, 1777)	3	2	3	4	3	0,13	0,34%
<i>Amara aenea</i> (De Geer, 1774)	2	4	3	6	3	1,24	3,23%
<i>Amara apricaria</i> (Paykull, 1790)	2	4	3	6	3	0,92	2,39%
<i>Amara fulvipes</i> (Audinet-Serville, 1821)	3	4	3	3	3	0,02	0,06%
<i>Amara sicula</i> Dejean, 1831	2	4	1	2	3	0,01	0,03%
<i>Anchomenus dorsalis</i> (Pontoppidan, 1763)	2	4	3	6	2	0,04	0,10%
<i>Brachinus explodens</i> (Duftschmid, 1812)	2	2	3	5	3	1,81	4,70%
<i>Brachinus sclopeta</i> (Fabricius, 1792)	2	2	3	4	3	0,08	0,20%
<i>Calathus cinctus</i> Motschulsky, 1850	2	2	1	6	3	0,60	1,55%
<i>Calathus fuscipes</i> (Goeze, 1777)	3	2	2	4	2	2,18	5,66%
<i>Calathus montivagus</i> Dejean, 1831	2	2	1	2	1	0,01	0,02%
<i>Carabus convexus convexus</i> Fabricius, 1775	4	2	1	5	2	0,01	0,02%
<i>Chlaenius chrysocephalus</i> (P. Rossi, 1790)	2	2	3	4	3	0,01	0,02%
<i>Diachromus germanus</i> (Linné, 1758)	2	4	3	5	3	0,02	0,05%
<i>Harpalus affinis</i> (Schrank, 1781)	2	4	3	5	3	0,01	0,03%
<i>Harpalus anxius</i> (Duftschmid, 1812)	2	4	2	6	3	0,10	0,26%
<i>Harpalus attenuatus</i> Stephens, 1828	2	4	3	4	3	0,01	0,04%
<i>Harpalus cupreus</i> Dejean, 1829	3	4	3	3	3	0,21	0,55%
<i>Harpalus decipiens</i> Dejean, 1829	2	4	3	3	3	3,88	10,08%

<i>Harpalus distinguendus</i> (Duftschmid, 1812)	2	4	3	3	2	1,75	4,56%
<i>Harpalus oblitus oblitus</i> Dejean, 1829	3	4	3	5	3	0,03	0,09%
<i>Harpalus (Pseudoophonus) rufipes</i> (De Geer, 1774)	3	4	3	6	2	15,51	40,30%
<i>Harpalus rubripes</i> (Duftschmid, 1812)	2	4	3	5	3	0,05	0,12%
<i>Harpalus rufipalpis</i> Sturm, 1818	2	4	2	5	3	1,03	2,69%
<i>Harpalus serripes</i> (Quensel in Schönherr, 1806)	3	4	3	6	3	1,37	3,56%
<i>Harpalus sulphuripes sulphuripes</i> Germar, 1824	2	4	2	4	3	0,59	1,53%
<i>Laemostenus cimmerius</i> (Fischer von Waldheim, 1823)	4	2	1	3	3	0,01	0,02%
<i>Leistus fulvibarbis</i> Dejean, 1826	2	1	3	5	3	0,01	0,02%
<i>Metallina lampros</i> (Herbst, 1784)	1	2	2	6	2	0,01	0,03%
<i>Microlestes fulvibasis</i> (Reitter, 1901)	1	2	3	5	3	0,01	0,02%
<i>Nebria brevicollis</i> (Fabricius, 1792)	3	2	3	5	2	0,03	0,07%
<i>Nebria kratteri</i> Dejean & Boisduval, 1830	4	2	1	3	1	0,01	0,02%
<i>Ophonus cribricollis</i> (Dejean, 1829)	2	3	3	5	3	0,01	0,03%
<i>Ophonus puncticeps</i> Stephens, 1828	2	3	3	5	3	0,01	0,02%
<i>Pangus scaritides</i> (Sturm, 1818)	2	4	3	5	3	0,13	0,35%
<i>Platyderus neapolitanus jannonei</i> Binaghi in Magistretti, 1955	2	2	1	2	1	0,01	0,03%
<i>Poecilus cupreus</i> (Linné, 1758)	3	2	3	5	3	6,21	16,13%
<i>Pterostichus (Platysma) niger</i> (Schaller, 1783)	4	2	3	5	2	0,01	0,02%
<i>Pterostichus melas italicus</i> (Dejean, 1828)	4	2	1	3	2	0,38	0,98%
<i>Syntomus impressus</i> (Dejean, 1825)	1	2	3	4	3	0,03	0,07%
<i>Synuchus vivalis</i> (Illiger, 1798)	2	2	3	5	2	0,02	0,05%

Tabella 8 – Densità di attività annua (DAa) e dominanza (DO) relativa alle specie catturate nei due anni di campionamento nel campo organico MT1 coltivato a patate nel 2017 e a grano nel 2018, e in MT2 lasciato inerbito per la produzione di fieno in tutti e due gli anni di campionamento.

SPECIE	MT1				MT2			
	2017		2018		2017		2018	
	DAa	DO	DAa	DO	DAa	DO	DAa	DO
<i>Abax parallelepipedus curtulus</i> Fairmaire, 1856	-	-	0,01	0,07%	-	-	-	-
<i>Agonium (Punctagonium) viridicuperum</i> (Goeze, 1777)	-	-	0,19	1,25%	-	-	-	-
<i>Amara aenea</i> (De Geer, 1774)	0,20	2,21%	0,22	1,44%	0,16	1,80%	0,19	2,94%
<i>Amara apricaria</i> (Paykull, 1790)	0,02	0,20%	0,04	0,26%	0,20	2,15%	0,02	0,31%
<i>Amara fulvipes</i> (Audinet-Serville, 1821)	-	-	-	-	0,02	0,18%	0,03	0,46%
<i>Amara sicula</i> Dejean, 1831	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Anchomenus dorsalis</i> (Pontoppidan, 1763)	-	-	0,02	0,13%	-	-	0,04	0,62%
<i>Brachinus explodens</i> (Duftschmid, 1812)	-	-	2,59	17,13%	-	-	0,20	3,10%
<i>Brachinus sclopeta</i> (Fabricius, 1792)	-	-	0,01	0,07%	-	-	0,11	1,70%
<i>Calathus cinctus</i> Motschulsky, 1850	0,42	4,63%	0,10	0,66%	0,42	4,67%	0,02	0,31%
<i>Calathus fuscipes</i> (Goeze, 1777)	0,76	8,25%	0,81	5,38%	1,36	14,90%	0,82	12,54%
<i>Calathus montivagus</i> Dejean, 1831	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Carabus convexus convexus</i> Fabricius, 1775	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Chlaenius chrysocephalus</i> (P. Rossi, 1790)	-	-	0,01	0,07%	-	-	-	-
<i>Diachromus germanus</i> (Linné, 1758)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Harpalus affinis</i> (Schrank, 1781)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Harpalus anxius</i> (Duftschmid, 1812)	0,17	1,81%	0,02	0,13%	-	-	-	-
<i>Harpalus attenuatus</i> Stephens, 1828	-	-	-	-	0,02	0,18%	-	-
<i>Harpalus cupreus</i> Dejean, 1829	0,02	0,20%	0,11	0,72%	0,23	2,51%	0,01	0,15%
<i>Harpalus decipiens</i> Dejean, 1829	1,33	14,49%	0,85	5,64%	4,30	47,22%	0,57	8,67%
<i>Harpalus distinguendus</i> (Duftschmid, 1812)	0,85	9,26%	0,34	2,23%	0,93	10,23%	0,29	4,49%
<i>Harpalus oblitus oblitus</i> Dejean, 1829	0,04	0,40%	0,02	0,13%	-	-	-	-
<i>Harpalus (Pseudoophonus) rufipes</i> (De Geer, 1774)	0,61	6,64%	2,00	13,19%	0,56	6,10%	1,25	19,20%

<i>Harpalus rubripes</i> (Duftschmid, 1812)	-	-	0,04	0,26%	0,02	0,18%	-	-
<i>Harpalus rufipalpis</i> Sturm, 1818	-	-	0,26	1,71%	-	-	0,55	8,36%
<i>Harpalus serripes</i> (Quensel in Schönherr, 1806)	3,26	35,61%	0,25	1,64%	0,07	0,72%	0,05	0,77%
<i>Harpalus sulphuripes sulphuripes</i> Germar, 1824	0,66	7,24%	0,34	2,23%	0,02	0,18%	0,14	2,17%
<i>Laemostenus cimmerius</i> (Fischer von Waldheim, 1823)	0,02	0,20%	-	-	-	-	-	-
<i>Leistus fulvibarbis</i> Dejean, 1826	0,02	0,20%	-	-	-	-	-	-
<i>Metallina lampros</i> (Herbst, 1784)	-	-	0,02	0,13%	-	-	-	-
<i>Microlestes fulvibasis</i> (Reitter, 1901)	-	-	-	-	0,02	0,18%	-	-
<i>Nebria brevicollis</i> (Fabricius, 1792)	-	-	-	-	0,05	0,54%	-	-
<i>Nebria kratteri</i> Dejean & Boisduval, 1830	-	-	-	-	-	-	0,01	0,15%
<i>Ophonus cribricollis</i> (Dejean, 1829)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ophonus puncticeps</i> Stephens, 1828	-	-	0,01	0,07%	-	-	-	-
<i>Pangus scaritides</i> (Sturm, 1818)	0,17	1,81%	0,03	0,20%	0,03	0,36%	0,07	1,08%
<i>Platyderus neapolitanus jannonei</i> Binaghi in Magistretti, 1955	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Poecilus cupreus</i> (Linné, 1758)	0,35	3,82%	6,81	45,01%	0,64	7,00%	2,10	32,20%
<i>Pterostichus (Platysma) niger</i> (Schaller, 1783)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pterostichus melas italicus</i> (Dejean, 1828)	0,28	3,02%	0,03	0,20%	0,03	0,36%	0,05	0,77%
<i>Syntomus impressus</i> (Dejean, 1825)	-	-	0,01	0,07%	-	-	-	-
<i>Synuchus vivalis</i> (Illiger, 1798)	-	-	-	-	0,05	0,54%	-	-

Tabella 9 – Densità di attività annua (DAa) e dominanza (DO) relativa alle specie catturate nei due anni di campionamento nei campi convenzionali TG1 coltivato nel 2017 a patate e nel 2018 a grano, e TG2 lasciato inerbito per la produzione di fieno nel 2017, e coltivato ad ortaggi nel 2018.

SPECIE	TG1				TG2			
	2017		2018		2017		2018	
	DAa	DO	DAa	DO	DAa	DO	DAa	DO
<i>Abax parallelepipedus curtulus</i> Fairmaire, 1856	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Agonium (Punctagonium) viridicuperum</i> (Goeze, 1777)	-	-	-	-	-	-	0,02	0,17%
<i>Amara aenea</i> (De Geer, 1774)	0,02	0,37%	0,40	3,84%	1,18	12,04%	-	-
<i>Amara apricaria</i> (Paykull, 1790)	0,16	3,73%	0,01	0,13%	0,78	7,96%	0,65	5,21%
<i>Amara fulvipes</i> (Audinet-Serville, 1821)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Amara sicula</i> Dejean, 1831	-	-	-	-	-	-	0,02	0,17%
<i>Anchomenus dorsalis</i> (Pontoppidan, 1763)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Brachinus explodens</i> (Duftschmid, 1812)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Brachinus sclopeta</i> (Fabricius, 1792)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Calathus cinctus</i> Motschulsky, 1850	-	-	0,01	0,13%	0,46	4,66%	0,43	3,47%
<i>Calathus fuscipes</i> (Goeze, 1777)	0,24	5,60%	0,22	2,12%	0,80	8,16%	0,28	2,26%
<i>Calathus montivagus</i> Dejean, 1831	0,02	0,37%	-	-	-	-	-	-
<i>Carabus convexus convexus</i> Fabricius, 1775	0,02	0,37%	-	-	-	-	-	-
<i>Chlaenius chrysocephalus</i> (P. Rossi, 1790)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Diachromus germanus</i> (Linné, 1758)	-	-	-	-	-	-	0,04	0,35%
<i>Harpalus affinis</i> (Schrank, 1781)	-	-	-	-	0,02	0,19%	-	-
<i>Harpalus anxius</i> (Duftschmid, 1812)	-	-	0,06	0,53%	-	-	-	-
<i>Harpalus attenuatus</i> Stephens, 1828	-	-	0,01	0,13%	-	-	-	-
<i>Harpalus cupreus</i> Dejean, 1829	0,03	0,75%	0,01	0,13%	-	-	0,04	0,35%
<i>Harpalus decipiens</i> Dejean, 1829	0,14	3,36%	0,29	2,78%	0,85	8,74%	0,41	3,30%
<i>Harpalus distinguendus</i> (Duftschmid, 1812)	0,16	3,73%	0,21	1,99%	0,97	9,90%	-	-
<i>Harpalus oblitus oblitus</i> Dejean, 1829	-	-	0,01	0,13%	-	-	-	-
<i>Harpalus (Pseudoophonus) rufipes</i> (De Geer, 1774)	3,44	80,97%	9,01	85,96%	3,45	35,34%	10,19	81,77%

<i>Harpalus rubripes</i> (Duftschmid, 1812)	-	-	0,01	0,13%	-	-	-	-
<i>Harpalus rufipalpis</i> Sturm, 1818	-	-	0,08	0,79%	0,91	9,32%	-	-
<i>Harpalus serripes</i> (Quensel in Schönherr, 1806)	-	-	-	-	0,02	0,19%	-	-
<i>Harpalus sulphuripes sulphuripes</i> Germar, 1824	-	-	0,04	0,40%	-	-	0,04	0,35%
<i>Laemostenus cimmerius</i> (Fischer von Waldheim, 1823)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Leistus fulvibarbis</i> Dejean, 1826	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Metallina lampros</i> (Herbst, 1784)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Microlestes fulvibasis</i> (Reitter, 1901)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Nebria brevicollis</i> (Fabricius, 1792)	0,02	0,37%	-	-	-	-	-	-
<i>Nebria kratteri</i> Dejean & Boisduval, 1830	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ophonus cribricollis</i> (Dejean, 1829)	-	-	-	-	0,02	0,19%	-	-
<i>Ophonus puncticeps</i> Stephens, 1828	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pangus scaritides</i> (Sturm, 1818)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Platyderus neapolitanus jannonei</i> Binaghi in Magistretti, 1955	-	-	-	-	0,02	0,19%	-	-
<i>Poecilus cupreus</i> (Linné, 1758)	-	-	0,01	0,13%	0,21	2,14%	-	-
<i>Pterostichus (Platysma) niger</i> (Schaller, 1783)	-	-	0,01	0,13%	-	-	-	-
<i>Pterostichus melas italicus</i> (Dejean, 1828)	0,02	0,37%	0,06	0,53%	0,06	0,58%	0,32	2,60%
<i>Syntomus impressus</i> (Dejean, 1825)	-	-	-	-	0,04	0,39%	-	-
<i>Synuchus vivalis</i> (Illiger, 1798)	-	-	-	-	-	-	-	-

3.2 Confronto generale dei dati

Se confrontiamo le comunità di Coleotteri Carabidi delle coppie di campo a parità di coltivo, ma a differente conduzione, MT1 e TG1 (Fig. 16 A, B) coltivati a patate nel 2017 e grano nel 2018; MT2 e TG2 (Fig. 17 A, B) coltivati ad erba nel 2017 e con coltivazioni differenti nel 2018 (MT2 erba, TG2 ortaggi), osserviamo che non solo varia il numero delle specie, ma varia anche la loro densità di attività annua. Una maggiore densità di attività si ha nei campi a conduzione organica (MT1 e MT2), dove è presente un maggior numero di specie con una prevalenza di onnivori e predatori generalisti rispetto ai granivori e ai predatori specialisti. (Fig. 18).

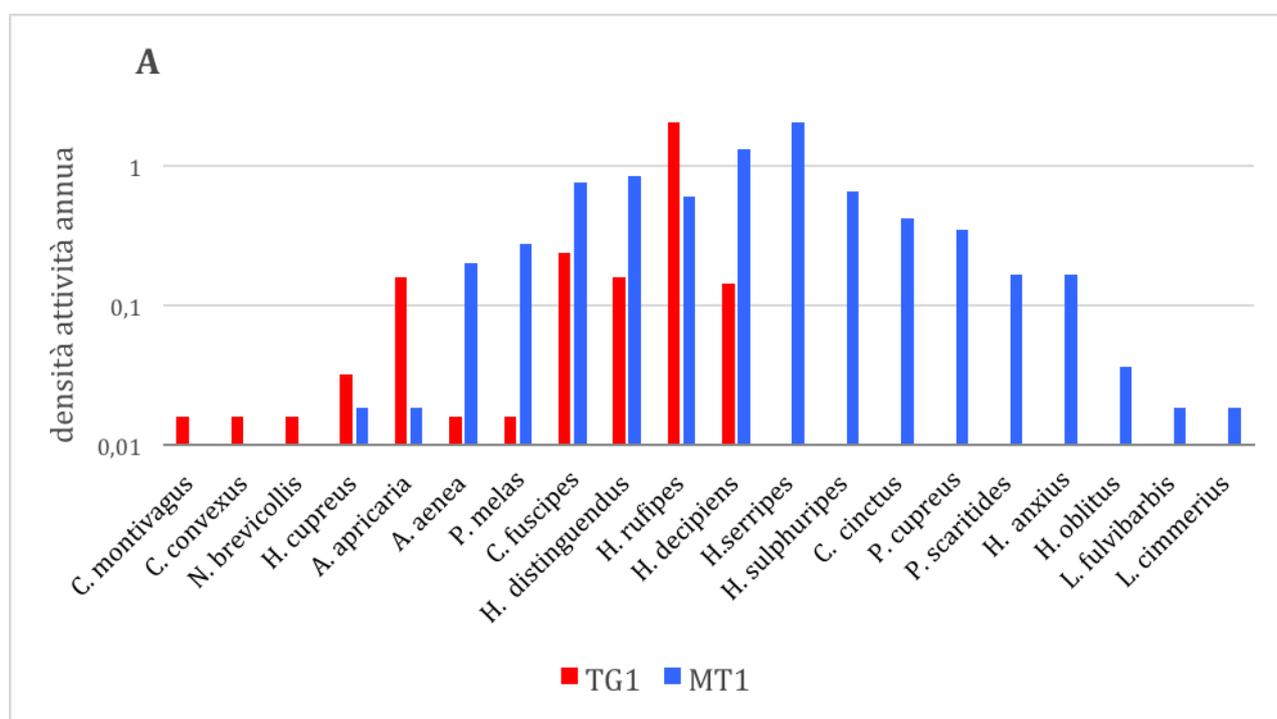


Fig. 16 A – Densità di attività annua, di tutte le specie catturate nel 2017 nel campo organico (MT1) e convenzionale (TG1) coltivati a patate. Agli estremi del grafico sono presenti le specie esclusive, al centro quelle comuni.

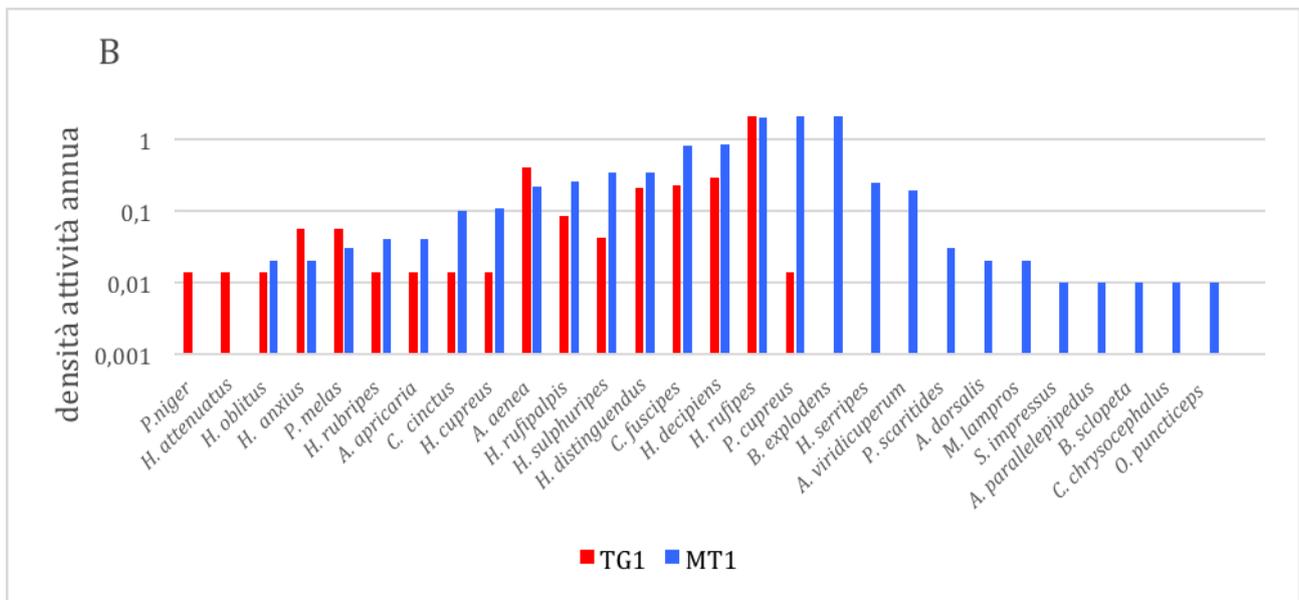


Fig. 16 B – Densità di attività annua, di tutte le specie catturate nel 2018 nel campo organico (MT1) e convenzionale (TG1) coltivati a grano. Agli estremi del grafico sono presenti le specie esclusive, al centro quelle comuni.

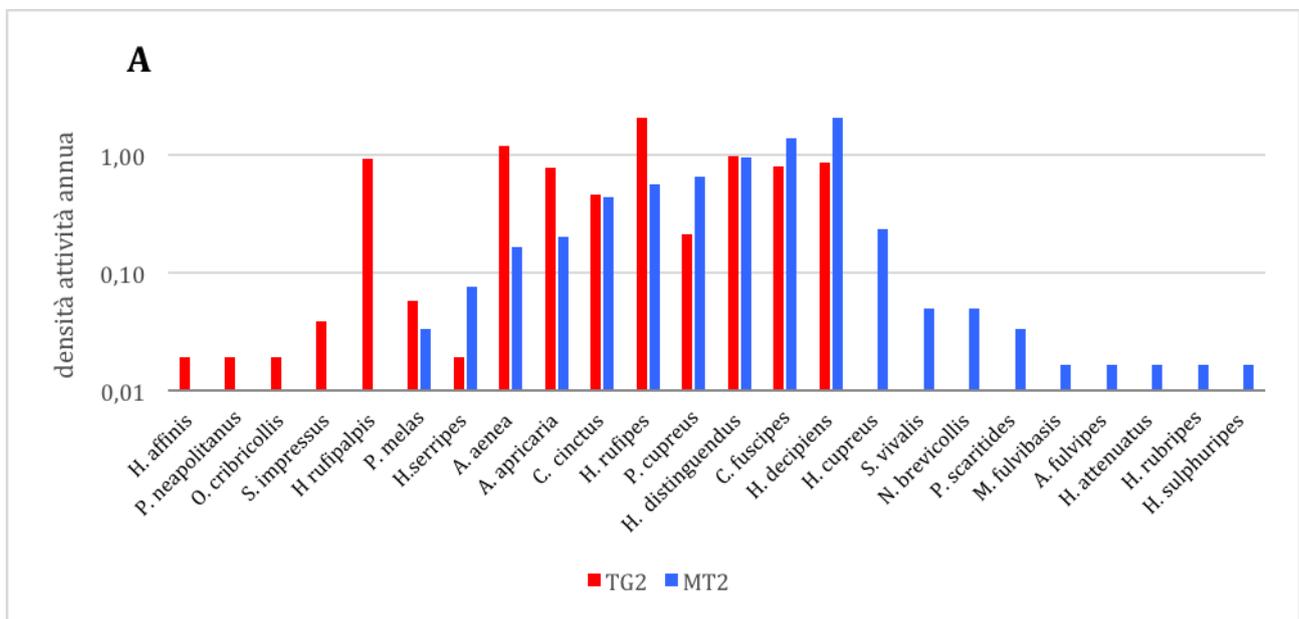


Fig. 17 A, – Densità di attività annua, di tutte le specie catturate nel 2017 nel campo organico (MT2) e convenzionale (TG2) coltivati ad erba. Agli estremi del grafico sono presenti le specie esclusive, al centro quelle comuni.

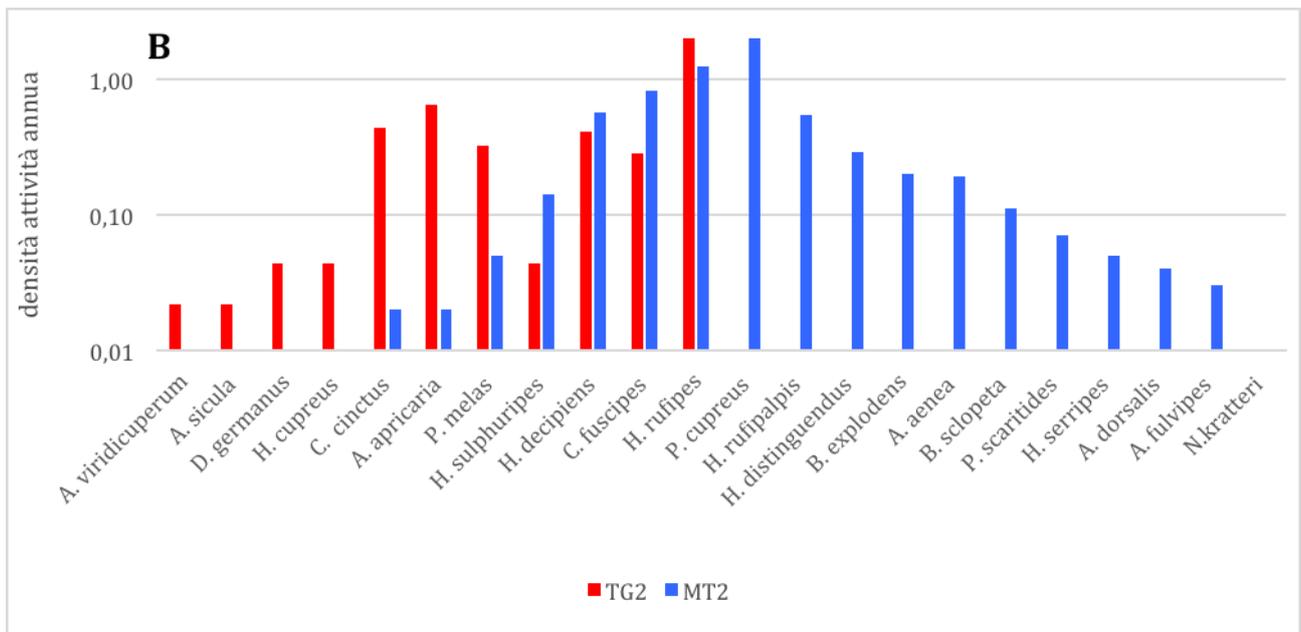


Fig. 17 B – Densità di attività annua, di tutte le specie catturate nel 2018 nel campo organico (MT2) e convenzionale (TG2) con coltivi differenti. Agli estremi del grafico sono presenti le specie esclusive, al centro quelle comuni.

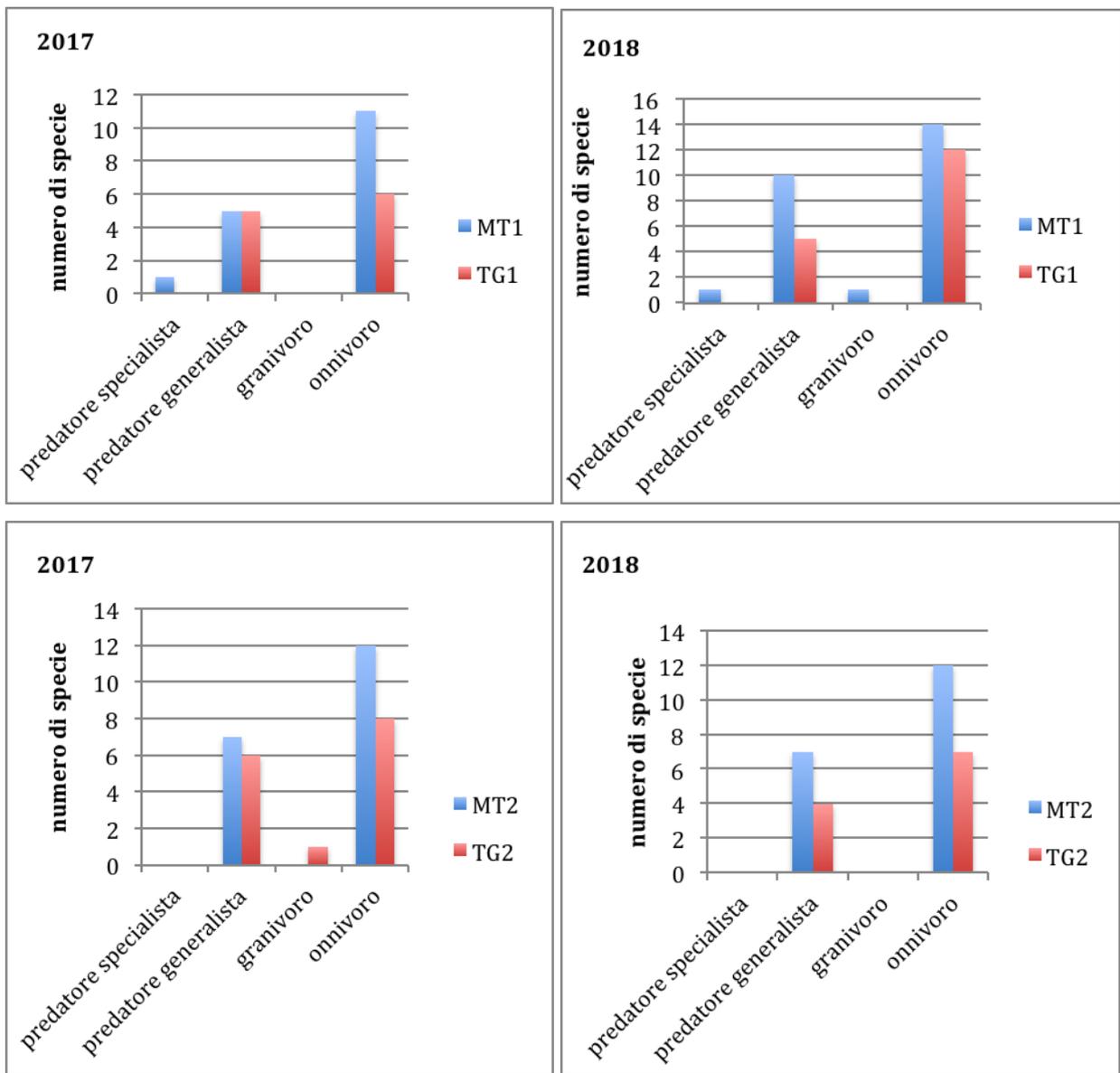


Fig. 18 – Numero di specie, divise in base alla categoria alimentare (cfr tabella 7), catturate nei campi monitorati nei due anni di campionamento.

3.3 Similarità tra le comunità

Il confronto statistico effettuato mediante l'indice di correlazione di Pearson tra le comunità di Coleotteri Carabidi dei campi con lo stesso coltivo ma a differente conduzione (Tabella 10), mostra una correlazione debole per le comunità dei campi coltivati a patate ($r = 0,060$), dei campi coltivati a grano ($r = 0,286$) e dei campi lasciati inerbiti ($r = 0,208$). Il confronto tra le comunità di uno stesso campo, tra i due anni di campionamento (Tabella 11) mostra una correlazione debole per le comunità del campo MT1 ($r = 0,073$), una correlazione moderata per le comunità del campo MT2 ($r = 0,331$), e una forte correlazione per le comunità del campo TG1 ($r = 0,996$) e del campo TG2 ($r = 0,869$).

Il confronto effettuato mediante l'indice di Sorensen tra le comunità di Coleotteri Carabidi dei campi con lo stesso coltivo ma a differente conduzione (Tabelle 12) mostra una similarità superiore al 40 % in tutti i casi presi in esame, confrontando invece le comunità di ogni singolo campo tra i due anni di campionamento, una similarità maggiore si ha tra le comunità dei campi a conduzione organica rispetto a quelle dei campi a conduzione convenzionale. (Tabella 13).

Tabella 10 – Similarità (correlazione di Pearson) tra le comunità dei campi con lo stesso coltivo ma a differente conduzione.

	TG1 (patate 2017)	TG2 (fieno 2017)	TG1 (grano 2018)
MT1 (patate 2017)	0,060		
MT2 (fieno 2017)		0,286	
MT1 (grano 2018)			0,208

Tabella 11 – Similarità calcolata mediante il coefficiente di correlazione di Pearson tra le comunità dello stesso campo nei due anni di campionamento.

	MT1 (grano)	MT2 (fieno)	TG1 (grano)	TG2 (fieno)
MT1 (patate)	0,073			
MT2 (fieno)		0,331		
TG1 (patate)			0,996	
TG2 (fieno)				0,869

Tabella 12 – Similarità calcolata mediante il coefficiente di Sørensen tra le comunità dei campi con lo stesso coltivo ma a differente conduzione.

	COLTIVO	CAMPO	N. SPECIE	SPECIE	
				COMUNI	SØRENSEN
2017	patate	MT1	19	10	59%
		TG1	15		
	erba	MT2	17	8	57%
		TG2	11		
2018	grano	MT1	26	15	70%
		TG1	17		

Tabella 13 – Similarità calcolata mediante il coefficiente di correlazione di Pearson tra le comunità dello stesso campo nei due anni di campionamento.

	CAMPO	ANNO	COLTIVO	N. SPECIE	SPECIE	
					COMUNI	SØRENSEN
ORG	MT1	2017	patate	17	14	65%
		2018	grano	26		
	MT2	2017	erba	19	14	74%
		2018	erba	19		
CONV	TG1	2017	patate	11	8	57%
		2018	grano	17		
	TG2	2017	erba	15	6	46,15%
		2018	ortaggi	11		

3.4 Diversità tra le comunità

Il profilo di diversità di Rényi, mostra per i dati raccolti nel 2017, che una maggiore diversità si ha nel campo organico MT1, confrontato con quello convenzionale TG1, entrambi coltivati a patate (Fig. 19A). I risultati ottenuti dal confronto degli erbai monitorati nel 2017, mostrano che le comunità dei due campi non sono molto diverse tra loro (Fig. 19B). Le stesse coppie di campo sono state confrontate con i dati relativi al campionamento del 2018, il confronto tra MT1 e TG1, coltivati a grano, indica che le comunità del campo organico hanno una maggiore diversità rispetto a quelle del campo convenzionale (Fig. 19C). Una maggiore diversità si ha anche nel campo organico MT2, coltivato lasciato inerbito, confrontato con il campo convenzionale TG2 ma coltivato ad ortaggi (Fig. 19D). Confrontando le comunità di ogni singolo campo tra i due anni di campionamento, le comunità dei campi organici mostrano un profilo di diversità tra i due anni non tanto diverso l'uno l'altro (Fig. 20A,B), le comunità del campo convenzionale TG1, coltivato nel 2017 a patate e nel 2018 a grano, mostrano un profilo quasi identico (Fig. 20C), mentre il confronto delle comunità del campo TG2 mostra che una maggiore diversità si ha solo nella comunità catturata nel 2017, anno in cui il campo è stato lasciato inerbito e destinato alla produzione di fieno, rispetto al 2018, quando il campo è stato coltivato ad ortaggi. (Fig. 20D).

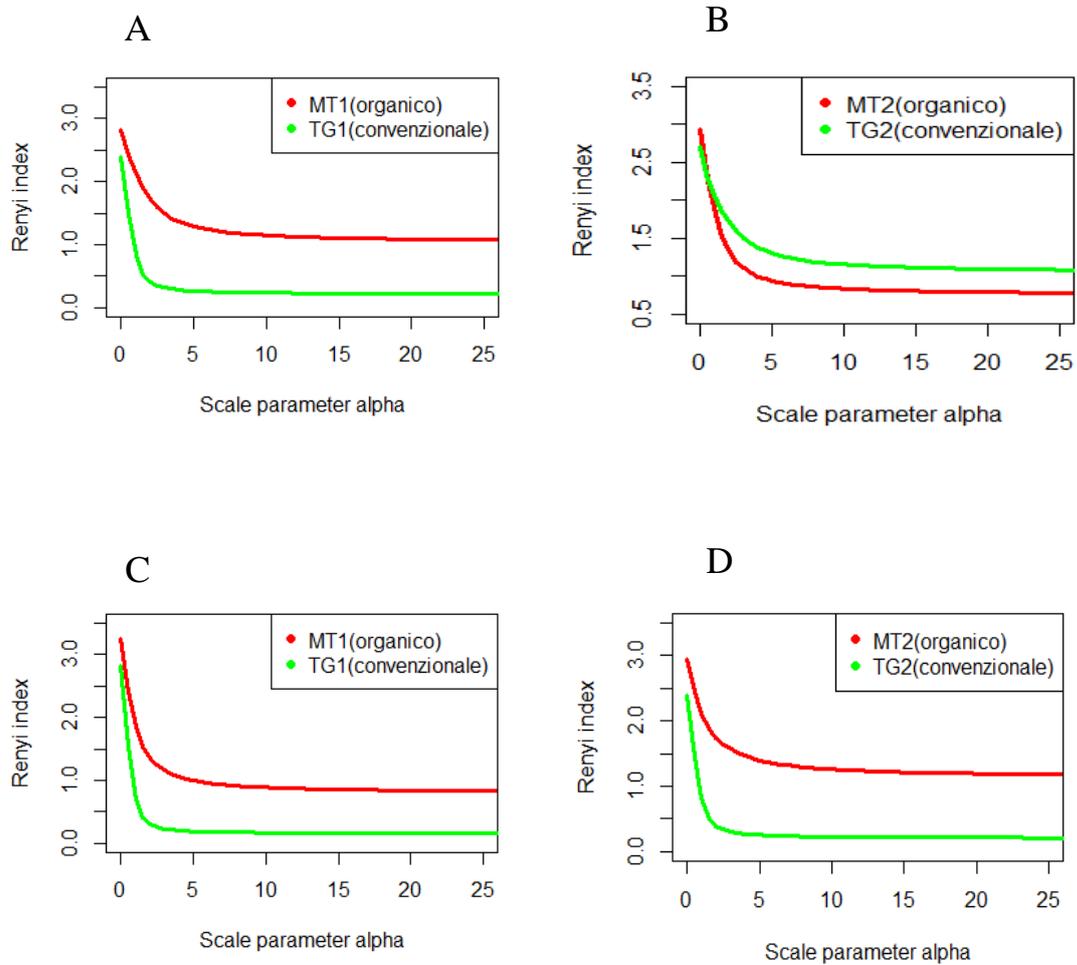


Fig. 19 – Profili di diversità di Rènnyi dei campi monitorati nel 2017 e nel 2018 a parità di coltivo e a differente conduzione, (A: patate, B: erba; C: grano). D: erba vs ortaggi.

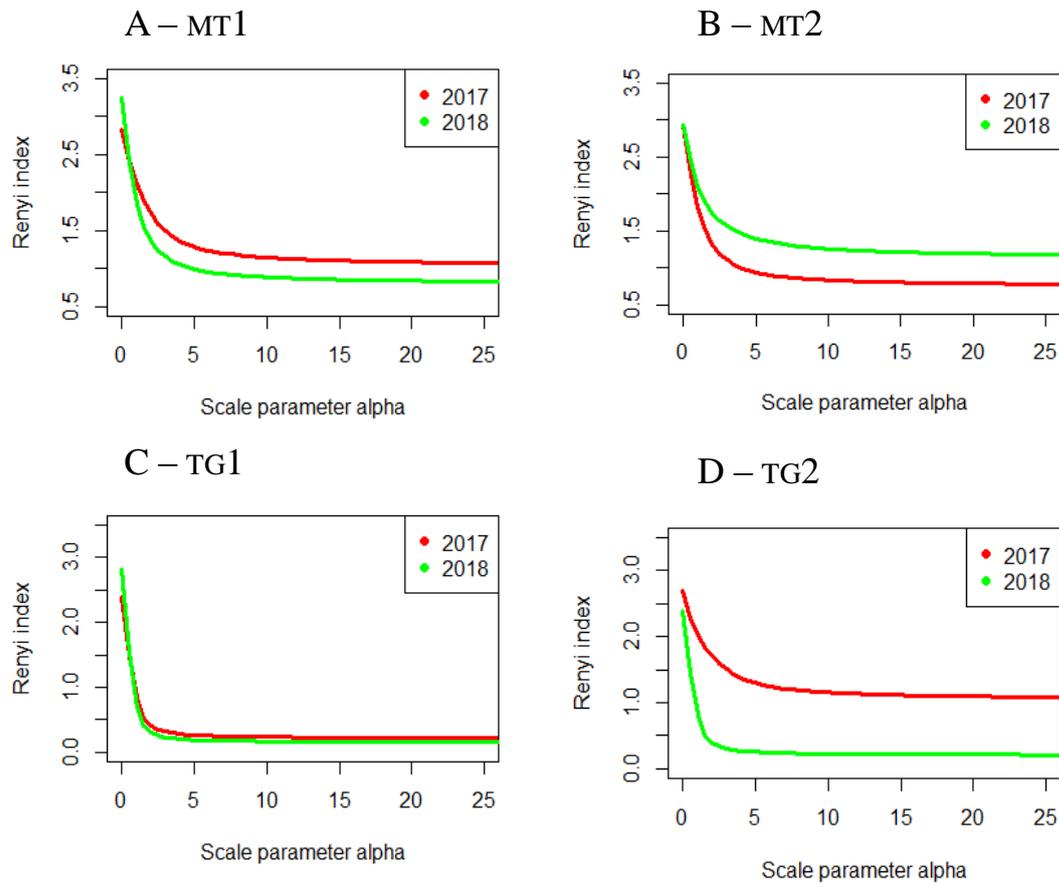


Fig. 20 – Profili di diversità di Renyi dei campi (MT1, MT2; TG1; TG2) monitorati nei due anni di campionamento, a parità di conduzione e a differente coltivo. (2017 - MT1: patate, MT2: erba, TG1: patate, TG2: erba; 2018 - MT1: grano, MT2: erba, TG1: grano, TG2: ortaggi).

3.5 Effetti dell'esposizione in campo sulla risposta immunitaria costitutiva

3.5.1. Fenolossidasi basale (PO basale) e totale (PO totale)

Differenze significative sono state trovate tra i valori di PO basale registrati negli individui catturati nel campo organico rispetto a quelli convenzionali (Kruskal – Wallis, $p = 9,069 \times 10^{-11}$) (Fig. 21). I valori di PO basale registrati negli individui catturati nel campo a conduzione organica MT ($0,0101 \pm 1 \times 10^{-3}$ Abs/ μ L/min; $n = 15$) risultano significativamente più alti rispetto ai valori registrati negli individui catturati nei campi a conduzione convenzionale TG1 ($0,0005 \pm 7,4 \times 10^{-5}$ Abs/ μ L/min; $n = 22$; Wilcoxon rank sum test, $p = 1,1 \times 10^{-6}$), e TG2 ($0,0029 \pm 3,8 \times 10^{-4}$ Abs/ μ L/min; $n = 25$; Wilcoxon rank sum test, $p = 1,4 \times 10^{-6}$).

Una differenza significativa nei livelli di PO basale plasmatica è stata registrata in individui catturati nel campo TG1 rispetto a quelli catturati nel campo TG2 (Wilcoxon rank sum test, $p = 1,4 \times 10^{-6}$).

Differenze significative sono state trovate tra i valori di PO totale registrati negli individui catturati nel campo organico rispetto a quelli convenzionali (Kruskal – Wallis, $p = 2,038 \times 10^{-11}$) (Fig. 22). I valori di PO totale registrati negli individui catturati nel campo a conduzione organica MT ($0,0322 \pm 3,2 \times 10^{-3}$ Abs/ μ L/min; $n = 15$) risultano significativamente più alti rispetto ai valori registrati negli individui catturati nei campi a conduzione convenzionale TG1 ($0,001 \pm 1,1 \times 10^{-4}$ Abs/ μ L/min; $n = 22$; Wilcoxon rank sum test, $p = 1,9 \times 10^{-6}$), e TG2 ($0,0052 \pm 5,1 \times 10^{-4}$ Abs/ μ L/min; $n = 25$; Wilcoxon rank sum test, $p = 9,4 \times 10^{-7}$), mentre tra i valori di assorbanza registrati negli individui catturati nei campi TG1 e TG2, non c'è differenza significativa.

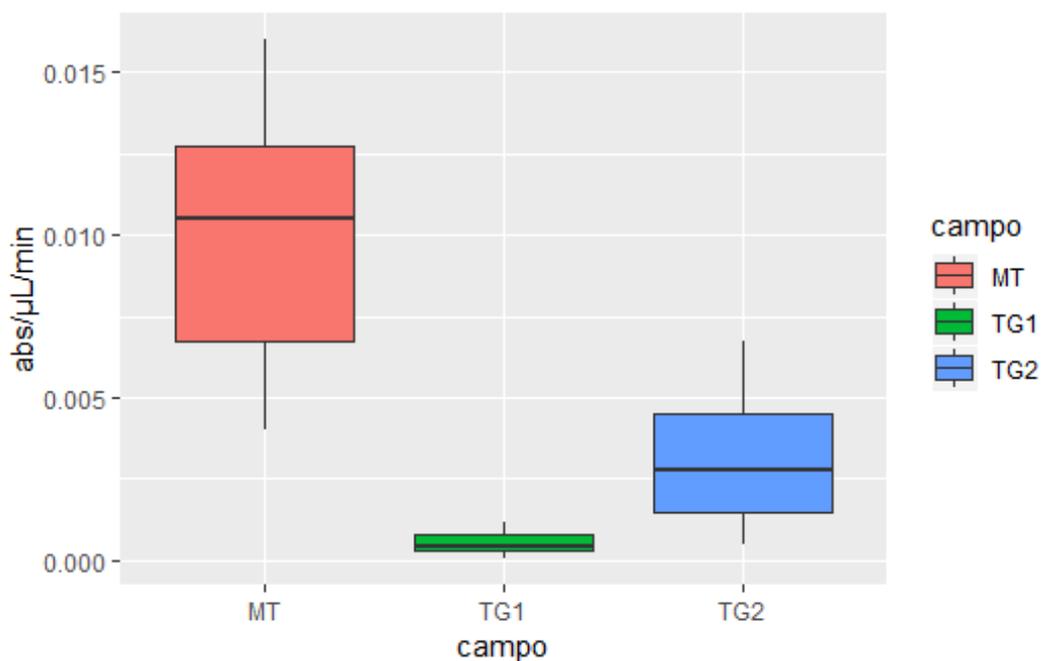


Fig. 21 - Attività basale dell'enzima PO negli individui catturati nel campo organico MT e nei campi convenzionali TG1 e TG2 monitorati nel 2018.

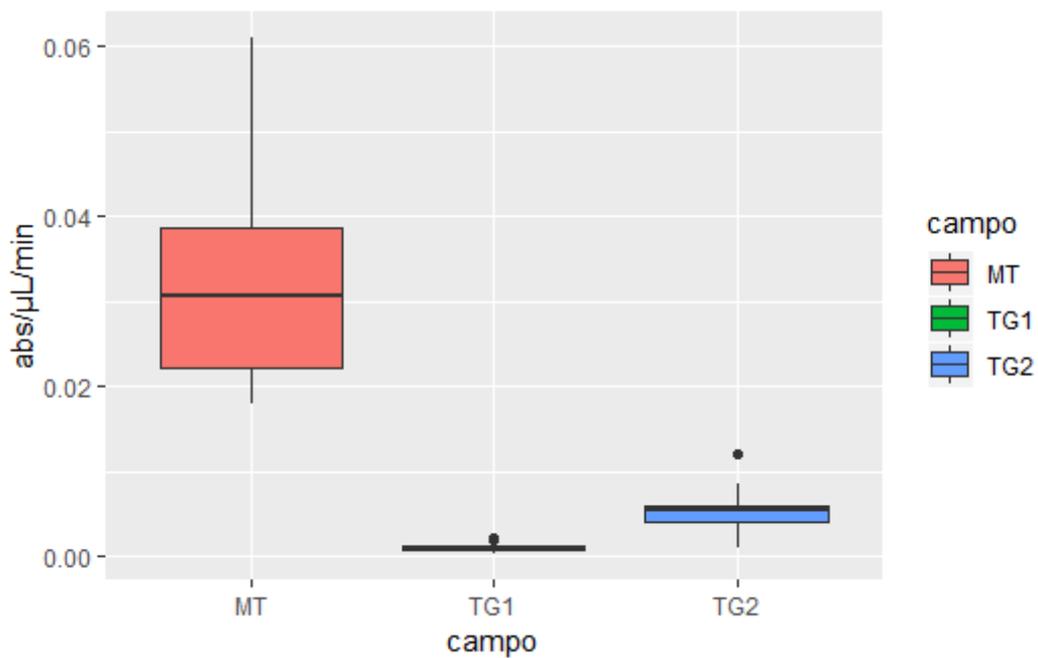


Fig. 22 – Attività totale dell'enzima PO negli individui catturati nel campo organico MT e nei campi convenzionali TG1 e TG2 monitorati nel 2018.

3.5.2 Analisi attività litica dell'emolinfa

Differenze significative sono state trovate tra i valori dell'attività litica dell'emolinfa registrati negli individui catturati nel campo organico rispetto a quelli convenzionali (Kruskal – Wallis, $p = 1,298 \times 10^{-6}$) (Fig. 23). I valori dell'attività litica dell'emolinfa registrati negli individui catturati nel campo organico MT ($0,0031 \pm 2.8 \times 10^{-4}$ Abs/ μ L/min; $n = 12$) risultano significativamente più alti rispetto ai valori registrati negli individui catturati nei campi a conduzione convenzionale TG1 ($0,00029 \pm 8.1 \times 10^{-5}$ Abs/ μ L/min; $n = 18$; Wilcoxon rank sum test, $p = 1,6 \times 10^{-5}$) e TG2 ($0,00016 \pm 2 \times 10^{-5}$ Abs/ μ L/min; $n = 18$; Wilcoxon rank sum test, $p = 1,5 \times 10^{-5}$), mentre tra i valori di assorbanza registrati negli individui catturati nei campi TG1 e TG2, non c'è differenza significativa.

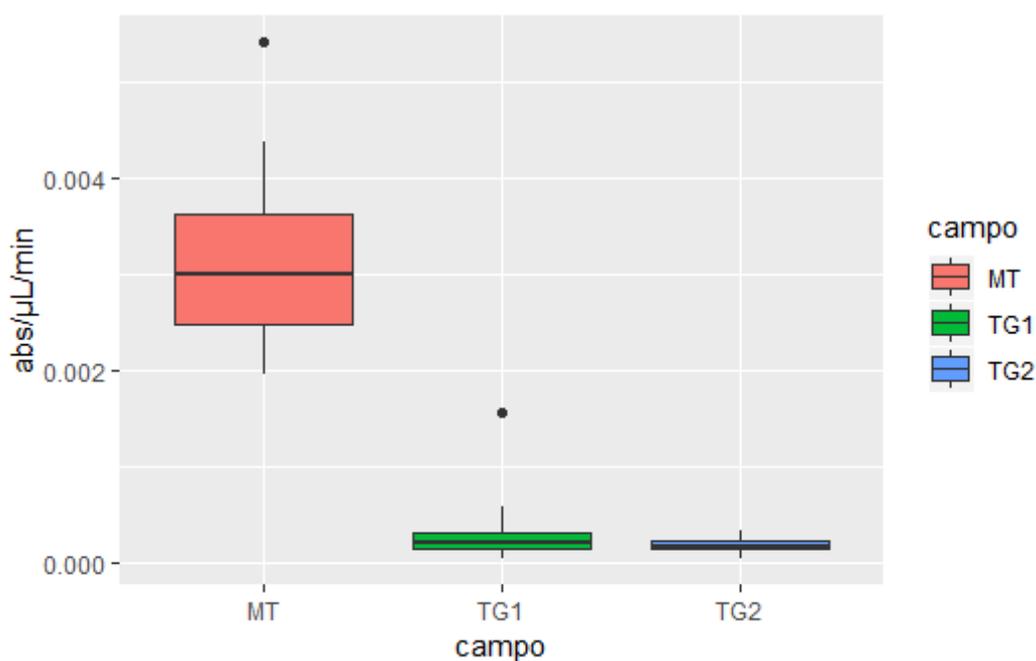


Fig. 23 - Attività litica dell'emolinfa negli esemplari catturati nel campo organico MT, e nei campi convenzionali TG1 e TG2 monitorati nel 2018.

3.6 Effetti genotossici dell'esposizione a trattamenti di campo

Il *Comet assay* effettuato su emociti di *H. rufipes* catturati nel 2017 nei campi MT1 (organico) e TG1 (convenzionale), entrambi coltivati a patate, rivela differenze significative per i valori di percentuale di DNA nella coda della cometa (Kruskal – Wallis, $p = 4.5 \times 10^{-5}$) (Fig. 24). Nelle cellule prelevate da esemplari catturati nel campo organico MT la fine di Maggio, la percentuale di DNA nella coda ($n = 12$; Tail DNA % = $8,93 \pm 0,22$) è significativamente inferiore (Wilcoxon rank sum test, $p = 9,5 \times 10^{-5}$) alla percentuale di DNA nella coda delle cellule prelevate da esemplari catturati la fine di Maggio, circa 8 settimane dopo il trattamento con metribuzina, clomazone e pendimethalin (cfr tabella 6 capitolo 2), nel campo convenzionale TG1 ($n = 12$; Tail DNA % = $11,55 \pm 0,47$). Una differenza significativa (Wilcoxon rank sum test, $p = 6,7 \times 10^{-5}$) è stata riscontrata anche tra le cellule prelevate da esemplari catturati nel campo convenzionale il mese di Maggio e quelli catturati nello stesso campo verso fine Giugno ($n = 12$; Tail DNA% = $9,30 \pm 0,18$), periodo coincidente con circa 12 settimane dopo il trattamento con metribuzin, clomazone e pendimethalin e 20 giorni dopo il trattamento con cicloxydim. Per i valori di tail moment (Fig. 25) e olive moment (Fig. 26), non sono state trovate differenze significative tra vari campioni presi in esame.

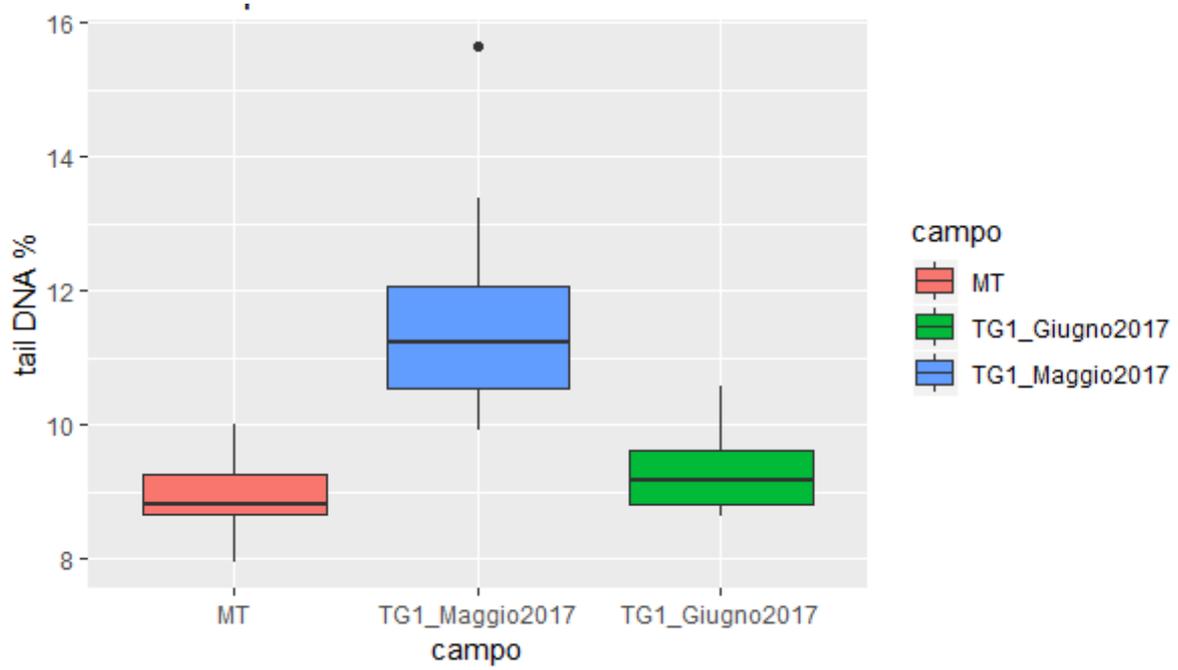


Fig. 24 Tail DNA% in cellule prelevate da adulti di *H. rufipes* catturati nel campo organico MT, scelto come controllo, e nel campo convenzionale TG1 la fine di Maggio 2017, e la fine di Giugno 2017.

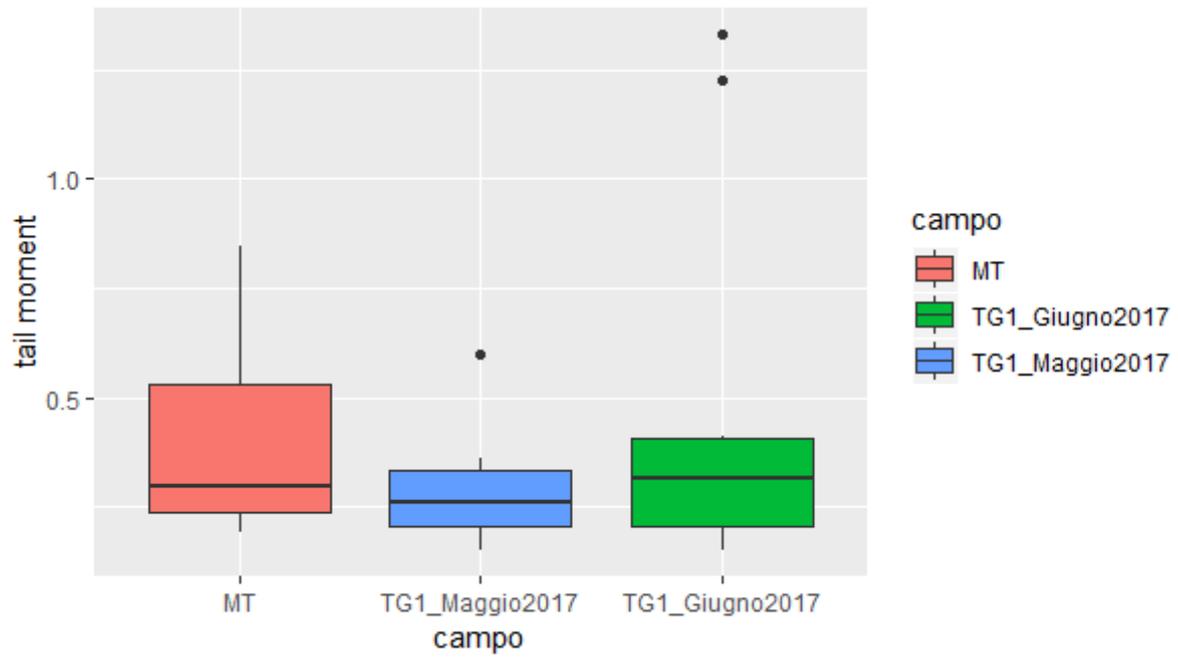


Fig. 25 - Tail moment in cellule prelevate da adulti di *H. rufipes* catturati nel campo organico MT, scelto come controllo, e nel campo convenzionale TG1 la fine di Maggio 2017, e la fine di Giugno 2017.

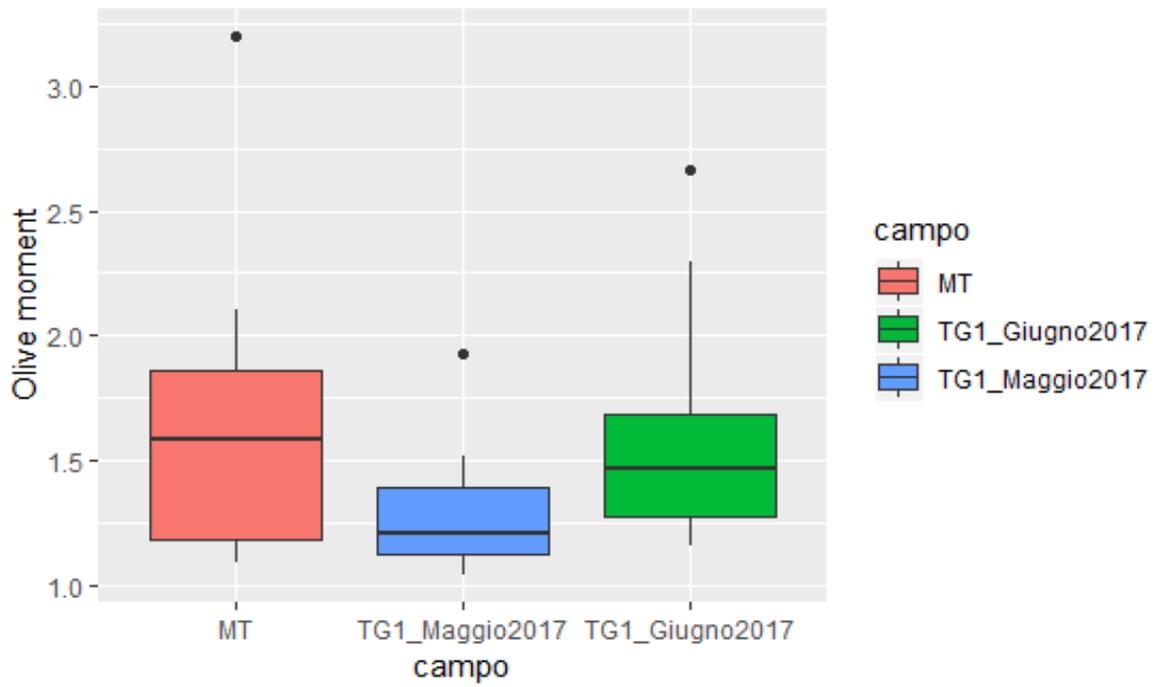


Fig. 26 - Olive moment in cellule prelevate da adulti di *H. rufipes* catturati nel campo organico MT, scelto come controllo, e nel campo convenzionale TG1 la fine di Maggio 2017, e la fine di Giugno 2017.

3.7 Effetti dell'esposizione in campo a livello morfologico

Le analisi morfometrica effettuate su maschi e femmine di *H. rufipes* catturati nel 2018 hanno confermato il dimorfismo sessuale della specie, con femmine significativamente più grandi dei maschi sia nel campo organico (Tabella 14) che nel campo convenzionale (Tabella 15). Dal confronto statistico, fatto mediante Kruskal – Wallis rank sum test per testare le differenze morfometriche a parità di sesso, differenze significative sono state riscontrate solo per la lunghezza del capo dei maschi ($p = 0,006$) con dimensioni maggiori negli individui catturati nel campo TG1 (Tabella 16), e per la distanza inter oculare delle femmine ($p = 0,023$) che risulta maggiore negli individui catturati nel campo TG1 (Tabella 17).

Il Levene test eseguito per testare la fluttuazione asimmetrica tra gli individui catturati nei campi TG1 e MT, mostra una differenza significativa solo per la lunghezza delle elitre dei maschi ($p = 0,002$) con un'asimmetria maggiore negli individui catturati nel campo TG1 (Tabella 18), mentre non sono state trovate differenze significative tra gli individui di sesso femminile catturati nei due campi presi in esame (Tabella 19).

Tabella 14 - Misure (media \pm errore standard) effettuate su esemplari adulti di *H.rufipes* divisi per sesso catturati nel campo organico (MT1). (Wilcoxon rank sum test, p -value $<0,05$).

MISURE (mm)	2018		p-value
	MT1		
	Maschi (n=30)	Femmine (n=30)	
lunghezza corpo	8.580 \pm 0.089	9.411 \pm 0.108	2,57 x 10⁻⁶
Larghezza capo (W)	1.958 \pm 0.020	2.128 \pm 0.019	1,01 x 10⁻⁶
Lunghezza capo (L)	1.553 \pm 0.025	1.755 \pm 0.032	6,43 x 10⁻⁶
Distanza occhi (D)	1.370 \pm 0.015	1.507 \pm 0.015	1,62 x 10⁻⁶
Larghezza protorace (W)	2.679 \pm 0.030	2.936 \pm 0.027	6,21 x 10⁻⁷
Lunghezza protorace (L)	1.872 \pm 0.020	2.043 \pm 0.020	2,43 x 10⁻⁶
Larghezza elitra (W)	1.801 \pm 0.020	2.005 \pm 0.022	2,74 x 10⁻⁶
Lunghezza elitra (L)	4.978 \pm 0.055	5.400 \pm 0.054	6,25 x 10⁻⁶

Tabella 15 - Misure (media \pm errore standard) effettuate su esemplari adulti di *H.rufipes* divisi per sesso catturati nel campo convenzionale (TG1). (Wilcoxon rank sum test, p-value<0,05).

MISURE (mm)	2018		p-value
	TG1		
	Maschi (n=30)	Femmine (n=30)	
Lunghezza corpo	8.653 \pm 0.066	9.347 \pm 0.089	2,8 x 10⁻⁷
Larghezza capo (W)	2.005 \pm 0.016	2.174 \pm 0.023	6,38 x 10⁻⁷
Lunghezza capo (L)	1.645 \pm 0.023	1.722 \pm 0.028	0,052
Distanza occhi (D)	1.391 \pm 0.013	1.552 \pm 0.017	1,63 x 10⁻⁷
Larghezza protorace (W)	2.666 \pm 0.056	2.962 \pm 0.037	2,46 x 10⁻⁶
Lunghezza protorace (L)	1.915 \pm 0.015	2.085 \pm 0.047	3,89 x 10⁻⁶
Larghezza elitra (W)	1.831 \pm 0.012	2.043 \pm 0.021	7,19 x 10⁻⁹
Lunghezza elitra (L)	5.047 \pm 0.037	5.480 \pm 0.050	7,32 x 10⁻⁸

Tabella 16 - Misure (media \pm errore standard) effettuate su maschi adulti di *H.rufipes* catturati nel campo organico (MT) e nel campo convenzionale (TG1). (Kruskal – Wallis rank sum test, p-value<0,05).

MISURE (mm)	2018		p-value
	MASCHI		
	MT (n=30)	TG1 (n=30)	
Lunghezza corpo	8.580 \pm 0.089	8.653 \pm 0.066	0,482
Larghezza capo (W)	1.958 \pm 0.020	2.005 \pm 0.016	0,134
Lunghezza capo (L)	1.553 \pm 0.025	1.645 \pm 0.023	0,006
Distanza occhi (D)	1.370 \pm 0.015	1.391 \pm 0.013	0,300
Larghezza protorace (W)	2.679 \pm 0.030	2.666 \pm 0.056	0,411
Lunghezza protorace (L)	1.872 \pm 0.020	1.915 \pm 0.015	0,134
Larghezza elitra (W)	1.801 \pm 0.020	1.831 \pm 0.012	0,407
Lunghezza elytra (L)	4.978 \pm 0.055	5.047 \pm 0.037	0,403

Tabella 17 - Misure (media \pm errore standard) effettuate su femmine adulte di *H.rufipes* catturati nel campo organico (MT) e nel campo convenzionale (TG1). (Kruskal –Wallis rank sum test, p-value<0,05).

MISURE (mm)	2018		p-value
	FEMMINE		
	MT (n=30)	TG1 (n=30)	
Lunghezza corpo	9.411 \pm 0.108	9.347 \pm 0.089	0,673
Larghezza capo (W)	2.128 \pm 0.019	2.174 \pm 0.023	0,093
Lunghezza capo (L)	1.755 \pm 0.032	1.722 \pm 0.028	0,407
Distanza occhi (D)	1.507 \pm 0.015	1.552 \pm 0.017	0,023
Larghezza protorace (W)	2.936 \pm 0.027	2.962 \pm 0.037	0,450
Lunghezza protorace (L)	2.043 \pm 0.020	2.085 \pm 0.047	0,662
Larghezza elitra (W)	2.005 \pm 0.022	2.043 \pm 0.021	0,211
Lunghezza elytra (L)	5.400 \pm 0.054	5.480 \pm 0.050	0,273

Tabella 18 - Valori di fluttuazione asimmetrica (media \pm errore standard) calcolati in maschi adulti di *H.rufipes* catturati nel campo organico (MT) e nel campo convenzionale (TG1). (Levene test, p-value<0,05).

MISURE	2018		p-value
	MASCHI		
	MT (n=30)	TG1 (n=30)	
Larghezza L – R	0,021 \pm 0.003	0.020 \pm 0.003	0,186
Lunghezza L – R	0,020 \pm 0.002	0.036 \pm 0.006	0,002

Tabella 19 - Valori di fluttuazione asimmetrica (media \pm errore standard) calcolati in femmine adulte di *H.rufipes* catturate nel campo organico (MT) e nel campo convenzionale (TG1). (Levene test (p-value<0,05)).

MISURE	2018		p-value
	FEMMINE		
	MT (n=30)	TG1 (n=30)	
Larghezza L – R	0,033 \pm 0.005	0.029 \pm 0.005	0,934
Lunghezza L – R	0,045 \pm 0.008	0.043 \pm 0.097	0,694

CAPITOLO 4

DISCUSSIONE

4.1 Effetti delle pratiche agricole sull'assemblaggio delle specie.

La biodiversità dei campi a conduzione convenzionale risulta fortemente influenzata dall'uso degli agrochimici applicati nei campi monitorati per il controllo delle specie infestanti. La distribuzione dei Carabidi, oltre ad essere legata al tipo di conduzione, è legata anche al tipo di coltivazione, e alla rotazione delle colture, infatti in bibliografia è noto che molte specie come *Harpalus rufipes* e *Harpalus distinguendus*, possono essere presenti allo stesso modo in sistemi agricoli con lo stesso tipo di coltivazione ma a differente conduzione (Szekeres *et al.*, 2006), o vi sono specie come *Harpalus rufipes* che prediligono i sistemi agricoli dove si coltivano a rotazione patate e grano (Zhang *et al.*, 1998). In uno studio condotto da Eyre *et al.*, (2013) è stato dimostrato che la rotazione delle colture ha un effetto considerevole sull'attività dei Coleotteri Carabidi, infatti specie come *Harpalus rufipes* e *Amara apricaria*, sono associate ad ambienti con un alto indice di disturbo.

Nei campi a conduzione organica, a parità di coltivo, ma a differente conduzione, è stato registrato un maggior numero di specie, soprattutto onnivori, e una maggiore densità di attività rispetto ai campi a conduzione convenzionale. Alcune specie come *Brachinus eximius*, *B. sclopeta*, *Pangus scaritides* non sono state trovate nei campi a conduzione convenzionale perché probabilmente tollerano di meno i trattamenti effettuati, e sono più esigenti dal punto di vista alimentare. Come già dimostrato da Doring & Kromp (2003) e da Eyre *et al.* (2013), la ricchezza di specie è maggiore nei campi a conduzione organica che in quelli a conduzione convenzionale, perché nei campi a conduzione organica c'è anche un maggiore approvvigionamento alimentare, soprattutto per specie la cui dieta è legata alla presenza di molte piante, e una maggiore copertura del suolo.

I risultati ottenuti infatti, mostrano una maggiore diversità nei campi organici rispetto a quelli convenzionali in tutti e due gli anni di campionamento e in tutti i campi, tranne nel campo MT2 (erbaio organico) confrontato con il campo TG2 (erbaio convenzionale) e monitorati nel 2017, dove il profilo di diversità è più alto nel campo convenzionale. Questo probabilmente perché i Carabidi si spostano dal bosco confinante, che funge da *habitat* di rifugio, al campo coltivato (Varchola & Dunn, 2001; Magura *et al.*, 2005; Bianchi *et al.*, 2006). Inoltre nel 2017, il campo TG2 non è stato sottoposto a nessun tipo di trattamento, ma ha comunque subito i trattamenti effettuati nei campi adiacenti poiché sono state trovate specie tipiche di ambienti antropizzati (campi a coltivazione convenzionale) come *Harpalus rufipes* (Kromp, 1999; Eyre *et al.*, 2013). *Harpalus rufipes*, infatti, presenta una bassa densità di attività nei campi a conduzione organica in tutti e due gli anni di campionamento, mentre specie come *P. cupreus*, il cui grado di fecondità e la dieta sono legati a paesaggi più eterogenei e vivono in ambienti più stabili, (Bommarco, 1998; Purtauf *et al.*, 2005), sono poco presenti nei campi a conduzione convenzionale.

L'uso di pesticidi, utilizzati nei campi convenzionali, agisce anche a livello trofico, causando una diminuzione delle prede, e così una riduzione del numero di specie di Coleotteri Carabidi. Comparativamente l'assenza di trattamenti nei campi organici o il basso numero effettuato nel campo MT1 nel 2017 e coltivato a patate, ha favorito l'abbondanza e il predominio di alcune specie, tipiche dei seminativi, come quelle appartenenti alla tribù degli Harpalini (Talarico *et al.*, 2016), indicando così che le comunità dei campi a conduzione organica sono più stabili di quelle dei campi a conduzione convenzionale.

4.2 Effetti causati dall'esposizione in campo a livello fisiologico

La competenza immunitaria degli insetti comporta l'espressione di effettori cellulari ed umorali per riconoscere e immobilizzare i patogeni (Gillespie *et al.*, 1997; Ottaviani, 2005; Siva-Jothy *et al.*, 2005). Questi effettori sono sensibili all'esposizione xenobiotica come i pesticidi, che possono interagire negativamente o positivamente con gli effettori del sistema immunitario (Desneux *et al.*, 2007; James & Xu, 2012).

La cascata enzimatica della profenolossidasi (proPO) è una difesa umorale che è coinvolta in processi fisiologici come la melanizzazione cuticolare e la sclerotizzazione, la coagulazione, l'incapsulamento, e la produzione di molecole citotossiche (Marmaras *et al.*, 1996; González & Córdoba, 2012; Moreno-Garcia *et al.*, 2012). L'esposizione in campo ai trattamenti effettuati ha fortemente influenzato sia i valori di fenolossidasi che i valori attività litica dell'emolinfa, infatti negli individui catturati nei campi a conduzione convenzionale, questi valori sono molto più bassi di quelli registrati negli individui catturati nei campi a conduzione organica. Si è già visto in alcuni studi condotti sui carabidi, che i valori di fenolossidasi basale registrati in adulti di *Calathus fuscipes*, catturati in un campo di patate a conduzione convenzionale, risultano influenzati dai trattamenti in campo (Giglio *et al.*, 2017), indicando così che la risposta immunitaria degli insetti può variare se questi sono esposti a determinati pesticidi (Desneux *et al.*, 2007; James & Xu, 2012). Recenti studi hanno documentato una relazione tra i livelli di PO nell'emolinfa, l'ispessimento cuticolare e la resistenza ai piretroidi nelle zanzare (Wood *et al.*, 2010; Cornet *et al.*, 2013; Kasai *et al.*, 2014). I piretroidi, a causa della loro natura lipofila, si dissolvono dentro lo strato di cera esterno, penetrano nella cuticola e vengono trasportati dall'emolinfa in tutti i tessuti (Lin *et al.*, 2012; Kasai *et al.*, 2014). La riduzione delle risposte umorali può comportare un aumento della suscettibilità di questa specie ai patogeni che modifica altri tratti fondamentali come la riproduzione, l'attività di dispersione e la predazione, con conseguenti cambiamenti nella struttura della popolazione, e con una riduzione dell'attività di biocontrollo per le specie

infestanti negli agroecosistemi. Studi immunologici hanno dimostrato che la risposta immunitaria è strettamente legata ai diversi tratti vitali degli insetti e svolge un ruolo cruciale nel mantenimento dell'omeostasi e nella prevenzione di malattie e infezioni (Schmid-Hempel, 2005). Il mantenimento del sistema immunitario ha un suo costo fisiologico (Sadd & Smith Hempel, 2009) che deriva da un compromesso basato sulle risorse tra la difesa immunitaria e altri tratti vitali (Rolff & Siva-Joty 2003). L'attivazione della cascata di PO ha un costo energetico ed è quindi correlata all'alimentazione (Hillyer, 2016). Per ripristinare i livelli plasmatici diminuiti dopo i trattamenti in campo, è necessaria una maggior quantità di risorse rispetto a quella spesa per il mantenimento, e una maggiore quantità di tempo, e di conseguenza si avrà un malfunzionamento cronico della risposta umorale.

Pertanto, i risultati hanno indicato che il continuo contatto con la quantità residua di pesticidi nel suolo può risultare dannoso per insetti come *Harpalus rufipes* che svolgono metamorfosi, attività di foraggiamento, e riproduzione su terreni trattati.

Nonostante i bassi valori di fenolossidasi e lisozima riscontrati nelle popolazioni catturate nei campi convenzionali, la densità di attività di questa specie risulta molto più alta in questi campi rispetto ai campi a conduzione organica. Questo paradosso può essere collegato al fatto che basse dosi sub-letali di alcuni insetticidi, possono indurre una modulazione omeostatica delle attività fisiologiche che stimolano la riproduzione ormonale e la crescita della popolazione (Cutler & Guedes, 2017). Alcuni studi, infatti, hanno mostrato che un aumento della popolazione di insetti può essere dovuto all'effetto indiretto dell'applicazione di erbicidi (Sharma *et al.*, 2018). Studi condotti sulle popolazioni dei Carabidi in un campo di erba medica convenzionale e uno organico, hanno evidenziato che in alcune specie come *Harpalus rufipes*, il numero di individui, sebbene non significativamente diverso, era più elevato nei campi gestiti in modo convenzionale, che includeva l'uso di erbicidi (Kolařík *et al.*, 2014).

Le analisi condotte sugli emociti di *Harpalus rufipes* hanno mostrato che questa specie subisce l'esposizione agli erbicidi, anche se applicati alle dosi raccomandate. L'aumento del danno a livello del DNA riscontrato negli individui

catturati a Maggio nel campo convenzionale, è causato molto probabilmente dai trattamenti effettuati circa 2 mesi prima con erbicidi a base di metribuzina, clomazone e pendimethalin. Negli individui catturati nello stesso campo il mese di Giugno, si osserva una riduzione del danno al DNA rispetto agli esemplari campionati all'inizio di Maggio. Questo risultato può essere correlato al tempo di degradazione degli erbicidi spruzzati prima e durante il nostro campionamento. Gli erbicidi variano nel loro potenziale di persistenza nel suolo, e la durata del tempo di persistenza è correlata ai fattori del suolo (pH, composizione, attività microbica) e alle condizioni climatiche (Smith & Walker, 1989; Jablonowski *et al.*, 2009; Tomco *et al.*, 2010; Sevilla-Morán *et al.*, 2013). Nonostante il basso valore di danno al DNA registrato nei campioni catturati nel campo di patate a conduzione organica (MT), il livello di Tail Moment registrato negli emociti indica un numero elevato di cellule danneggiate. Questo perché probabilmente i semi di ricino (Ricin-Xed[®]) utilizzati come concime concesso in agricoltura biologica, hanno determinato tale risultato. Infatti, in alcuni studi sui mammiferi, è noto che la ricina induce la frammentazione del DNA (Muldoon *et al.*, 1992; Khan & Waring, 1993; Kumar *et al.*, 2007; Sestili *et al.*, 2005), anche se poco si sa sugli effetti che questa sostanza causa agli insetti.

I trattamenti effettuati nei campi a conduzione convenzionale non hanno effetti sulle dimensioni del corpo, il dimorfismo sessuale è risultato invariato negli individui in tutti e due i campi monitorati, con gli individui di sesso femminile più grandi dei maschi. Le uniche differenze significative sono state trovate nella lunghezza del capo dei maschi e nella distanza inter oculare delle femmine, con dimensioni minori negli individui catturati nei campi a conduzione convenzionale. Questa riduzione delle dimensioni può essere il risultato di scarse scorte di cibo a causa della mortalità di prede (Le Paire *et al.*, 2010), poiché la bassa disponibilità di cibo ha un impatto sullo sviluppo larvale e sul sistema endocrino, e va a determinare i cambiamenti nelle dimensioni degli adulti (Giglio *et al.*, 2011). L'asimmetria riscontrata nelle elitre dei maschi catturati nei campi a conduzione convenzionale, indica che la costante esposizione a sostanze chimiche nel tempo potrebbe avere a lungo andare un effetto sulle popolazioni. Probabilmente, ulteriori analisi su altre specie, che occupano altri

livelli trofici o con fenologie diverse dalla specie usata come modello, potranno confermare come l'elevato numero dei trattamenti effettuati nei campi convenzionali influisce sulla morfogenesi (Weller & Ganzhorn, 2004; Magura et al., 2005).

CONCLUSIONE

I risultati hanno dimostrato che l'esposizione in campo agli agrochimici comporta modificazioni significative dei parametri esaminati su specie non bersaglio, e si allineano con quanto osservato da Holland & Luff (2000), Koivula, (2011), Kotze *et al.* (2011), James & Xu (2013).

Le pratiche convenzionali di gestione agricola stanno determinando il declino dell'abbondanza e della biodiversità dei Coleotteri Carabidi che vivono nei sistemi agricoli, i quali rivestono un importante ruolo ecologico in quanto sono coinvolti nel controllo naturale delle specie infestanti (Holland, 2000), come afidi, uova, larve e pupe di ditteri e/o di coleotteri, lepidotteri e lumache.

Harpalus rufipes è risultato essere un buon modello per gli studi sul monitoraggio ambientale, ma visti i pochi dati che si hanno ancora su questo argomento, è difficile stabilire se l'esposizione a tali sostanza comporti delle modificazioni genetiche trasmissibili e/o che non si tratti invece, come è probabile, di modificazioni transitorie della risposta fisiologica dell'organismo.

Lo studio della biodiversità dei campi agricoli e la loro conservazione, è un argomento di fondamentale importanza al fine di mantenere un ambiente stabile, e di far fronte all'impatto che le pratiche agricole hanno sulla biodiversità stessa, uomo compreso. L'agricoltura organica, viste le condizioni microclimatiche e le risorse trofiche che offre, è considerata di supporto alla biodiversità dei Coleotteri Carabidi.

BIBLIOGRAFIA

- **Abaga N. O. Z., Alibert P., Dousset S., Savadogo P. W., Savadogo M., & Sedogo M., 2011.** Insecticide residues in cotton soils of Burkina Faso and effects of insecticides on fluctuating asymmetry in honey bees *Apis mellifera* Linnaeus. *Chemosphere* 834: 585 - 592.
- **Ahmad I., Ahmad A., Ahmad M., 2016.** Binding properties of pendimethalin herbicide to DNA: multispectroscopic and molecular docking approaches. *Physical Chemistry Chemical Physics* 18(9): 6476-6485.
- **Akmoutsou P., Mademtzoglou D., Nakou I., Onoufriadis A., Papadopoulou X., Kounatidis I., Frantzios G., Papadakis G., Vasiliadis K., Papadopoulos N.T., & Mavragani-Tsipidou P., 2011.** Evaluation of toxicity and genotoxic effects of spinosad and deltamethrin in *Drosophila melanogaster* and *Bactrocera oleae*. *Pest management science* 67(12): 1534 - 1540.
- **Asteraki E. J., 1993.** The potential of carabid beetles to control slugs in grass/clover swards. *Entomophaga* 38(2): 193 - 198.
- **Augustyniak M., Gladysz M., Dziewięcka M., 2016.** The Comet assay in insects - Status, prospects and benefits for science. *Mutation Research* 767:67 - 76.
- **Avishai N., Rabinowitz C., Rinkevich B., 2003.** Use of the Comet Assay for Studying Environmental Genotoxicity. Comparisons Between Visual and Image Analyses. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 42:155 - 165.
- **Azqueta A. & Collins A. R., 2013.** The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Archives Toxicology* 87: 949 - 968.
- **Azqueta A., Slyskova J., Langie S. A., O'Neill Gaivão I., Collins A., 2014.** Comet assay to measure DNA repair: approach and applications. *Frontiers in genetics* 5: 288.
- **Bianchi F. J., Booij C. J. H., Tschardt T., 2006.** Sustainable pest regulation in agricultural landscapes: a review on landscape composition, biodiversity and natural pest control. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 273(1595): 1715 - 1727.

- **Bommarco R. 1998.** Stage sensitivity to food limitation for a generalist arthropod predator, *Pterostichus cupreus* Coleoptera: Carabidae. *Environmental Entomology* 274: 863 - 869.
- **Brandmayr P. & Zetto Brandmayr T., 1987.** The problem of prosocial behaviour in Ditomine ground beetles. *Ethological perspectives in social and presocial arthropods* 36: 15 – 18
- **Brandmayr P., Zetto Brandmayr T., Pizzolotto R., 2005.** I Coleotteri Carabidi per la valutazione ambientale e la conservazione della biodiversità. Manuale operativo APAT. Manuali e linee guida, 34.
- **Bravi R., & Benítez H. A., 2013.** Left - right asymmetries and shape analysis on *Ceroglossus chilensis* Coleoptera: Carabidae. *Acta oecologica* 52: 57 - 62.
- **Brehèlin M., Zachary D. and Hoffmann J. A., 1978.** A comparative ultrastructural study of blood cells from nine insect order. *Cell and tissue reserch* 195: 45 - 57.
- **Brivio M. F., Mazzei C., & Scari G., 1996.** proPO system of *Allogamus auricollis* (Insecta): effects of various compounds on phenoloxidase activity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 113(2): 281 – 287.
- **Brust G.E., 1990.** Direct and indirect effects of four herbicides on the activity of carabid beetles Coleoptera: Carabidae. *Pest Management Science* 30: 309 - 320.
- **Brygadyrenko V. V, Reshetniak D.Y., 2014.** Trophic preferences of *Harpalus rufipes* Coleoptera, Carabidae with regard to seeds of agricultural crops in conditions of laboratory experiment. *Baltic Journal of Coleopterology* 14: 179 - 190.
- **Callewaert L., & Michiels C. W., 2010.** Lysozymes in the animal kingdom. *Journal of Bioscience* 35: 127 - 160.
- **Cerenius L., Lee Bok L. & Soderhall K., 2008.** The propo-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends in Immunology* Vol.29 No.6.
- **Chown S. L., & Gaston K. J. 2010.** Body size variation in insects: a macroecological perspective. *Biological Reviews* 851: 139-169.

- **Cobb A. H., & Reade J. P., 2011.** *Herbicides and plant physiology*. John Wiley & Sons.
- **Collins A. R., 2004.** The Comet Assay for DNA Damage and Repair Principles, Applications, and Limitations. *Molecular Biotechnology* Volume 26.
- **Collins K. L., Boatman N. D., Wilcox A., Holland J. M., & Chaney K., 2002.** Influence of beetle banks on cereal aphid predation in winter wheat. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 931(3): 337 - 350.
- **Cornet S., Gandon S., Rivero A., 2013.** Patterns of phenoloxidase activity in insecticide resistant and susceptible mosquitoes differ between laboratory-selected and wildcaught individuals. *Parasites & Vectors* 6 (1): 315.
- **Cotelle S. & Férard F., 1999.** Comet Assay in Genetic Ecotoxicology: A Review. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 34: 246 – 255.
- **Cutler G. C., & Guedes R. N. 2017.** Occurrence and significance of insecticide-induced hormesis in insects. In *Pesticide dose: effects on the environment and target and non-target organisms*. American Chemical Society pp. 101-119.
- **Damalas C. A., & Eleftherohorinos I. G., 2011.** Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. *International journal of environmental research and public health* 85: 1402 - 1419.
- **Danilova N., 2006.** The Evolution of Immune Mechanisms. *Journal of experimental zoology part b molecular and developmental evolution* 306: 496 - 520.
- **De Anna E. B., Bonisoli-Alquati A., & Mousseau T. A., 2013.** The use of fluctuating asymmetry as a measure of environmentally induced developmental instability: A meta-analysis. *Ecological Indicators* 30: 218 - 226.
- **De La Fuente H. B., Vidal M., Briones R., & Jerez V. 2010.** Sexual Dimorphism and Morphological Variation in Populations of *Ceroglossus chilensis* Eschscholtz, 1829 Coleoptera: Carabidae. *Journal of Entomological Research Society* 122: 87 - 95.
- **De Lapuente J., Lourenço J., Mendo S.A., Borràs M., Martins M.G., Costa P.M., Pacheco M. 2015.** The Comet Assay and its applications in the

field of ecotoxicology: a mature tool that continues to expand its perspectives. *Frontiers in Genetics* 6:180.

- **Delpuech J. M., Frey F., & Carton Y., 1996.** Action of insecticides on the cellular immune reaction of *Drosophila Melanogaster* against the parasitoid *Leptopilina boulandi*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 15(12): 2267 - 2271.
- **Desneux N., Decourtye A., Delpuech J. M., 2007.** The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annual Review of Entomology* 52: 81 - 106.
- **Dhawan A., Bajpayee M., Parmar D., 2009.** Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biology Toxicology* 25: 5 - 32.
- **Döring T. F., & Kromp B., 2003.** Which carabid species benefit from organic agriculture? A review of comparative studies in winter cereals from Germany and Switzerland. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 98(1-3): 153 - 161.
- **Dubrovskaya N. A., 1970.** Field carabid beetles Coleoptera: Carabidae of Byelorussia. *Entomological Review* 49: 476 - 483.
- **Dushay M., 2009.** Insect hemolymph clotting Cellular and Molecular. *Life Sciences* 66: 2643 - 2650.
- **George E. P. J., & Ambrose D. P. 2004.** Impact of insecticides on the haemogram of *Rhynocoris kumarii* Ambrose and Livingstone (Hem., Reduviidae). *Journal of Applied Entomology* 128(9-10): 600 - 604.
- **Eyre M.D., Luff M.L., Leifert C., 2013.** Crop, field boundary, productivity and disturbance influences on ground beetles Coleoptera, Carabidae in the agroecosystem, *Agriculture, Ecosystems & Environment* 165: 60 - 67.
- **Faly L., Brygadyrenko V., 2014.** Patterns in the horizontal structure of litter invertebrate communities in windbreak plantations in the steppe zone of the Ukraine. *Journal of Plant Protection Research* 54: 414 - 420.
- **Farinós G.P., de la Poza M., Hernández-Crespo P., Ortego F., Castañera P., 2008.** Diversity and seasonal phenology of aboveground arthropods in conventional and transgenic maize crops in Central Spain. *Biological Control* 44: 362 - 371.

- **Floate K.D., Elliott R.H., Doane J.F., and Gillott C., 1989.** Field bioassay to evaluate contact and residual toxicities of insecticides to carabid beetles (Coleoptera: Carabidae). *Journal of Economic Entomology* 82: 1543 – 7.
- **Freemark K., Boutin C., 1995.** Impacts of agricultural herbicide use on terrestrial wildlife in temperate landscapes: A review with special reference to North America. *Agriculture Ecosystems and Environmental Journal* 52: 67 - 91.
- **Garnier S., Gidaszewski N., Charlot M., Rasplus J. Y., & Alibert P. 2006.** Hybridization, developmental stability, and functionality of morphological traits in the ground beetle *Carabus solieri* Coleoptera, Carabidae. *Biological Journal of the Linnean Society* 891: 151 - 158.
- **Ghosh J. Cheng M. L., Majeske A. J., Sacchi S., Schrankel C. S., Smith L. C., 2011.** Invertebrate immune diversity. *Developmental and Comparative Immunology* 35: 959 - 974.
- **Gillespie J.P., Kanost M.R., TrenzczekT., 1997.** Biological mediators of insect immunity. *Annual Review of Entomology* 42: 611 – 643.
- **Giglio A., Cavaliere F., Giulianini P. G., Mazzei A., Talarico, F., Vommaro, M. L., & Brandmayr, P., 2017.** Impact of agrochemicals on non-target species: *Calathus fuscipes* Goeze 1777 Coleoptera: Carabidae as model. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 142: 522 - 529.
- **Giglio A., Giulianini P. G., Zetto T., & Talarico F., 2011.** Effects of the pesticide dimethoate on a non-target generalist carabid, *Pterostichus melas italicus* Dejean, 1828 Coleoptera: Carabidae. *Italian Journal of Zoology* 784: 471 - 477.
- **Glei M., Schneider T., & Schlörmann W., 2016.** Comet assay: an essential tool in toxicological research. *Archives of Toxicology* 9010: 2315 - 2336.
- **Godfrey J. A., & Rypstra A. L. 2018.** Impact of an atrazine-based herbicide on an agrobiont wolf spider. *Chemosphere* 201: 459 - 465.
- **González-Santoyo I. & Córdoba-Aguilar A., 2012.** Phenoloxidase: a key component of the insect immune system. *Entomologia Experimentaliset Applicata* 142: 1 - 16.
- **González-Tokman D., Martínez-Morales I., Farrera A., del Rosario Ortiz-Zayas M., Lumaret J., 2017.** Effects of an herbicide on physiology,

morphology, and fitness of the dung beetle *Euoniticellus intermedius* Coleoptera: Scarabaeidae. *Environmental Toxicology and Chemistry* 36: 96 - 102.

- **Gyori B. M., Venkatachalam G., Thiagarajan P. S., Hsu, D., & Clement M. V., 2014.** OpenComet: an automated tool for *Comet assay* image analysis. *Redox biology* 2: 457 - 465.
- **Harwood J. D., Phillips S.W., Lello J., Sunderland K. D., Glen D. M., Bruford M. W., ... & Symondson W. O., 2009.** Invertebrate biodiversity affects predator fitness and hence potential to control pests in crops. *Biological Control* 51(3): 499 - 506.
- **Hillyer J.F., 2016.** Insect immunology and hematopoiesis. *Developmental & Comparative Immunology* 58: 102 – 118.
- **Hoffmann J. A., Reichhart J. M. and Hetru C. 1996.** Innate immunity in higher insect. *Current Opinion in Immunology* 8:8 - 13.
- **Hoffmann A. A., Woods R. E., Collins E., Wallin K., White A., & McKenzie J. A., 2005.** Wing shape versus asymmetry as an indicator of changing environmental conditions in insects. *Australian Journal of Entomology* 443: 233 - 243.
- **Holland J. M., Luff M. L., 2000.** The effects of agricultural practices on Carabidae in temperate agroecosystems. *Integrated Pest Management Reviews* 5: 109 – 129.
- **Holland J.M., 2002.** Carabid beetles : Their ecology, survival and use in agroecosystems. *Agroecology of Carabid Beetles*. Intercept, Andover, UK.
- **Honczarenko J., 1975.** The effects of high doses of nitrogenous fertilizers on the Insecta of meadow soils. *Pedobiologia* 16: 58 - 62.
- **Honek A., Jarosik V., 2000.** The role of crop density, seed and aphid presence in diversification of field communities of Carabidae (Coleoptera). *European Journal of Entomology* 97: 517 - 525.
- **Honek, A., Martinkova, Z., Jarosik, V., 2003.** Ground beetles Carabidae as seed predators. *European Journal of Entomology* 100 (4): 431 – 544.

- **Hutcheson J., Jones D., 1999:** Spatial variability of insect communities in a homogenous system: Measuring biodiversity using Malaise trapped beetles in a *Pinus radiata* plantation in New Zealand. *Forest Ecology and Management* 118: 93 - 105.
- **Idinger J., Kromp B., & Steinberger K. H., 1996.** Ground photoeclector evaluation of the numbers of carabid beetles and spiders found in and around cereal fields treated with either inorganic or compost fertilizers. In *Arthropod Natural Enemies in Arable Land, 2, Wageningen Netherlands, 1-3 Dec 1994. Acta Jutlandica.*
- **Irmeler U., 2003.** The spatial and temporal pattern of carabid beetles on arable fields in northern Germany Schleswig-Holstein and their value as ecological indicators. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 98: 141 - 151.
- **Jablonowski N. D., Köppchen S., Hofmann D., Schäffer A., & Burauel P., 2009.** Persistence of ¹⁴C-labeled atrazine and its residues in a field lysimeter soil after 22 years. *Environmental Pollution* 1577: 2126 - 2131.
- **James R.R., Xub J., 2012.** Mechanisms by which pesticides affect insect immunity. *Journal of Invertebrate Pathology* 109:175 - 182.
- **Jha A. N., 2008.** Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis* 23(3): 207 - 221.
- **Kasai S., Komagata O., Itokawa K., Shono T., Ng L.C., Kobayashi M., Tomita T., 2014.** Mechanisms of pyrethroid resistance in the dengue mosquito vector, *Aedes aegypti*: target site insensitivity, penetration, and metabolism. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8(6): e2948.
- **Kataev B. M., & Liang, H. O. N. G. B. I. N., 2015.** Taxonomic review of Chinese species of ground beetles of the subgenus *Pseudoophonus* genus *Harpalus* Coleoptera: Carabidae. *Zootaxa* 39201: 1 - 39.
- **Kaya B., Yanikoğlu A., Creus A., Marcos R., 2000.** Genotoxicity testing of five herbicides in the *Drosophila* wing spot test. *Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 465: 77 - 84.
- **Khan T., Waring P., 1993.** Macrophage adherence prevents apoptosis induced by ricin. *European journal of cell biology* 62: 406 - 414.

- **Koivula M. J. 2011.** Useful model organisms, indicators, or both? Ground beetles Coleoptera, Carabidae reflecting environmental conditions. *ZooKeys* 100: 287 - 317.
- **Kolařík P., Rotrekl J., Barták M., Krupauerová A., Frydrych J., 2014.** A comparison of ground beetle assemblages Coleoptera: Carabidae in conventionally and ecologically managed alfalfa fields. *Journal of Entomological and Acarological Research* 46: 102 - 106.
- **Korenko S., Niedobová J., Kolářová M., Hamouzová K., Kysilková K., Michalko R., 2016.** The effect of eight common herbicides on the predatory activity of the agrobiont spider *Pardosa agrestis*. *BioControl* 61: 507 - 517.
- **Kotze D. J. D., Brandmayr P., Casale A., Dauffy R. E., Dekoninck W., Koivula M. J., Lövei G., Mossakowski D., Noordijk J., Paarmann W., Pizzolotto R., Saska P., Schwerk A., Serrano J., Szyszko J., Taboada A., Turin H., Venn S., Vermeulen R., Zetto T., 2011.** Forty years of carabid beetle research in Europe – from taxonomy, biology, ecology and population studies to bioindication, habitat assessment and conservation. *ZooKeys* 100: 55 - 148.
- **Kromp B., 1999.** Carabid beetles in sustainable agriculture: a review on pest control efficacy, cultivation impacts and enhancement. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 74: 187 - 228.
- **Kumar O., Lakshmana Rao P. V., Pradhan S., Jayaraj R., Bhaskar A.S., Nashikkar A.B., Vijayaraghavan, R., 2007.** Dose dependent effect of ricin on DNA damage and antioxidant enzymes in mice. *Cellular and molecular biology Noisy-le-Grand, France* 53: 92 - 102.
- **Laparie M., Lebouvier M., Lalouette L., & Renault D., 2010.** Variation of morphometric traits in populations of an invasive carabid predator *Merizodus soledadinus* within a sub-Antarctic island. *Biological invasions* 1210: 3405 - 3417.
- **Lavine M.D., Strand M.R., 2002.** Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32: 1295 - 1309.
- **Li Y., Xiang Q. Q. Zhang Q., Huang Y., Sua Z., 2012.** Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides* 37: 207 - 215.
- **Lin Y., Jin T., Zeng L., Lu Y., 2012.** Cuticular penetration of β -cypermethrin

in insecticide-susceptible and resistant strains of *Bactrocera dorsalis*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 103 (3): 189 – 193.

- **Lövei, G.L., Sarospataki, M., 1990.** Carabids in agricultural fields in Eastern Europe. in: *Stork, Ne Ed. the Role of Ground Beetles in Ecological and Environmental Research*. Intercept Ltd., Hanover, Uk. pp. 87–93.
- **Lövei G., Liu W., Guo J., Wan F., 2013.** The use of the Rényi scalable diversity index to assess diversity trends in comparative and monitoring studies of effects of transgenic crops. *Journal of biosafety* 221: 43 - 50.
- **Ma Z. Q., Han X.L., Feng J. T., Li G. Z., & Zhang X., 2008.** Effects of terpinen-4-ol on 4 kinds of metabolizing enzymes and PPO in *Mythimna separata* Walker (J). *Scientia Agricultura Sinica*, 2.
- **Magura T., Tóthmérész B., & Elek Z.; 2005.** Impacts of leaf-litter addition on carabids in a conifer plantation. *Biodiversity & Conservation* 14(2): 475.
- **Magura T., Tóthmérész B., & Lövei G. L., 2006.** Body size inequality of carabids along an urbanisation gradient. *Basic and Applied Ecology* 75: 472 - 482.
- **Maryanski M., Kramarz P., Laskowski R., & Niklinska M., 2002.** Decreased energetic reserves, morphological changes and accumulation of metals in carabid beetles (*Poecilus cupreus* L.) exposed to zinc-or cadmium-contaminated food. *Ecotoxicology* 11(2): 127 – 139.
- **Marmaras V. J., Charalambidis N. D. And Zervas C. G., 1996.** Immune response in insect: The role of phenoloxidase in defense reactions in relation to melanisation and sclerotization. *Archives of insect biochemistry and Physiology* 31: 119 - 133.
- **Marmaras V. J., Lampropoulou M., 2009.** Regulators and signalling in insect haemocyte immunity. *Cellular Signalling* 21: 186 - 195.
- **Matalin A. V, 2007.** Typology of life cycles of ground beetles Coleoptera, Carabidae in Western Palaearctic. *Entomological Review* 87: 947 - 972.
- **McGeoch M. A., 1998.** The selection, testing and application of terrestrial insects as bioindicators. *Biological reviews* 732: 181 - 201.

- **Merivee E., Tooming E., Must A., Sibul I., & Williams I. H., 2015.** Low doses of the common alpha-cypermethrin insecticide affect behavioural thermoregulation of the non-targeted beneficial carabid beetle *Platynus assimilis* (Coleoptera: Carabidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 120: 286 - 294.
- **Michalková V., Pekár S., 2009.** How glyphosate altered the behaviour of agrobiont spiders (Araneae: Lycosidae) and beetles (Coleoptera: Carabidae). *Biological Control Journal* 51(3): 444 – 449.
- **Miñarro M., Dapena E., 2003.** Effects of groundcover management on ground beetles Coleoptera: Carabidae in an apple orchard. *Applied Soil Ecology* 23: 111 – 117.
- **Miñarro M., Espadaler X., Melero V.X., Suárez-Álvarez V., 2009.** Organic versus conventional management in an apple orchard: Effects of fertilization and tree-row management on ground-dwelling predaceous arthropods. *Agricultural and Forest Entomology* 11: 133 – 142.
- **Monzó C, Sabater-Muñoz B, Urbaneja A, Castañera P. , 2011.** The ground beetle *Pseudophonus rufipes* revealed as predator of *Ceratitis capitata* in *Citrus* orchards. *Biological Control* 56: 17 – 21.
- **Moreno-Garcia M., Còrdoba-Aguilar A., Condè R., Lanz-Mendoza H., 2012.** Current immunity markers in insect ecological immunology: assumed trade-offs and methodological issues. *Bulletin of Entomological Research* 103: 127 – 139.
- **Muldoon D.F., Hassoun E.A., Stohs S.J., 1992.** Ricin-induced hepatic lipid peroxidation, glutathione depletion, and DNA single-strand breaks in mice. *Toxicol* 30: 977 - 984.
- **Nappi A. J. And Ottaviani E., 2000.** Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *Bioessays* 22(5): 469 - 480.
- **Naylor R.E.L., 2008.** Weed Management Handbook. John Wiley & Sons.
- **Nasr H. M., Badawy M. E., & Rabea E. I., 2010.** Toxicity and biochemical study of two insect growth regulators, buprofezin and pyriproxyfen, on cotton leafworm *Spodoptera littoralis*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 98(2): 198 – 205.

- **Niemeyer J.C., De Santo F.B., Guerra N., Filho A.M.R., Pech T.M., 2018.** Do recommended doses of glyphosate-based herbicides affect soil invertebrates? Field and laboratory screening tests to risk assessment. *Chemosphere* 198: 154 - 160.
- **Olive P.L., Banath J.P., Durand R.E., 1990.** Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the “Comet” assay. *Radiation Research* 122: 86 - 94.
- **Ottaviani E., 2005.** Insect immunorecognition. *Invertebrate Survival Journal* 2: 142 - 151.
- **Palmer A. R., 1996.** From symmetry to asymmetry: phylogenetic patterns of asymmetry variation in animals and their evolutionary significance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 9325: 14279 - 14286.
- **Pizzolotto R., 1993.** Carabid beetle (Coleoptera, Carabidae) coenoses for evaluation of faunal resources and impact assessment in the Aspromonte National Park of Calabria (Italy). *Coenoses* 8(2): 69-79.
- **Prosser R. S., Andersonb J. C., Hansonc M. L., Solomona K. R., Sibleya P. K., 2016.** Indirect effects of herbicides on biota in terrestrial edge-of-field habitats: A critical review of the literature. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 232: 59 - 72.
- **Purtauf T., Roschewitz I., Dauber J., Thies C., Tschardt T., & Wolters V., 2005.** Landscape context of organic and conventional farms: influences on carabid beetle diversity. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 1082: 165 - 174.
- **Rainio J. & Niemela J., 2003.** Ground beetles Coleoptera: Carabidae as bioindicators. *Biodiversity and Conservation* 12(3): 487 – 506.
- **Renkema J. M., Manning P., & Cutler G. C., 2013.** Predation of lowbush blueberry insect pests by ground beetles (Coleoptera: Carabidae) in the laboratory. *Journal of pest science* 86(3): 525 - 532.
- **Rolff J. And Siva-Jothy M.T., 2003.** Invertebrate Ecological Immunology. *Science* 301(5632): 472 – 475.
- **Rolff J. & Siva-Jothy M.T., 2004.** Selection on insect immunity in the wild. *The royal society* 271: 2157 - 2160.

- **Sadd B. M. And Schmid-Hempel P., 2009.** Principles of ecological immunology. *Evolutionary Applications* 2(1): 113 - 121.
- **Sánchez-Bayo F., Tennekes H.A., Goka K., 2013.** Impact of Systemic Insecticides on Organisms and Ecosystems InTech.
- **Saska P., Martinkova Z., Honek A., 2010.** Temperature and rate of seed consumption by ground beetles Carabidae. *Biological Control* 52: 91 - 95.
- **Schmid-Hempel P., 2005.** Evolutionary ecology of insect immune defenses. *Annual Review of Entomology* 50: 529 - 51.
- **Sestili P., Alfieri R., Carnicelli D., Martinelli C., Barbieri L., Stirpe F., Bonelli M., Petronini P.G., Brigotti M., 2005.** Shiga toxin 1 and ricin inhibit the repair of H₂O₂-induced DNA single strand breaks in cultured mammalian cells. *DNA repair* 4: 271 - 277.
- **Sevilla-Morán B., López-Goti C., Alonso-Prados J.L., Sandín-España P., 2013.** Degradation of cyclohexanedione oxime herbicides. in: *Herbicides-Advances in Research*. InTechOpen.
- **Sharma A., Jha P., Reddy G.V.P., 2018.** Multidimensional relationships of herbicides with insect-crop food webs. *Science of the Total Environment* 643: 1522 - 1532.
- **Singh N. P., 2000.** A simple method for accurate estimation of apoptotic cells. *Experimental cell research*, 256(1): 328-337.
- **Singh N.P., M.T. McCoy, R.R. Tice, Schneider E.L., 1988.** A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells *Experimental Cell Research* 17(1): 184 - 191.
- **Siva-Jothy M. T., Moret Y., Rolff J., 2005.** Insect Immunity: An Evolutionary Ecology Perspective. *Advances in insect physiology* vol. 32.
- **Smith A.E., Walker A., 1989.** Prediction of the persistence of the triazine herbicides atrazine, cyanazine, and metribuzin in Regina heavy clay. *Canadian Journal of Soil Science* 69: 587 – 595
- **Sokal R. R., & Rohlf F. J., 1981.** *Biometry*. Freeman and Company, San Francisco. pp 859.
- **Stellin F., Gavinelli F., Stevanato P., Concheri G., Squartini A., Paoletti**

- M.G., 2018.** Effects of different concentrations of glyphosate Roundup 360® on earthworms *Octodrilus complanatus*, *Lumbricus terrestris* and *Aporrectodea caliginosa* in vineyards in the North-East of Italy. *Applied Soil Ecology* 123: 802 - 808.
- **Stinner B. R., & House G. J., 1990.** Arthropods and other invertebrates in conservation-tillage agriculture. *Annual Review of entomology* 35: 299 - 318.
 - **Strand M. R., 2008.** The insect cellular immune response. *Insect science* 15: 1 - 14.
 - **Sukhodolskaya R., 2014.** Variation in body size and body shape in ground beetle *Pterostichus melanarius* III. Coleoptera, Carabidae. *Journal of Agri-Food and Applied Sciences* 27: 196 - 205.
 - **Swaddle J. P., Witter M. S., & Cuthill I. C., 1994.** The analysis of fluctuating asymmetry. *Animal Behaviour* 48: 986 - 989.
 - **Symondson W. O. C., 1989.** Biological control of slugs by carabids. *Biological control of slugs by carabids* 41: 295 – 300.
 - **Symondson W.O.C., Sunderland K.D., Greenstone M.H., 2002.** Can generalist predators be effective biocontrol agents? *Annual Review of Entomology* 47: 561 - 594.
 - **Szekeres D., Kádár F., & Kiss J., 2006.** Activity density, diversity and seasonal dynamics of ground beetles Coleoptera: Carabidae in Bt-MON810 and in isogenic maize stands. *Entomologica Fennica* 17(3): 269.
 - **Talarico F., Giglio A., Pizzolotto R., Brandmayr P., 2016.** A synthesis of feeding habits and reproduction rhythm in Italian seed-feeding ground beetles Coleoptera: Carabidae. *European Journal of Entomology* 113: 325 - 336.
 - **Theopold U., Schmidt O., Soderhall K. E Dushay M.S., 2004.** Coagulation in arthropods: defence, wound closure and healing. *Trends in Immunology* 25: 289 - 294.
 - **Thomas C., Parkinson L., Griffiths G.J.K., Garcia A.F., Marshall E.J.P., 2001.** Aggregation and temporal stability of carabid beetle distributions in field and hedgerow habitats. *Journal of Applied Ecology* 38: 100 - 116.

- **Tomco P.L., Holstege D.M., Zou W., Tjeerdema R.S., 2010.** Microbial degradation of clomazone under simulated California rice field conditions. *Journal of agricultural and food chemistry* 58: 3674 - 3680.
- **Tooming E., Merivee E., Must A., Sibul I., & Williams I., 2014.** Sub-lethal effects of the neurotoxic pyrethroid insecticide Fastac® 50EC on the general motor and locomotor activities of the non-targeted beneficial carabid beetle *Platynus assimilis* (Coleoptera: Carabidae). *Pest Management Science*, 70(6): 959 - 966.
- **Tooming E., Merivee E., Must A., Merivee M. I., Sibul I., Nurme K., & Williams I. H., 2017.** Behavioural effects of the neonicotinoid insecticide thiamethoxam on the predatory insect *Platynus assimilis*. *Ecotoxicology* 26(7): 902 - 913.
- **Traugott M., 1998.** Larval and adult species composition, phenology and life cycles of carabid beetles Coleoptera: Carabidae in an organic potato field. *European Journal of Soil Biology* 34: 189 - 197.
- **Varchola J. M., & Dunn J. P., 2001.** Influence of hedgerow and grassy field borders on ground beetle Coleoptera: Carabidae activity in fields of corn. *Agriculture, ecosystems & environment* 831(29): 153 - 163.
- **Wood O.R., Hanrahan S., Coetzee M., Koekemoer L.L., Brooke B.D., 2010.** Cuticle thickening associated with pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus*. *Parasites & Vectors* 3 (1): 67.
- **Weller B., & Ganzhorn J. U., 2004.** Carabid beetle community composition, body size, and fluctuating asymmetry along an urban-rural gradient. *Basic and Applied Ecology*: 52: 193 - 201.
- **Wilczek G., Mędrzak M., Augustyniak M., Wilczek P., & Stalmach M., 2016.** Genotoxic effects of starvation and dimethoate in haemocytes and midgut gland cells of wolf spider *Xerolycosa nemoralis* (Lycosidae). *Environmental pollution* 213: 370 - 378.
- **Zaller J.G., Moser D., Drapela T., Frank T., 2008.** Ground-dwelling predators can affect within-field pest insect emergence in winter oilseed rape fields. *BioControl* 54(2): 247.
- **Zhang J.X., Drummond F.A., Leibman M., 1998.** Effect of crop habitat and potato management practices on the population abundance of adult *Harpalus*

rufipes Coleoptera: Carabidae in Maine. *Journal of Agricultural Entomology* 15: 63 - 74.

- **Zhang, J., Drummond F.A., Liebman M., Hartke A., 1997.** Phenology and dispersal of *Harpalus rufipes* DeGeer Coleoptera: Carabidae in agroecosystems in Maine. *Journal of Agricultural Entomology* 14: 171 - 186.
- **Zibae A. & Bandani A. R., 2010.** Effects of *Artemisia annua* L. (Asteracea) on the digestive enzymatic profiles and the cellular immune reactions of the Sunn pest, *Eurygaster integriceps* (Heteroptera: Scutellaridae), against *Beauveria bassiana*. *Bulletin of entomological research* 100(2): 185 - 196.
- **Zufelato M. S., Lourenço A. P., Simões Z. L., Jorge J. A., & Bitondi M. M., 2004.** Phenoloxidase activity in *Apis mellifera* honey bee pupae, and ecdysteroid-dependent expression of the prophenoloxidase mRNA. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34(12): 1257 - 1268.

Ringraziamenti

Ringrazio il prof. Pietro Brandmayr per avermi dato la possibilità di compiere questo percorso e la dott.ssa Anita Giglio per avermi seguito passo passo, per avermi insegnato non molto ma tanto, per avermi invogliato a continuare anche nei momenti più difficili, e per tutti i consigli che mi ha dato sia dal punto di vista lavorativo che sulla vita privata.

La dott.ssa Federica Talarico per avermi seguito nelle analisi morfometriche, e il dott. Antonio Mazzei per avermi seguito nella determinazione delle specie.

Il prof. Piero Giulio Giulianini dell'Università di Trieste, per i suoi insegnamenti di statistica ed elaborazione dei dati.

Il prof. Gabor Lövei dell'università di Aarhus, dal quale durante il mio breve soggiorno in Danimarca ho potuto apprendere alcune metodiche per l'elaborazione dei dati riguardanti la distribuzione delle specie.

Il dott. Emilio Paolo Alessandrino per gli insegnamenti e i consigli che mi ha dato durante la stesura della tesi.

Maria Luigia Vommaro, con la quale ho lavorato insieme in laboratorio in questi tre anni di dottorato.

Un ringraziamento particolare va ai miei genitori, perché mi hanno dato la possibilità di studiare e mi hanno sempre invogliato nel farlo.

Infine, ma non per ordine di importanza, voglio ringraziare Giusy, grazie di esserci, che mi sei stata sempre vicino anche nei momenti difficili, che sembravano insuperabili, grazie non solo per quello che hai fatto, ma che mi hai fatto sentire che valeva la pena farlo per me.