

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

FACOLTA' DI AGRARIA

Dottorato di Ricerca in Entomologia Agraria

XIX CICLO

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali

**ECOFISIOLOGIA DEL CICLO BIOLOGICO
DI *OSMIA LIGNARIA* SAY
(HYMENOPTERA MEGACHILIDAE)**

Tesi di Dottorato di Ricerca di:

FABIO SGOLASTRA

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. PIERO BARONIO

Tutori:

Chiar. mo Prof. STEFANO MAINI

Dott. JORDI BOSCH

Esame finale anno 2007

INDICE

Introduzione	9
Cap. 1: Biologia di <i>Osmia lignaria</i> Say	11
1.1 Sistematica, morfologia e distribuzione	11
1.2 Ciclo biologico	11
<i>1.2.1 Fuoriuscita dal bozzolo e accoppiamento</i>	12
<i>1.2.2 Pre-nidificazione</i>	13
<i>1.2.3 Nidificazione</i>	13
<i>1.2.4 Sviluppo</i>	14
<i>1.2.5 Pre-svernamento</i>	15
<i>1.2.6 Svernamento</i>	15
1.3 Metodi di allevamento e utilizzo di <i>O. lignaria</i> come pronubo	15
1.4 Sincronizzazione del ciclo biologico di <i>O. lignaria</i> con le variazioni stagionali	18
Cap. 2: Fenologia del pre-svernamento in femmine di <i>Osmia lignaria</i>: conseguenze sullo sviluppo della diapausa, consumo dei corpi grassi, maturazione degli ovari e sopravvivenza invernale	21
2.1 Introduzione	21
2.2 Materiali e metodi	24
<i>2.2.1 Popolazione e metodi di allevamento</i>	24
<i>2.2.2 Respirimetria</i>	25
<i>2.2.3 Perdita di peso e consumo dei corpi grassi</i>	25
<i>2.2.4 Estrazione dei lipidi</i>	26
<i>2.2.5 Misurazione degli oociti</i>	27
<i>2.2.6 Sopravvivenza e durata dell'incubazione</i>	28
2.3 Risultati	28

2.3.1. <i>Tasso di respirometria</i>	28
2.3.2. <i>Perdita di peso</i>	30
2.3.3. <i>Corpi grassi e lipidi totali</i>	31
2.3.4 <i>Maturazione degli oociti</i>	34
2.3.5 <i>Sopravvivenza e durata dell'incubazione</i>	35
2.4 Discussione	36
2.4.1 <i>Sviluppo della diapausa</i>	36
2.4.2 <i>Perdita di peso, consumo delle riserve lipidiche e sopravvivenza</i>	37
2.4.3 <i>Maturazione degli ovari e inizio della nidificazione</i>	39
Cap. 3: Sviluppo della diapausa in <i>Osmia lignaria</i> a diversi regimi di svernamento	41
3.1 Introduzione	41
3.2 Materiali e metodi	43
3.2.1 <i>Esperimento 1: Temperatura di svernamento</i>	43
3.2.1.1 <i>Popolazione e metodi di allevamento</i>	43
3.2.1.2 <i>Tasso di respirometria e perdita di peso</i>	44
3.2.1.3 <i>Analisi statistica</i>	45
3.2.2 <i>Esperimento 2: Durata dello svernamento</i>	45
3.2.2.1 <i>Popolazione e metodi di allevamento</i>	45
3.2.2.2 <i>Tasso di respirometria e perdita di peso</i>	46
3.2.2.3 <i>Analisi statistica</i>	46
3.3 Risultati	46
3.3.1 <i>Esperimento 1: Temperatura di svernamento</i>	46
3.3.1.1 <i>Respirometria</i>	46
3.3.1.2 <i>Perdita di peso</i>	49
3.3.2 <i>Esperimento 2: Durata dello svernamento</i>	49
3.3.2.1 <i>Respirometria</i>	49
3.3.2.2 <i>Perdita di peso</i>	51
3.3.2.3 <i>Sopravvivenza e durata dell'incubazione</i>	52
3.4 Discussione	53
3.4.1 <i>Sviluppo della diapausa</i>	53

3.4.2 <i>Metabolismo e sopravvivenza</i>	56
--	----

Cap. 4: Effetti della durata del pre-svernamento sulla fitness

in femmine di <i>Osmia lignaria</i>	59
--	----

4.1 Introduzione	59
-------------------------	----

4.2 Materiali e metodi	62
-------------------------------	----

4.2.1 <i>Osmia lignaria</i>	62
-----------------------------	----

4.2.2 <i>Popolazione e metodi di allevamento</i>	62
--	----

4.2.3 <i>Sito e materiali di nidificazione</i>	63
--	----

4.2.4 <i>Nidificazione</i>	64
----------------------------	----

4.2.5 <i>Analisi dei nidi</i>	65
-------------------------------	----

4.2.6 <i>Analisi statistica</i>	66
---------------------------------	----

4.3 Risultati	67
----------------------	----

4.3.1 <i>Relazione tra il peso della provvigione e il peso dell'adulto</i>	67
--	----

4.3.2 <i>Periodo di incubazione e insediamento</i>	68
--	----

4.3.3 <i>Attività di nidificazione e fecondità</i>	68
--	----

4.3.4 <i>Sex ratio primaria e investimento parentale</i>	69
--	----

4.3.5 <i>Progenie</i>	69
-----------------------	----

4.4 Discussione	70
------------------------	----

4.4.1 <i>Insediamento</i>	71
---------------------------	----

4.4.2 <i>Maturazione degli ovari</i>	71
--------------------------------------	----

4.4.3 <i>Longevità e tasso di approvvigionamento</i>	71
--	----

Cap. 5: Tasso di sviluppo di due popolazioni di *Osmia*

<i>lignaria</i> di diverse latitudini	75
--	----

5.1 Introduzione	75
-------------------------	----

5.2 Materiali e metodi	78
-------------------------------	----

5.2.1 <i>Popolazione precoce</i>	78
----------------------------------	----

5.2.2 <i>Popolazione tardiva</i>	79
----------------------------------	----

5.2.3 <i>Calcolo dei gradi-giorno per lo sviluppo</i>	79
---	----

5.2.4 <i>Analisi statistica</i>	80
---------------------------------	----

5.3 Risultati	80
----------------------	----

<i>5.3.1 Popolazione precoce</i>	80
<i>5.3.2 Popolazione tardiva</i>	81
<i>5.3.3 Confronto tra le due popolazioni</i>	81
5.4 Discussione	86
Bibliografia	91

Introduzione

L'impollinazione è definita come il trasporto del polline dalle parti maschili del fiore a quella femminile dello stesso o di altro fiore. Questo processo, svolto in molte piante dagli insetti pronubi, è essenziale affinché dal fiore si formino il frutto e i semi. Secondo Southwick e Southwick (1992) e Williams (1996), negli Stati Uniti d'America e in Europa, le produzioni delle principali colture frutticole e sementiere dipendono per un grado variabile dal 70% al 100% dall'impollinazione entomofila. Attualmente, a causa dell'agricoltura intensiva e dell'uso eccessivo degli agrofarmaci che hanno portato alla riduzione dei pronubi selvatici (Kearns et al. 1998), il servizio che un tempo veniva offerto spontaneamente dagli insetti presenti in natura ha bisogno di essere implementato attraverso la reintroduzione in campo di impollinatori adeguati.

Molti agricoltori durante il periodo della fioritura posizionano arnie di ape domestica (*Apis mellifera*) nei loro frutteti. L'ape domestica è sicuramente l'insetto più utilizzato al mondo per l'impollinazione, tuttavia esistono molte altre specie di Apoidei che sono potenziali "fornitori di questo servizio". In particolare, diverse specie di *Osmia* sono state studiate in vari paesi come insetti impollinatori commerciali di meorlo, ciliegio, pero e melo (Torchio 1981, 1985; Maeta 1978, 1990; Bosch 1994a; Vicens e Bosch 2000a; Bosch e Kemp 2001; Maccagnani et al. 2003a, b; Ladurner et al. 2004; Krunic e Stanisavljevic 2006). La ricerca di pronubi, alternativi all'ape domestica, è una problematica di recente interesse a causa della misteriosa scomparsa delle api domestiche denunciata in questi ultimi anni da molti apicoltori in molte parti del mondo. Questo fenomeno è stato chiamato "Colony Collapse Disorder" e, da ottobre 2006 a febbraio 2007 negli USA, ha provocato la scomparsa dal 30 al 60% di api con punte, in alcune aree, del 90%. Tra le possibili cause prese in considerazione ci sono lo "stress", i mutamenti climatici, l'uso di pesticidi proibiti e infezioni (<http://www.nytimes.com/2007/02/27/business/27bees.html?pagewanted=1&ei=5070&en=19e542fb52509696&ex=1173243600&emc=eta1>). Scomparse misteriose di api sono state riscontrate anche in Europa già da alcuni anni. Secondo molti ricercatori, questo fenomeno nominato "French Bee Malady", è

dovuto all'interazione di diversi fattori (Delaplane e Mayer 2000; Kevan e Philips 2001; Brasse 2001; Fletcher e Barnett 2003; Maus et al. 2003).

Attualmente, in Giappone e negli Stati Uniti, si allevano e si commercializzano alcune specie di osmie per l'impollinazione di piante da frutto, tuttavia la gestione su larga scala di queste popolazioni richiede una certa dose di manipolazione. In condizioni naturali il ciclo biologico di *Osmia* spp. è fortemente influenzato dall'andamento annuale della temperatura e le popolazioni di diverse latitudini potrebbero essere adattate alle condizioni termiche locali. Dal punto di vista ecologico una sincronizzazione appropriata del ciclo biologico richiede che i vari processi di crescita e sviluppo siano in accordo con gli eventi stagionali. Per questo motivo è importante capire come i fattori ambientali regolano la durata delle varie fasi del ciclo biologico e quali sono le pressioni selettive che consentono alle diverse popolazioni di adattarsi alle condizioni climatiche locali. Dal punto di vista commerciale la comprensione dell'ecofisiologia delle osmie è necessaria per stabilire un adeguato sistema di allevamento e gestione delle popolazioni da utilizzare per un'impollinazione efficace. Ciò è essenziale sia per ottenere una maggiore moltiplicazione della popolazione, sia per meglio sincronizzare il periodo di attività degli adulti in primavera con la fioritura di una larga varietà di colture che va dal mandorlo in febbraio al melo in maggio.

Lo scopo di questa ricerca è studiare gli effetti ambientali, in particolare della temperatura, sulla fisiologia e la sincronizzazione del ciclo biologico di *Osmia lignaria* Say, un'ape solitaria utilizzata come impollinatore di frutteti negli Stati Uniti, con le variazioni stagionali.

Capitolo 1

Biologia di *Osmia lignaria* Say

1.1 Sistematica, morfologia e distribuzione

Il genere *Osmia* comprende più di 300 specie, la maggior parte delle quali presentano una distribuzione di tipo Oloartica (Michener 2000). Tutte le osmie sono solitarie, tuttavia hanno la tendenza a nidificare in modo gregario. I nidi sono costituiti da cavità pre-esistenti, nelle quali le femmine costruiscono delle celle disposte in serie separate da setti di fango o di materiale vegetale masticato. Le specie del subgenere *Osmia* (*Osmia*) sono caratterizzate dall'aver un ciclo monovoltino e di nidificare presto in primavera (Bosch et al. 2001).

La specie presenta uno spiccato dimorfismo sessuale: i maschi sono più piccoli, presentano un ciuffo di peli bianchi sul capo e hanno antenne più lunghe delle femmine, mentre il resto del capo, il torace e l'addome sono di colore nero con riflessi verde-bluastri. Le femmine sono più grandi e robuste, presentano la stessa colorazione dei maschi, sono prive del ciuffo di peli bianchi sul capo e hanno antenne più brevi. Le femmine inoltre presentano un apparato adibito alla raccolta del polline, detto scopa, posto sugli urosterniti, costituito da setole colletrici (Bosch e Kemp 2001). I maschi non partecipano mai all'approvvigionamento del nido; essi visitano i fiori solo per raccogliere il nettare per il loro fabbisogno energetico.

Osmia lignaria è una specie Neartica la cui distribuzione va dal sud del Canada (55° N) al nord del Messico (30° S), attraversando gran parte degli Stati Uniti (Rust 1974; Bosch e Kemp 2001). La specie è stata riscontrata a densità elevate ad altitudini che vanno da 0 m fino a 1800 m s.l.m., mentre diventa rara sopra i 2100-2400 m s.l.m (Bosch e Kemp 2001).

1.2 Ciclo biologico

Il ciclo biologico di *O. lignaria* è di tipo monovoltino e può essere diviso in 6 periodi (fig. 1.1): 1) Fuoriuscita dal bozzolo e accoppiamento: gli adulti svernanti sono esposti alle

calde temperature (incubazione primaverile), fuoriescono dal bozzolo, lasciano il loro nido natale e si accoppiano; 2) Pre-nidificazione: durante un breve periodo di alcuni giorni, le femmine completano la maturazione degli ovari prima di iniziare a nidificare; 3) Nidificazione: le femmine costruiscono i nidi e depongono le uova nelle celle approvvigionate di nettare e polline; 4) Sviluppo: lo sviluppo da uovo ad adulto avviene attraverso cinque stadi larvali, uno stato di prepupa in dormienza e uno stato di pupa; 5) Pre-Svernamento: gli adulti neo-formati all'interno del bozzolo sono esposti alle calde temperature di fine estate-inizio autunno; 6) Svernamento: gli adulti nei bozzoli sono esposti alle fredde temperature invernali. All'interno di una specie ci sono importanti differenze fenologiche tra le popolazioni. Nelle aree calde o di basse latitudini, gli adulti volano e nidificano precocemente nell'anno (febbraio-marzo) rispetto alle popolazioni di aree più fredde che volano in aprile-maggio.

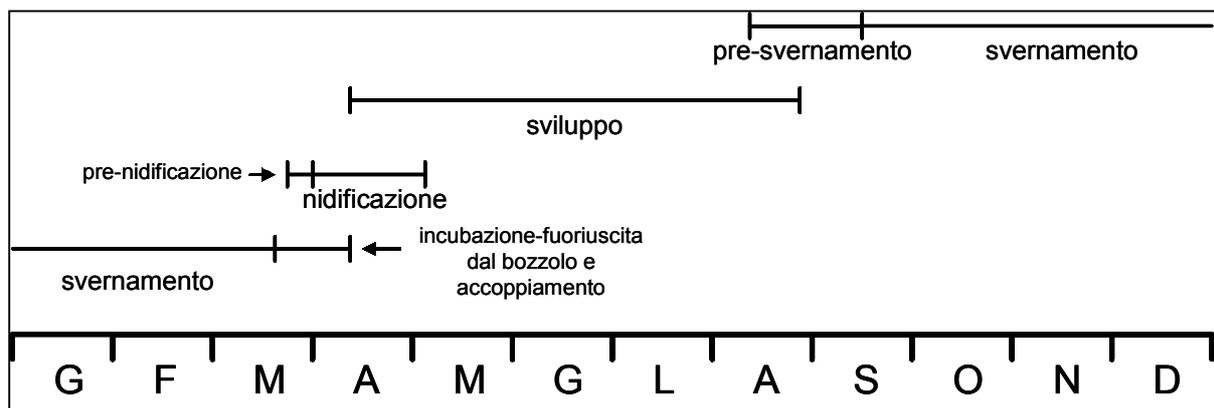


Figura 1.1 Fenologia del ciclo biologico di una popolazione monovoltina di *Osmia lignaria*.

1.2.1 Fuoriuscita dal bozzolo e accoppiamento

In primavera la fuoriuscita degli adulti dai bozzoli e dai nidi è sincronizzata con l'aumentare delle temperature in modo tale che i maschi (collocati nelle celle più esterne) fuoriescono da 1 a 4 giorni prima delle femmine. La durata del periodo di incubazione, cioè dei giorni necessari affinché l'insetto esca dal bozzolo dopo l'esposizione alla calde temperature primaverili, dipende dalla temperatura e durata dello svernamento e dalla temperatura d'incubazione. Una volta fuori dai nidi, gli adulti escretano il meconio attraverso l'ano. Il meconio contiene i cataboliti accumulati durante lo sviluppo e lo svernamento. In genere i maschi rimangono in prossimità dei siti di nidificazione in attesa che le femmine escano dal nido natale. L'accoppiamento avviene in prossimità dei nidi o sui fiori

vicini, mai in volo (fig. 1.2). Le femmine possono accoppiarsi più di una volta dal giorno della loro fuoriuscita dal nido ma quelle accoppiate diventano progressivamente meno attrattive per i maschi.



Figura 1.2 Femmina e maschio di *Osmia lignaria* durante l'accoppiamento

1.2.2 Pre-nidificazione

Dopo l'accoppiamento, le femmine attendono qualche giorno prima di iniziare la nidificazione, presumibilmente per completare la maturazione degli ovari. Durante questo periodo le femmine sono assenti dai siti di nidificazione. La durata del periodo di pre-nidificazione è in genere di 2-5 giorni ma può dipendere dalle condizioni climatiche. Poco prima dell'inizio dell'attività di nidificazione, le femmine visitano diverse cavità alla ricerca del nido più idoneo per nidificare. Le femmine pre-nidificanti entrano rapidamente e ispezionano numerosi nidi fino a restringere le loro visite ad un solo nido. Voli a zig-zag di fronte a questo nido segnalano la sua selezione come sito di nidificazione.

1.2.3 Nidificazione

Subito dopo la selezione del nido, la femmina inizia a raccogliere il fango per costruire la porzione iniziale del nido nella parte più profonda della cavità di nidificazione. In natura le femmine di *O. lignaria* nidificano nelle cavità scavate da coleotteri in tronchi e ceppi di legno morto, tuttavia accettano anche materiale di nidificazione artificiale (fig. 1.3). Tendono a prediligere cavità con diametri attorno a 8 mm. I nidi consistono in una serie lineare di celle divise da setti di fango. Ogni cella contiene una provvigione di polline e nettare su cui la

femmina depone un uovo. Le uova diploidi, da cui si svilupperanno le femmine, sono deposte nelle celle più interne mentre le uova aploidi, da cui si svilupperanno i maschi, sono deposte nelle celle più esterne. In genere, dato che la taglia corporea delle femmine è maggiore, le provvigioni delle celle femminili sono più grandi di quelle maschili. I nidi completati vengono chiusi con un tappo di fango più spesso. Le femmine sono attive per circa 20-30 giorni, incluso il periodo di pre-nidificazione, e costruiscono in media da 0,5 a 1 cella al giorno. Nelle osmie la sex ratio della progenie è sempre spostata verso il sesso maschile (in media 1,7:1).



Figura 1.3 Centralina di nidificazione con materiale di nidificazione artificiale (a sinistra) e particolare di un nido (a destra) costituito da un blocco di legno preforato con cannucce di carta inserite nei fori.

1.2.4 Sviluppo

Lo sviluppo da uovo ad adulto avviene durante il periodo primavera-estate. L'uovo è bianco e di forma allungata, misura circa 4 mm in lunghezza ed è attaccato con la parte posteriore sulla provvigione di polline e nettare. In natura, le uova richiedono circa una settimana per schiudere. Il primo stadio larvale è intracorionico. La larva schiude dall'uovo solo dopo la muta dal primo stadio larvale al secondo, e inizia ad alimentarsi sulla provvigione. Lo sviluppo larvale procede attraverso cinque stadi larvali (Torchio 1989) e in natura richiede approssimativamente un mese (Bosch e Kemp 2000). Dopo il consumo della provvigione e la defecazione, la larva del quinto stadio inizia a tessere il bozzolo. La tessitura del bozzolo richiede pochi giorni. La larva di quinta età all'interno del bozzolo viene indicata con il nome di prepupa, la quale entra in uno stadio di dormienza estiva (Torchio 1989; Bosch e Kemp 2000; Kemp et al. 2004). Dopo un periodo variabile di 1-3 mesi a seconda della temperatura e della popolazione, la prepupa muta in pupa bianca e dopo alcuni giorni diventa

nera fino alla metamorfosi completa in adulto. Alla fine dell'estate o all'inizio dell'autunno, l'adulto è completamente formato ma rimane all'interno del bozzolo fino alla primavera successiva.



Figura 1.4 Sezione di un nido di *Osmia lignaria* costituito da diverse celle pedotrofiche divise dai setti di fango. Si nota in ogni cella le uova e le provvigioni di polline e nettare.

1.2.5 Pre-svernamento

Il periodo durante il quale l'adulto, all'interno del bozzolo, rimane esposto alle calde temperature di fine estate-inizio autunno, in attesa dell'arrivo della stagione fredda, viene definito pre-svernamento (Bosch, Kemp e Sgolastra, non pubblicato). Durante il pre-svernamento l'individuo è ancora esposto a temperature sufficientemente calde per consentirne lo sviluppo in adulto. Questo periodo permette agli individui con sviluppo lento (individui tardivi), all'interno della popolazione, di raggiungere lo stato adulto ed essere pronti per lo svernamento quando le temperature si abbassano.

1.2.6 Svernamento

Con l'arrivo delle basse temperature in autunno ed in inverno prende avvio lo svernamento. Durante questo periodo gli insetti continuano a rimanere all'interno del bozzolo in uno stato di dormienza, fino all'aumento delle temperature in primavera. In *Osmia* spp. l'esposizione alle fredde temperature è necessaria per lo sviluppo della diapausa invernale. Infatti, individui non svernati non sono in grado di sopravvivere e fuoriuscire dal bozzolo.

1.3 Metodi di allevamento e utilizzo di *O. lignaria* come pronubo

Osmia lignaria raccoglie il polline e il nettare da molte specie di piante, tuttavia mostra una preferenza spiccata per le Rosacee, sulle quali risulta essere un ottimo impollinatore. Al fine di utilizzare questo Apoideo solitario come impollinatore dei frutteti sono stati sviluppati dei metodi di allevamento (Torchio 1976, 1981, 1984; Bosch et al. 2000; Bosch e Kemp 2001). Già da diversi anni, si commercializzano popolazioni di *O. lignaria* sia

negli Stati Uniti che in Canada. Popolazioni svernate di *O. lignaria* vengono rilasciate nei frutteti all'interno di centraline di nidificazione provviste di materiale di nidificazione (ad esempio, blocchi di legno preforati con all'interno inserite cannuce di carta lunghe 15 cm e dal diametro di 7,5 mm – fig. 1.3).

In molte parti del mondo si utilizzano diverse specie di *Osmia* come insetti impollinatori di piante che fioriscono in primavera. Infatti, anche se l'ape domestica (*Apis mellifera*) è oggi di gran lunga l'insetto pronubo più utilizzato nell'impollinazione, non sempre risulta essere il più adatto. E' stato dimostrato che l'ape domestica è poco attiva quando le temperature sono inferiori a 12 °C e il cielo è parzialmente o interamente coperto (Free 1993; Vicens e Bosch 2000b), condizioni che si riscontrano spesso in primavera precoce, nel momento della fioritura di molte piante da frutto. Inoltre l'ape domestica non ama visitare certi tipi di fiori a causa del basso contenuto zuccherino del nettare, situazione che si riscontra ad esempio nei fiori di pero e in certe varietà di susino. Questi motivi rendono l'ape domestica poco efficace per ottenere un'adeguata impollinazione di tutte quelle piante che fioriscono precocemente (es. pero, melo, ciliegio, meorlo, susino, ecc.). Su queste colture, le osmie invece risultano essere ottimi impollinatori (Yamada et al. 1971; Maeta e Kitamura 1974; Maeta 1978; Torchio 1981, 1985; Bosch 1994a; Bosch e Blas 1994; Bosch e Kemp 2001). Negli Stati Uniti recenti studi hanno dimostrato che è possibile raddoppiare la produzione di ciliegie utilizzando *O. lignaria* (Bosch et al. 2006). In Giappone, si utilizza *Osmia cornifrons* (Radoszkowski) come impollinatore del melo fin dal 1960 e oggi oltre il 70% dei meleti sono impollinati con questo insetto. In Europa la diffusione della specie *Osmia cornuta* (Latreille) a livello commerciale è ancora in fase sperimentale. Tuttavia molti studi hanno dimostrato che questa specie è un ottimo impollinatore dei frutteti (Asensio 1984; Bosch 1994a; Vicens e Bosch 2000a, b; Maccagnani et al. 2003a, b; Monzón et al. 2004; Ladurner et al. 2004; Krunic e Stanisavljevic 2006). *O. cornuta* è stata usata anche con successo per l'impollinazione di Brassicacee da seme in tunnel (Ladurner et al. 2002). I vantaggi delle osmie rispetto alle api domestiche sono:

1) diversamente dalle api domestiche, esse raccolgono il polline sfregendo con particolari setole collettrici presenti nella parte ventrale dell'addome (la scopa), gli organi riproduttori del fiore. Questo comportamento garantisce una migliore impollinazione e una maggiore allegagione mentre le api domestiche spesso visitano i fiori di lato, senza entrare in contatto con gli organi riproduttivi dei fiori. E' stato dimostrato che l'allegagione dei fiori di melo visitati una sola volta da *O. cornuta* è del 27,4%, mentre la percentuale di allegagione ottenuta

utilizzo api domestiche è del 4,8%. Inoltre utilizzando le osmie il numero di semi per frutto è significativamente maggiore che utilizzando le api. Ciò conferisce al frutto non solo una taglia maggiore ma anche una maggiore simmetria e una qualità organolettica superiore (Vicens e Bosch 2000a). Risultati simili sono stati ottenuti su pero (Monzón et al. 2004);

2) dato che il loro naturale periodo di volo coincide con le fioriture della maggior parte delle fruttifere, le osmie sono adattate a volare anche in condizioni climatiche avverse, spesso riscontrabili in primavera (Torchio 1984; Vicens e Bosch 2000b; Maccagnani et al. 2003a);

3) visitano moltissimi fiori in ogni volo di bottinamento e si spostano attraverso i filari favorendo l'impollinazione incrociata (le api domestiche volano lungo i filari) (Bosch 1994a; Bosch e Blas 1994; Vicens e Bosch 2000a);

4) il loro raggio d'azione è molto ristretto concentrandolo il loro "servizio d'impollinazione" sul frutteto in cui sono state rilasciate e, a differenza delle api domestiche, visitano anche i fiori con basso contenuto zuccherino nel nettare come il pero. Le api domestiche invece si spostano anche per molti km alla ricerca delle fioriture più appetibili (Bosch e Kemp 2001; Maccagnani et al. 2003a, b; Monzón et al. 2004);

L'utilizzo a livello commerciale delle osmie per l'impollinazione è possibile perché, oltre a questi vantaggi, possiede altre caratteristiche (Bosch e Kemp 2002):

1) nidificano in modo gregario ed accettano facilmente materiali artificiali di nidificazione;

2) è possibile aumentare la popolazione sia sulla coltura target da impollinare che su altre colture;

3) attraverso precisi trattamenti termici è possibile regolare il ciclo biologico delle osmie sincronizzando il loro periodo di attività con la fioritura della coltura bersaglio;

4) la popolazione può essere allevata in condizioni artificiali o semiartificiali di temperatura che ne riducono la mortalità durante lo sviluppo, il pre-svernamento, lo svernamento e l'incubazione;

5) è possibile ridurre l'impatto dei loro nemici naturali utilizzando dei metodi di controllo dei parassiti, predatori e patogeni.

La conoscenza della biologia dell'insetto pronubo integrata con la conoscenza relativa alla biologia riproduttiva della coltura da impollinare consente di sviluppare un sistema ottimale di gestione e allevamento di questi pronubi da utilizzare a livello commerciale.

1.4 Sincronizzazione del ciclo biologico di *O. lignaria* con le variazioni stagionali

Il principale adattamento ecologico che gli organismi viventi hanno evoluto ai cambiamenti ciclici annuali è la loro **fenologia**. Per fenologia si intende una serie di adattamenti che portano gli eventi biologici stagionali (sviluppo, riproduzione, dormienza e migrazione) a manifestarsi in modo sincronizzato con i cicli annuali dei fattori biotici ed abiotici nell'ambiente. Il meccanismo principale con cui gli insetti sincronizzano il loro ciclo biologico con le variazioni ambientali è costituito dalla **diapausa**. E' molto difficile definire la diapausa come un fenomeno fisiologico specifico dato che varia enormemente da specie a specie; è polifiletico in origine e serve come uno strumento di sincronizzazione per diversificare gli adattamenti fenologici. Nonostante questi problemi possiamo definire *la diapausa come un dinamico stato di bassa attività metabolica mediata neurormonicamente. Associato con questo ci sono una ridotta morfogenesi, aumento della resistenza agli ambienti estremi, e alterata o ridotta attività comportamentale. La diapausa avviene durante uno stato (o stati) di metamorfosi determinato geneticamente, e la sua piena espressione si sviluppa in maniera specie-specifica, di solito in risposta a un numero di stimoli ambientali che precede le condizioni sfavorevoli. Uno volta che la diapausa è iniziata, l'attività metabolica è soppressa anche se le condizioni favorevoli per lo sviluppo prevalgono* (Tauber et al. 1986). Ci sono due momenti nel ciclo biologico delle osmie in cui questi insetti entrano in uno stato di dormienza diapausa-mediata (*sensu* Tauber et al. 1986): nella fase di prepupa in estate e nella fase di adulto in inverno. Con il termine di **dormienza** si fa riferimento a un periodo del ciclo biologico di piante o animali ricorrente stagionalmente (*fenofase*) durante il quale la crescita, lo sviluppo e la riproduzione sono soppressi. Nel ciclo biologico degli insetti possono essere presenti periodi di dormienza in una o più stagioni, ma come detto in precedenza, la dormienza è un evento ricorrente il cui inizio e la cui fine sono associate a stagioni specifiche. Periodi di dormienza possono o non, essere mediati dalla diapausa. La dormienza non diapausa è definita come uno stato di soppressione metabolica imposta da condizioni ambientali ricorrenti che sono sfavorevoli per la crescita e la riproduzione. Nella maggior parte dei casi però la dormienza negli insetti è mediata dalla diapausa. Attraverso la diapausa gli insetti sono in grado di sincronizzare l'intero ciclo biologico (i periodi di crescita, riproduzione, dormienza e migrazione) con i cicli stagionali nell'ambiente (Tauber et al. 1986).

I cicli biologici degli insetti esibiscono una considerevole variabilità intraspecifica sia tra gli anni che tra le località. Le specie con un ampio areale di distribuzione in genere incontrano una grande diversità di condizioni climatiche e ciò si riflette in forti variazioni tra

le diverse popolazioni geografiche. Comunque, anche all'interno di una stessa area, le condizioni stagionali sono soggette a variazioni tra gli anni e a cambiamenti gradualmente nel corso del tempo. Gli organismi devono essere adattati anche a questi cambiamenti. In condizioni naturali, popolazioni di *O. lignaria* sono soggette a grosse variazioni nella durata del pre-svernamento (PS) e dello svernamento. La durata del PS è legata al periodo di sviluppo in adulto e all'arrivo della stagione fredda. Infatti, nelle osmie il periodo di sviluppo in adulto può protrarsi per oltre un mese quindi, gli individui diventati adulti per primi (individui precoci) sono esposti ad un PS più lungo di quelli diventati adulti più tardi (individui tardivi). In più, l'arrivo delle temperature invernali differisce di anno in anno, per cui, sia tra gli individui di uno stesso anno, che tra quelli di anni diversi, la durata del PS può essere molto variabile. Studi precedenti hanno dimostrato che un lungo PS ha un effetto negativo sulla sopravvivenza delle osmie; tuttavia, individui svernati come pupe o prepupe muoiono o diventano adulti non vitali nell'anno successivo. Per questo motivo è importante che il periodo di sviluppo in adulto sia sincronizzato con l'arrivo delle basse temperature (Bosch e Kemp 2004; Bosch, Kemp e Sgolastra, non pubblicato). Anche le diverse condizioni dello svernamento influenzano la sopravvivenza delle osmie (Bosch e Kemp 2003; Bosch e Kemp 2004). L'obiettivo dei capitoli 2 e 3 è quello di comprendere le risposte ecofisiologiche di femmine di *O. lignaria* alle diverse condizioni di PS e svernamento. Ogni organismo vivente presenta un intervallo di tolleranza fisiologico all'interno del quale gli individui possono sopravvivere (fig. 1.5). Le condizioni estreme, al di fuori dei limiti di tolleranza, sono letali, tuttavia anche le zone di stress (vicine ai limiti di tolleranza) possono avere un effetto negativo su alcuni aspetti della fitness. L'obiettivo del capitolo 4 è quello di comprendere gli effetti di diverse condizioni di PS sulla fitness di *O. lignaria* e del suo impatto sulla dinamica di popolazione. Inoltre le specie di insetti come le osmie, che presentano un ampio areale di distribuzione, sono soggette a condizioni ambientali molto variabili e, in ogni località, i loro cicli stagionali sono mantenuti in sincronia con le condizioni locali. Le popolazioni di osmie di basse latitudini e di aree più calde sono attive presto in primavera rispetto alle popolazioni di alte latitudini e di aree più fredde. Infatti, in ogni località il momento di fuoruscita dal bozzolo delle osmie deve essere sincronizzato con la presenza di fioriture primaverili. Conoscere i meccanismi ecofisiologici che consentono alle diverse popolazioni di *O. lignaria* di sincronizzare il loro ciclo biologico con le condizioni climatiche locali è l'obiettivo del capitolo 5 di questo studio.

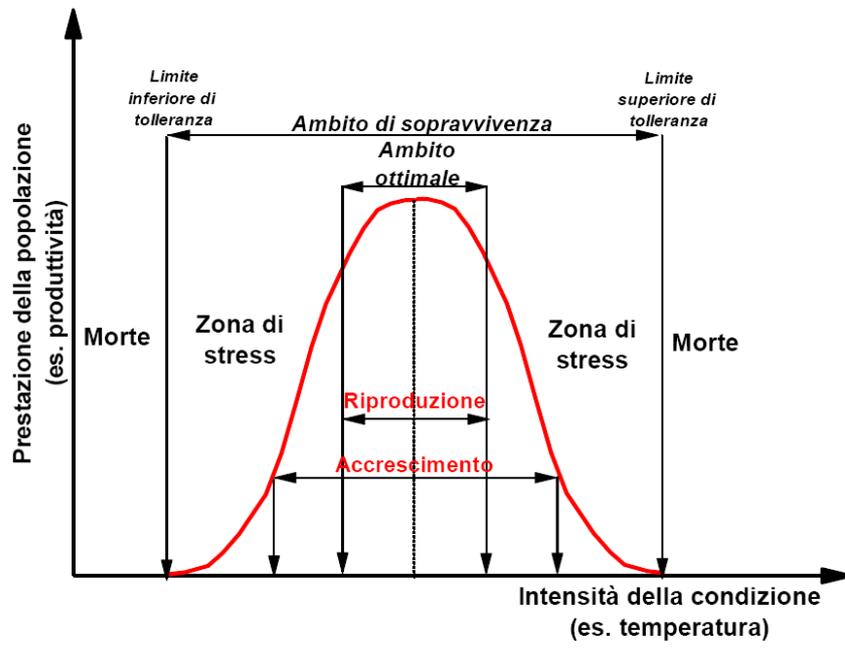


Figura 1.5 Curva di tolleranza e risposta di una popolazione al variare delle condizioni ambientali.

Capitolo 2

Fenologia del pre-svernamento in femmine di *Osmia lignaria*: conseguenze sullo sviluppo della diapausa, consumo dei corpi grassi, maturazione degli ovari e sopravvivenza invernale

2.1 Introduzione

Osmia lignaria SAY è un Apoideo solitario molto studiato come impollinatore commerciale di mandorlo, ciliegio, pero e melo (Torchio 1982, 1985; Bosch e Kemp 2001; Bosch et al. 2006). La sua distribuzione va dal sud del Canada al nord del Messico attraversando gran parte degli Stati Uniti (Rust 1974). E' una specie monovoltina e gli adulti sono attivi in primavera; ogni femmina vola per circa un mese durante il quale costruisce uno o più nidi. In condizioni naturali le femmine nidificano in cavità pre-esistenti come ad esempio fori abbandonati di Coleotteri nel legno morto o nidi vacanti di altri Imenotteri. I nidi sono costituiti da una serie lineare di celle divise da setti di fango. Quando l'ultima cella è completata, le femmine chiudono l'entrata del nido con un tappo di fango. In ogni cella la femmina approvvigiona una massa di polline e nettare sulla quale depone un uovo. Dall'uovo schiude la larva che si sviluppa attraverso 5 stadi larvali durante il periodo primavera-estate; lo sviluppo in adulto avviene in tarda estate o inizio autunno. L'adulto completamente sviluppato rimane all'interno del bozzolo fino alla primavera successiva. Kemp et al. (2004) hanno dimostrato che questo insetto trascorre l'inverno in uno stato di quiescenza diapausa-mediato (*sensu* Tauber et al. 1986). In questa fase, l'esposizione a basse temperature per un adeguato periodo di tempo è essenziale per lo sviluppo della diapausa e la fuoriuscita dal bozzolo nella primavera successiva (Bosch e Kemp 2003, 2004; Bosch, Kemp e Sgolastra, non pubblicato).

Studi precedenti hanno dimostrato che il tasso di respirometria (consumo di O₂ e produzione di CO₂) scendeva da 0,35 ml/g/h (subito dopo la muta in adulto) a circa 0,1 ml/g/h

approssimativamente un mese dopo. Da questo momento in poi, in coincidenza con l'esposizione alle basse temperature invernali, il tasso aumentava bruscamente, e continuava ad aumentare durante tutto lo svernamento fino a circa 0,45 ml/g/h (Bosch, Kemp e Sgolastra, non pubblicato). Sia in *O. lignaria* che nella specie sorella europea *Osmia cornuta* (Latreille) durante il pre-svernamento (PS - periodo durante il quale l'adulto nel bozzolo è esposto a calde temperature al termine dell'estate e all'inizio dell'autunno) si ha una forte perdita di peso (Bosch e Kemp 2004). Questa perdita di peso è accompagnata dal consumo dei corpi grassi. Nelle immagini ai raggi X, l'addome di individui esposti ad un lungo PS (p.e. 60 giorni) era parzialmente nero (svuotato per il consumo dei corpi grassi), mentre quello di individui esposti ad un breve PS era bianco (riempito dai corpi grassi ben sviluppati) (Bosch, Kemp e Sgolastra, non pubblicato) (fig. 2.1). Individui non esposti a fredde temperature durante l'inverno mantenevano un basso tasso di respirometria, subivano una drastica perdita di peso e non erano in grado di superare l'inverno (Bosch, Kemp e Sgolastra, non pubblicato).

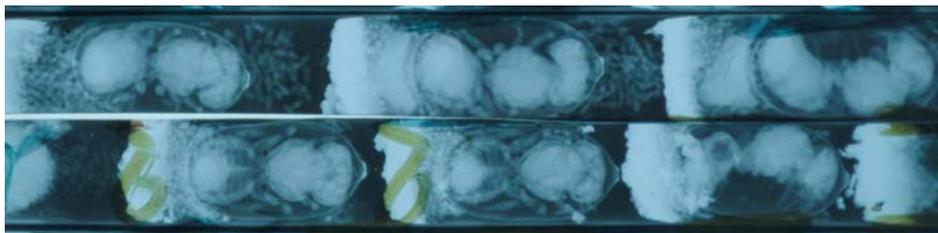


Figura 2.1 Immagine ai raggi X delle osmie all'interno dei bozzoli e dei nidi. In alto individui con i corpi grassi ben sviluppati, in basso quelli con i corpi grassi consumati.

Dato che lo sviluppo in adulto in una popolazione di *O. lignaria* può protrarsi per oltre un mese, individui diventati adulti per primi sono esposti ad un PS più lungo di quelli diventati adulti più tardi. In più, l'arrivo delle temperature invernali differisce di anno in anno, per cui, sia tra gli individui di uno stesso anno, che tra quelli di anni diversi, la durata del PS può essere molto variabile. Negli individui diventati adulti precocemente e in anni in cui le temperature autunnali sono piuttosto miti, le condizioni di PS possono perdurare anche per oltre due mesi (Bosch, Kemp e Sgolastra, non pubblicato). D'altra parte, uno sviluppo eccessivamente lento o un abbassamento precoce delle temperature a fine estate può essere altrettanto dannoso. Infatti, osmie svernate come pupe o prepupe muoiono, o diventano adulti non vitali nell'anno successivo (Bosch 1994a; Bosch e Kemp 2000). In uno studio precedente sono state misurate la sopravvivenza e la vigoria in individui della stessa popolazione esposti a diversi periodi di PS, sia in condizioni artificiali che naturali (Bosch, Kemp e Sgolastra,

non pubblicato). I risultati non hanno mostrato differenze significative nel tasso di sopravvivenza invernale. Tuttavia, gli individui esposti a PS più lunghi o quelli che in natura erano diventati adulti precocemente mostravano un maggior consumo dei corpi grassi ed erano meno vigorosi alla fine dell'inverno (Bosch, Kemp e Sgolastra, non pubblicato). Inoltre, in popolazioni di anni diversi, allevate in condizioni naturali, sono emerse differenze nel tasso di sopravvivenza. Infatti negli anni in cui, durante la tarda estate o ad inizio autunno, le temperature diminuivano lentamente, il tasso di sopravvivenza allo svernamento era minore rispetto a quello osservato negli anni in cui le temperature si abbassavano velocemente (Bosch, Kemp e Sgolastra, non pubblicato).

Un eccessivo consumo dei corpi grassi durante il PS può avere risvolti negativi non solo sulla sopravvivenza, ma anche su aspetti legati alla fitness come la longevità, il tasso di approvvigionamento delle celle pedotrofiche e di ovideposizione (Bradshaw et al. 1998; Irwin e Lee 2000; Ellers e van Alphen 2002; Musolin e Numata 2003). Una minore vigoria potrebbe essere associata a una minore longevità, fattore strettamente legato alla fecondità in femmine di *O. cornuta* (Bosch e Vicens 2006). D'altra parte, il consumo dei corpi grassi potrebbe influenzare il tasso di maturazione degli ovari dopo lo svernamento e quindi ritardare l'inizio della nidificazione. In molti insetti è stato dimostrato il ruolo delle riserve lipidiche e proteiche dei corpi grassi durante la vitellogenesi. Infatti, il vitello è costituito principalmente da lipidi e proteine (oltre il 90%) che sono sintetizzate per lo più nei corpi grassi e trasferiti al vitello attraverso le cellule follicolari (Gilmour 1965; Wigglesworth 1972; Chapman 1998). È anche importante capire se gli ovari maturano durante il PS. In questo caso, le femmine con PS corti avrebbero bisogno di un periodo più lungo di maturazione degli ovari dopo l'inverno e quindi sarebbero svantaggiate rispetto a quelle con PS più lunghi.

Per tutti questi motivi, l'inizio dello svernamento (inteso come abbassamento delle temperature) potrebbe avere un'influenza notevole sulla dinamica di popolazione, sull'attività di nidificazione e sulla fitness dei singoli individui. In questo studio, femmine appartenenti alla stessa popolazione di *O. lignaria* sono state esposte artificialmente a tre diverse durate di PS (5, 30 e 60 giorni) in modo da simulare annate in cui l'arrivo della stagione fredda è precoce, medio e tardivo. In queste femmine sono poi stati misurati gli effetti del PS sulla loro fisiologia. Gli obiettivi specifici di questo studio erano:

- 1) verificare l'effetto della durata del PS sullo sviluppo della diapausa; in particolare, verificare se l'abbassamento delle temperature invernali fa aumentare il tasso di

respirometria e capire come esso varia nelle femmine con periodi corti di PS, prima cioè che i livelli minimi di respirometria siano già stati raggiunti;

- 2) verificare l'effetto della durata del PS sulla perdita di peso, il contenuto di lipidi e il tasso di sopravvivenza invernale; verificare se esiste una relazione tra la perdita di lipidi e l'aspetto dei corpi grassi osservato ai raggi X;
- 3) verificare l'effetto della durata del PS sulla maturazione degli ovari e sulla durata dell'incubazione.

2.2 Materiali e metodi

2.2.1 Popolazione e metodi di allevamento

Le osmie usate in questo studio sono state ottenute da una popolazione di *O. lignaria* rilasciata a inizio aprile 2004 in un frutteto di ciliegie a North Ogden, Utah, USA. Blocchi di legno con cannuce di carta (15 cm di lunghezza e 7,5 mm di diametro) inserite all'interno di fori sono stati usati come materiale di nidificazione (Torchio 1982). Al termine del periodo di nidificazione (inizio di maggio) i nidi sono stati trasferiti presso il Bee Biology & Systematics Laboratory, Logan, Utah e posti in un incubatore che simulava la temperatura giornaliera di Logan degli ultimi 30 anni con termoperiodo di 12 h (maggio = 18:11 °C; giugno = 21:15 °C; luglio = 24:18 °C; agosto = 22:15 °C). Le temperature diurne mensili sono state ottenute calcolando la media fra la temperatura massima e la temperatura media mensile. Le temperature notturne mensili sono state ottenute calcolando la media fra la temperatura minima e la temperatura media mensile.

Ogni 3 giorni, dal 15 luglio, periodo previsto di inizio pupazione (Bosch e Kemp 2000), i nidi sono stati radiografati (Stephen e Undurraga 1976) ed è stato monitorato lo sviluppo in adulto di *O. lignaria*. All'incirca nella parte centrale della curva di sviluppo in adulto della popolazione, 225 bozzoli con al loro interno femmine neo adulte sono stati assegnati in ugual numero a tre diverse durate di PS: 5 giorni (breve), 30 giorni (medio) e 60 giorni (lungo) a 22:15 °C (12:12 h), assicurandosi che a nessun trattamento venivano assegnate 2 femmine dallo stesso nido. Le durate di PS saggiate sono paragonabili a quelle che si verificano in natura (Bosch, Kemp e Sgolastra, non pubblicato). Gli individui all'interno dei bozzoli sono stati sessati in base alle dimensioni del bozzolo e alla sua posizione nel nido. Al termine dello studio si è verificato se l'assegnazione degli individui ad uno dei due sessi risultava adatta (Torchio 1989; Bosch e Kemp 2001). Dopo il periodo di PS,

le femmine sono state acclimatate per una settimana a 10 °C e poi svernate a 4 °C. Nella primavera del 2005, dopo 196 giorni (28 settimane) di svernamento, le femmine sono state incubate a 20 °C.

2.2.2 Respirimetria

Per ogni trattamento di PS sono state effettuate 10 misurazioni di respirometria: il giorno dopo lo sviluppo in adulto; al termine del PS; 2 giorni e 7 giorni dopo il trasferimento a 10 °C; 2 giorni dopo il trasferimento a 4 °C; ogni due mesi fino all'ultimo giorno di svernamento, il giorno prima e il giorno dopo il trasferimento a 20 °C (incubazione).

Il consumo di O₂ e la produzione di CO₂ sono stati misurati su 7 femmine simultaneamente per 2 ore usando il Systems FC-1 O₂ Analyzer®, e il LI-COR 6251 CO₂ Analyzer® operanti in modo differenziale con un tasso di flusso di 100 ml/min (<http://www.sablesys.com/pushmo2.html>). I bozzoli con le femmine, all'interno di un incubatore Peltier (a 22±1 °C), sono stati distribuiti individualmente in cilindri di vetro in cui veniva fatto circolare il flusso di aria. I dati sono stati raccolti attraverso il software di acquisizione dati Sable Systems, DATACAN® (<http://www.sablesys.com/datacan.html>). Dopo ogni misurazione le femmine all'interno dei bozzoli sono state pesate. Al termine dello studio, abbiamo sbozzolato le osmie e le abbiamo pesate. Il peso del bozzolo è stato sottratto ai pesi precedentemente misurati al fine di ottenere il peso effettivo delle femmine ad ogni misurazione. Il tasso di respirometria è stato espresso come ml di O₂ o CO₂ per g di peso corporeo per ora e calcolato con Sable Software Convol®.

2.2.3 Perdita di peso e consumo dei corpi grassi

Circa 20 femmine per trattamento sono state pesate con il loro bozzolo (il peso del bozzolo è poi stato sottratto al termine dello studio per ottenere il peso effettivo dell'osmia) in diverse fasi del loro ciclo biologico: subito dopo essere diventate adulte, alla fine del PS, alla fine dello svernamento e dopo la fuoriuscita dal bozzolo (al termine dell'incubazione). Le percentuali di perdita di peso sono calcolate con riferimento al peso iniziale dell'adulto, e per l'analisi statistica i valori sono stati trasformati in $\arcsin\sqrt{x}$. Con un'analisi della varianza a misure ripetute (ANOVAR) si è poi verificato se esistevano differenze tra i trattamenti (fattore tra-soggetti) e tra le diverse fasi del ciclo biologico (dopo il PS, lo svernamento e la fuoriuscita dal bozzolo) (fattore entro-soggetti).

Su un campione di circa 50 femmine per trattamento sono state effettuate le radiografie per valutare il grado di consumo dei corpi grassi, sia al termine del PS che dello svernamento (fig. 2.1). In base a come apparivano gli addomi ai raggi X sono stati assegnati i seguenti punteggi: '0' - addome completamente bianco (corpi grassi ben sviluppati), '1' - addome che presenta 'buchi' neri nella sua metà anteriore (corpi grassi parzialmente consumati); '2' - la maggior parte o tutta la metà anteriore dell'addome appare nera (corpi grassi fortemente consumati). Ad ogni osmia sono stati assegnati i punteggi in modo indipendente da tre osservatori e la media dei tre punteggi è stata usata come indice del consumo dei corpi grassi. Sono state così definite due classi di punteggi: <1 e ≥ 1 . Il test del χ^2 è stato utilizzato per verificare se il punteggio ottenuto ai raggi X e quindi il consumo dei corpi grassi dipende dalla durata del PS.

2.2.4 Estrazione dei lipidi

Per valutare il contenuto di lipidi totali in femmine di *O. lignaria* al termine del PS e al termine dello svernamento, rispettivamente 10 femmine per trattamento sono state pesate, radiografate, tolte dal loro bozzolo e successivamente conservati a -80 °C fino all'analisi. I bozzoli sono stati pesati al fine di ricavare il peso effettivo dell'adulto.

Per l'estrazione dei lipidi, ogni osmia veniva immersa singolarmente in 3,5 ml di soluzione di $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (2:1) e sonicata per 20 minuti. Successivamente la soluzione con l'osmia è stata omogeneizzata con un macinatore di tessuti Ten-Broeck, agitata ed immersa in un imbuto separatore per separare le due fasi della soluzione (Folch et al. 1957; Buckner et al. 2004). Lo strato inferiore veniva filtrato attraverso lana di vetro in un ampolla e il CHCl_3 è stato fatto evaporare nel Rotovapor. Successivamente l'ampolla veniva risciacquata nuovamente con CHCl_3 e il contenuto trasferito in una provetta preventivamente pesata. Dopo che il CHCl_3 è stato fatto evaporare, la provetta con i lipidi depositati è stata ripesata. La quantità di lipidi estratti si otteneva facendo la differenza tra i due pesi (Buckner e Hagen 2003; Buckner et al. 2004). La percentuale di lipidi estratti è stata calcolata sul peso iniziale dell'osmia (subito dopo lo sviluppo in adulto). Questa percentuale è stata trasformata con l'arcsen \sqrt{x} e un'ANOVA a 2 vie è stata utilizzata per analizzare le differenze tra i trattamenti (durate di PS) e tra le fasi del ciclo biologico (al termine del PS e dello svernamento). Successivamente è stato applicato il test di Tukey per il confronto multiplo tra campioni.

Infine, la relazione tra le % di lipidi estratti e il grado di consumo dei corpi grassi valutato ai raggi X è stata determinata con il test non parametrico di Spearman.

2.2.5 Misurazione degli oociti

Gli ovari del genere *Osmia* sono costituiti da tre paia di ovariole di tipo politrofico (fig. 2.2). Ogni ovariole è costituito da una serie di oociti, ognuno accompagnato da un gruppo di cellule nutrici (o trofociti) (fig.2.2). Nella pupa e in adulti in diapausa di *O. cornifrons* il numero medio di oociti per ovariole è di 4 e 6 rispettivamente, ma dopo lo svernamento il numero aumenta ad un massimo di 11 (Maeta e Kurihara 1971; Maeta 1978). Negli insetti sono riconosciuti principalmente due periodi di crescita degli oociti: il primo avviene precedentemente alla deposizione del vitello mentre il secondo avviene alla deposizione del vitello ed è il periodo di maggiore crescita degli oociti (Chapman 1998). Come osservato anche in altri Imenotteri (Kurhiara et al. 1981; Maeta et al. 1981; Gôukon et al. 1987), durante la pre-vitellogenesi, le dimensioni degli oociti sono ridotte mentre le cellule nutrici sono ben sviluppate; durante la vitellogenesi e la post-vitellogenesi, invece, gli oociti crescono più rapidamente mentre le cellule nutrici tendono a svuotarsi fino alla degenerazione. Nella fase successiva la crescita dell'oocita è ormai completamente terminata e l'uovo viene rivestito dal corion.

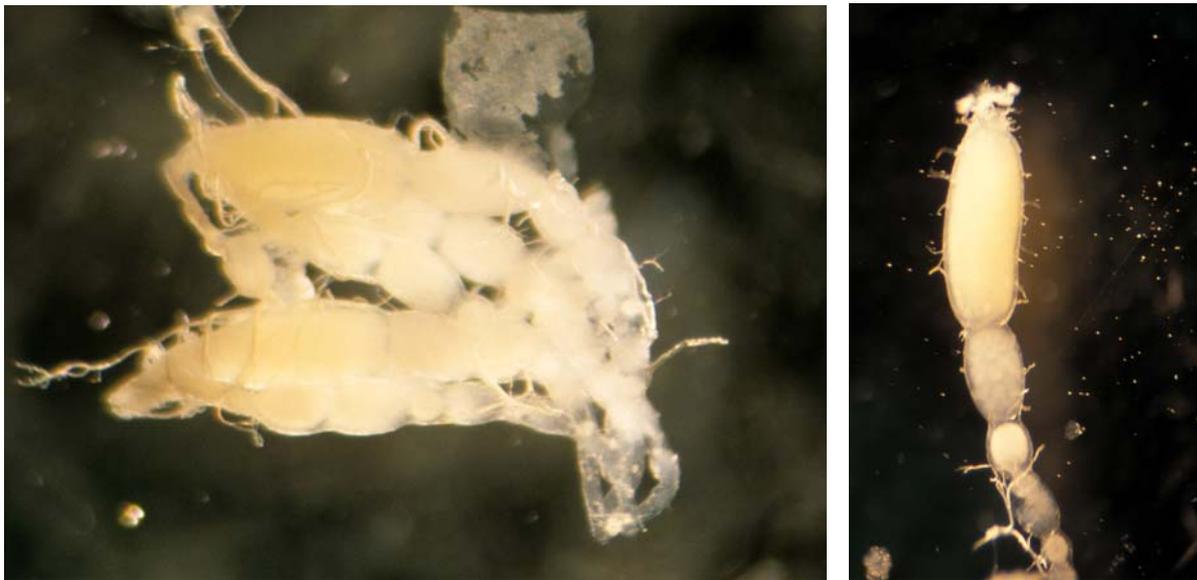


Figura 2.2 Ovari di *Osmia lignaria* (a sinistra) e particolare di un ovariole (a destra).

In questo studio, al termine del PS, dello svernamento e subito dopo la fuoriuscita dal bozzolo, rispettivamente 10-20 femmine per trattamento e per fase del ciclo biologico, sono state sezionate per misurare la lunghezza dei 6 oociti basali. Le osmie, conservate in freezer fino al giorno della misurazione degli ovari, sono state dissezionate in soluzione fisiologica Ringer (NaCl 9g, KCl 0,2g, NaHCO₃ 0,2g, CaCl₂ 0,2g in 1 litro di acqua distillata). Gli oociti

basali sono stati misurati sotto microscopio ottico con micrometro oculare (a 25x di ingrandimento). Per ogni femmina è stata calcolata la lunghezza media dei 6 oociti basali e le differenze tra i trattamenti sono state analizzate al termine del PS e dello svernamento col test non parametrico Kruskal-Wallis.

2.2.6 Sopravvivenza e durata dell'incubazione

Su circa 55 femmine per trattamento è stato calcolato il tasso di sopravvivenza al termine dello svernamento e le differenze tra i trattamenti sono state analizzate con un test del χ^2 . Circa 25 femmine per trattamento sono state incubate a 20 °C e controllate giornalmente per registrare la data di fuoriuscita dal bozzolo. Mediante un'ANOVA a una via si è verificato l'effetto della durata del PS sulla durata dell'incubazione (tempo in giorni che le femmine impiegano ad uscire dal bozzolo dal momento in cui vengono messe ad incubare). Il confronto multiplo tra campioni è stato effettuato con il test di Tukey.

2.3 Risultati

2.3.1 Tasso di respirometria

Nelle femmine con PS medio e lungo (figg. 2.3A e 2.3B), subito dopo lo sviluppo in adulti il tasso di respirometria è sceso fino a raggiungere livelli minimi di circa 0,10 ml/g/h di O₂ consumato e CO₂ prodotta, per poi risalire subito dopo l'esposizione a temperature fredde (10 e 4 °C). Ciò dimostra che l'abbassamento della temperatura dopo il PS fa salire il tasso di respirometria. Nelle femmine con solo 5 giorni di PS, invece, i livelli bassi del tasso minimo di respirometria non sono mai stati raggiunti ma si sono mantenuti intorno ai 0,20 ml/g/h (tasso al momento dello sviluppo in adulto). Quindi, in queste femmine non si è osservato un innalzamento brusco del tasso respiratorio con l'esposizione a 10 °C e 4 °C. In tutti i trattamenti, durante lo svernamento, il tasso di respirometria è salito progressivamente fino all'incubazione, anche se le femmine con PS breve mantenevano sempre un tasso di respirometria più elevato rispetto alle altre (figg. 2.3A e 2.3B).

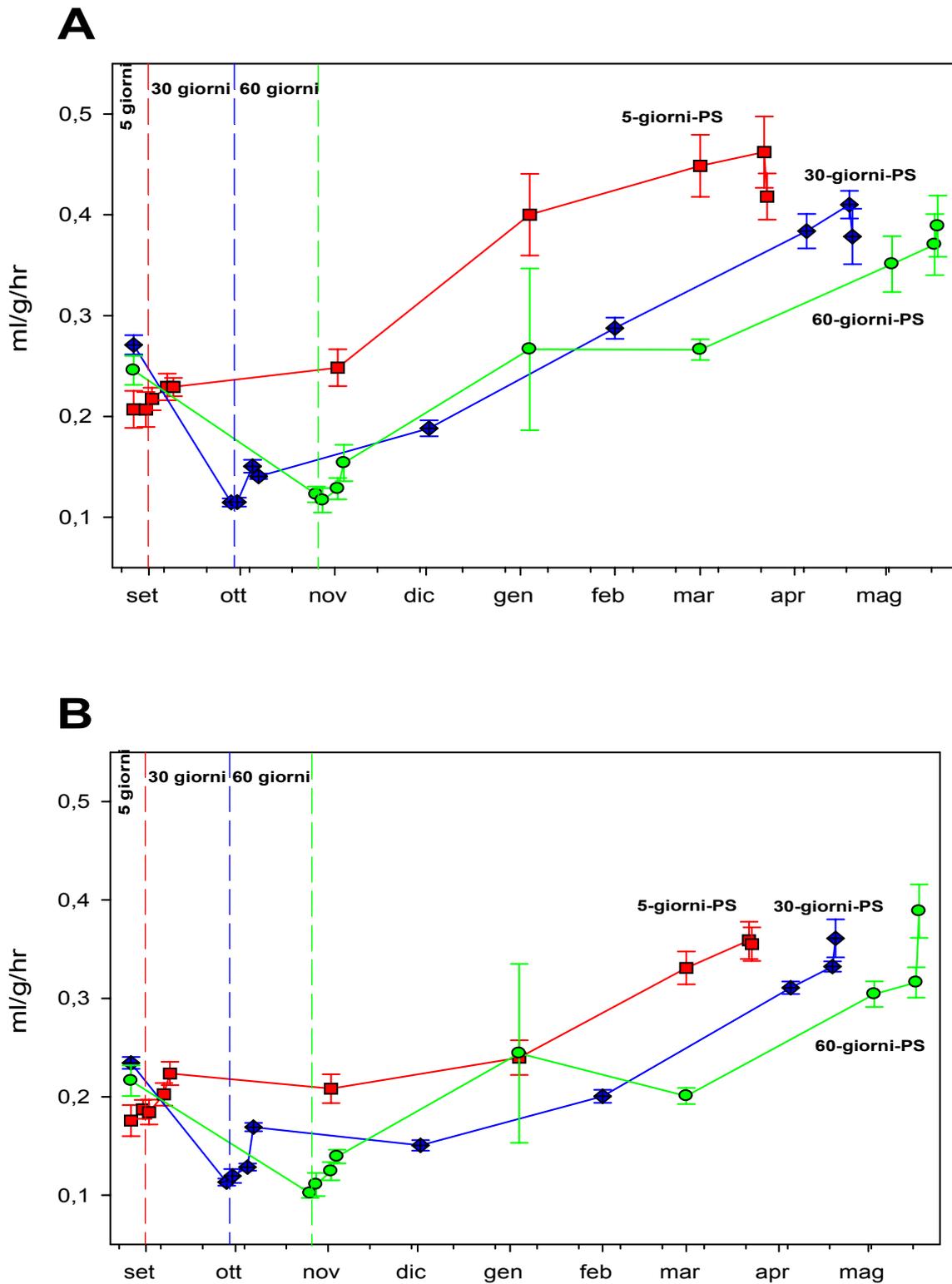


Figura 2.3 Consumo di O₂ (ml/g/hr) (A) e produzione di CO₂ (ml/g/hr) (B) durante il pre-svernamento (media±SE) e lo svernamento in femmine con 5, 30 e 60 giorni di pre-svernamento. Le linee tratteggiate indicano la data della fine del pre-svernamento per ogni trattamento.

2.3.2 Perdita di peso

Sia la durata del PS ($F_{(2,50)} = 11,39$; $p < 0,001$) sia le fasi del ciclo biologico ($F_{(2,100)} = 16,51$; $P < 0,001$) avevano un effetto significativo sulla perdita di peso e anche l'interazione tra i due fattori è risultata significativa ($F_{(4,100)} = 67,27$; $p < 0,001$).

La perdita di peso durante il PS aumentava con l'aumentare dei giorni trascorsi al caldo, e variava da $1,66 \pm 0,16\%$ per le femmine con 5 giorni di PS a $14,56 \pm 0,31\%$ per le femmine con 60 giorni di PS (fig. 2.4). Il tasso di perdita di peso giornaliero è stato di $0,45 \pm 0,03$ mg/giorno, $0,37 \pm 0,03$ mg/giorno, $0,33 \pm 0,03$ mg/giorno, rispettivamente per le femmine esposte a 5, 30 e 60 giorni di PS.

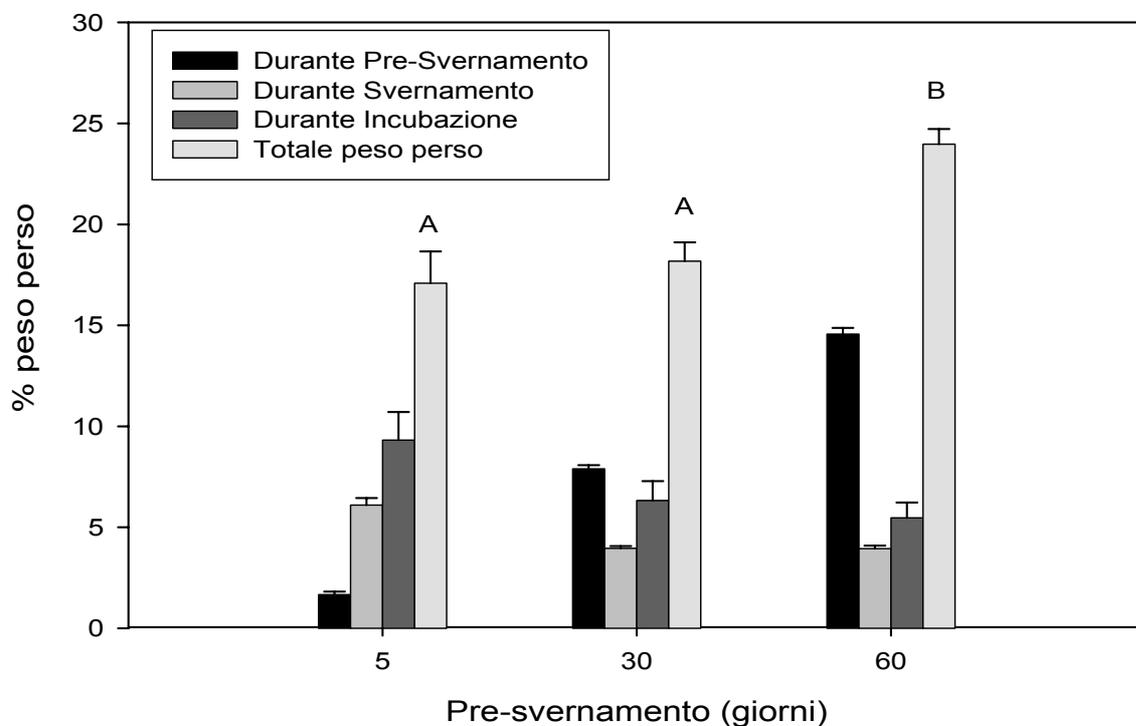


Figura 2.4 Percentuali di perdita di peso durante il pre-svernamento, lo svernamento, l'incubazione e la perdita di peso totale (dallo sviluppo in adulto alla fuoriuscita dal bozzolo) in femmine di *Osmia lignaria* pre-svernate per 5, 30 e 60 giorni. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra le femmine con diversa durata di pre-svernamento nella percentuale del peso totale perso (Test di Tukey: $P < 0,05$).

Durante lo svernamento la perdita di peso media era di circa 4% nelle femmine esposte a 30 e 60 giorni di PS mentre era attorno al 6% nelle femmine con 5 giorni di PS. Nei 196 giorni di svernamento (+ 7 di acclimatizzazione), uguale per tutti i trattamenti, le femmine con 5 giorni di PS hanno perso più peso ($0,040 \pm 0,001$ mg/giorno) della altre

(0,027±0,001 mg/giorno) (fig. 2.4). Il tasso di perdita di peso giornaliero durante lo svernamento tuttavia è stato in media di circa 10 volte inferiore che durante il PS.

La perdita di peso durante l'incubazione a 20 °C è stata di nuovo più elevata nelle femmine con 5 giorni di PS (circa 10%) che nelle altre (5-6%), perchè le femmine con 5 giorni di PS hanno impiegato più tempo per uscire dal bozzolo (vedi di seguito). Il tasso di perdita giornaliero di peso durante l'incubazione è stato in media di 1,90±0,38 mg/giorno, 2,30±0,40 mg/giorno e 1,77±0,40 mg/giorno, rispettivamente per le femmine con 5, 30 e 60 giorni di PS, e quindi più elevato che durante il PS.

In totale, dallo sviluppo in adulti alla fuoriuscita dal bozzolo, la perdita di peso nelle femmine con 60 giorni di PS è stata del 6-7% più elevata che nelle femmine esposte agli altri due trattamenti ($F_{(2,50)}=10,103$ $p=0,0002$) (fig. 2.4).

2.3.3 Corpi grassi e lipidi totali

La durata del PS ha un effetto significativo sul consumo dei corpi grassi, così come appaiono nelle immagini ai raggi X. Usando solo gli individui sopravvissuti, al termine del PS sono emerse differenze significative tra i tre trattamenti nelle percentuali di individui appartenenti alle classi con punteggio <1 e ≥ 1 ($\chi^2= 89,26$; $df = 2$; $p < 0,001$) (fig. 2.5). Nelle femmine con 5 giorni di PS quasi tutti gli individui avevano un punteggio < 1 (minor consumo di corpi grassi) mentre in quelle di 60 giorni tutti gli individui appartenevano alla classe con punteggio ≥ 1 . Le femmine con 30 giorni di PS presentavano circa il 30% e il 70% di individui con punteggio < 1 e ≥ 1 , rispettivamente (fig. 2.5).

L'accumulo di cataboliti all'apice dell'addome (meconio) durante lo svernamento sembra provocare una dilatazione dell'intestino. Come i corpi grassi, anche il meconio e l'intestino appaiono bianchi ai raggi X (fig. 2.6) e quindi non è stato possibile assegnare con sicurezza un punteggio dopo lo svernamento. Per questo motivo, in figura 2.5 si riportano solo i punteggi dopo il PS mentre sono omessi quelli ottenuti dopo lo svernamento.

I risultati emersi dall'estrazione dei lipidi confermano l'ipotesi del consumo dei corpi grassi durante il PS e indicano che, anche se non misurato per i motivi sopra segnalati, probabilmente avviene un consumo importante dei corpi grassi anche durante lo svernamento. Sia la durata del PS ($F_{(2,51)} = 107,83$; $P < 0,001$) sia le fasi del ciclo, PS e svernamento, ($F_{(2,51)} = 340,89$; $P < 0,001$), influenzano significativamente il consumo dei lipidi. Il contenuto medio di lipidi è sceso dal 12% in adulti con 5 giorni di PS a circa la metà dopo 60 giorni di PS (fig.2.7). In tutti i trattamenti la % di lipidi dopo lo svernamento è stata significativamente più

bassa rispetto a prima dello svernamento. Le femmine con 60 giorni di PS presentavano significativamente meno lipidi rispetto agli altri due trattamenti al termine dello svernamento (fig. 2.7). L'interazione tra durata del PS e fase del ciclo biologico è risultata significativa ($F_{(2,51)} = 4,01$; $p = 0,024$). Dopo lo svernamento non sono emerse differenze significative tra le femmine con 5 giorni di PS e quelle con 30 di PS; ciò indica che durante lo svernamento le femmine con breve PS hanno consumato più lipidi di quelle con PS medio-lungo.

E' emersa una relazione tra il contenuto di lipidi totali al termine del PS e il grado di consumo dei corpi grassi (R di Spearman: $-0,80$; $p < 0,001$), infatti all'aumentare della percentuale di lipidi diminuiva il punteggio ottenuto col metodo dei raggi X (fig. 2.8). Questo dimostra che le radiografie costituiscono un buon strumento diagnostico per valutare il grado di consumo dei corpi grassi prima che le osmie vengano messe a svernare.

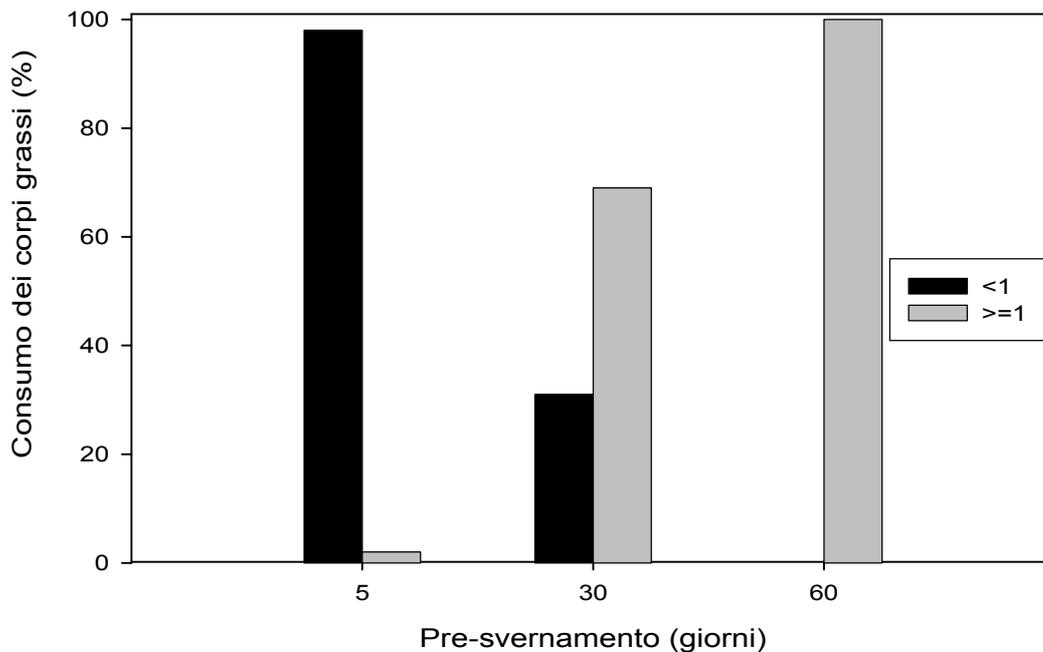


Figura 2.5 Percentuale di individui con punteggio di consumo di corpi grassi < 1 e ≥ 1 nelle femmine con 5, 30 e 60 giorni di pre-svernamento.

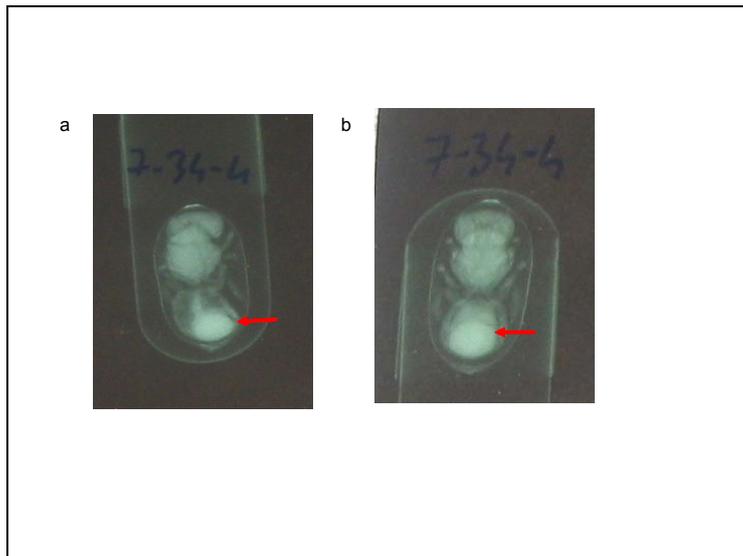


Figura 2.6 Immagini ai raggi X di una femmina di *Osmia lignaria* con 60 giorni di pre-svernamento dopo il pre-svernamento (a) e dopo lo svernamento (b). Durante lo svernamento il meconio (indicato dalla freccia) durante lo svernamento viene a riempire parzialmente gli spazi “vuoti” (neri nell’immagine) osservati alla fine del pre-svernamento.

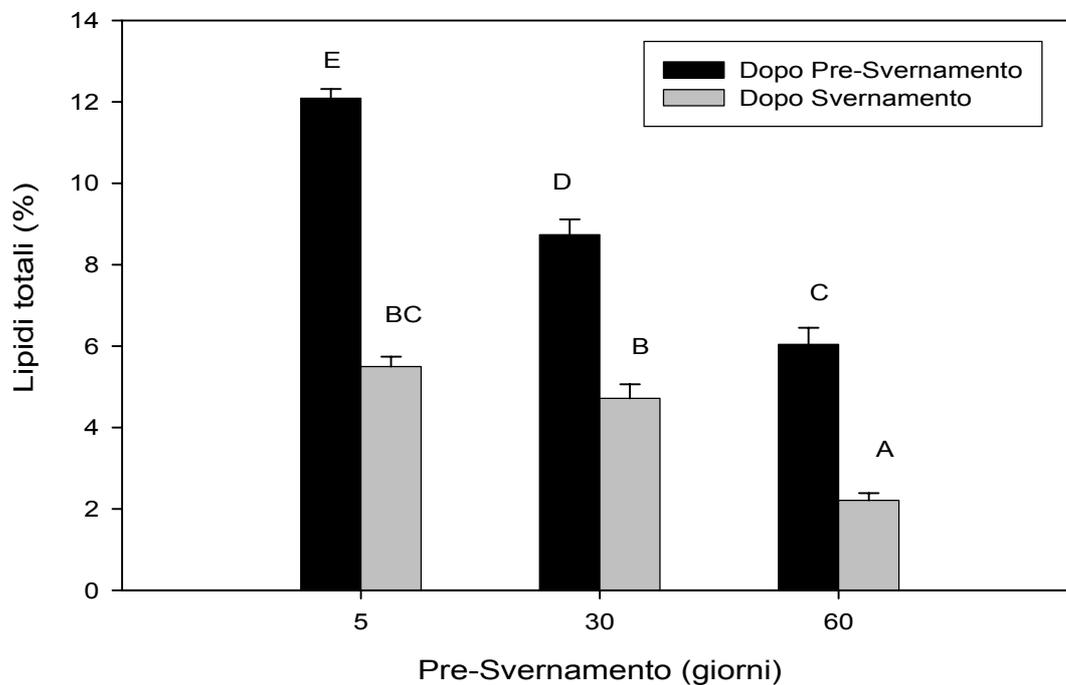


Figura 2.7 Percentuale di lipidi totali (media±SE) dopo il pre-svernamento e lo svernamento in femmine di *Osmia lignaria* con 5, 30 e 60 giorni di pre-svernamento. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative (Test di Tukey: $P < 0,05$)

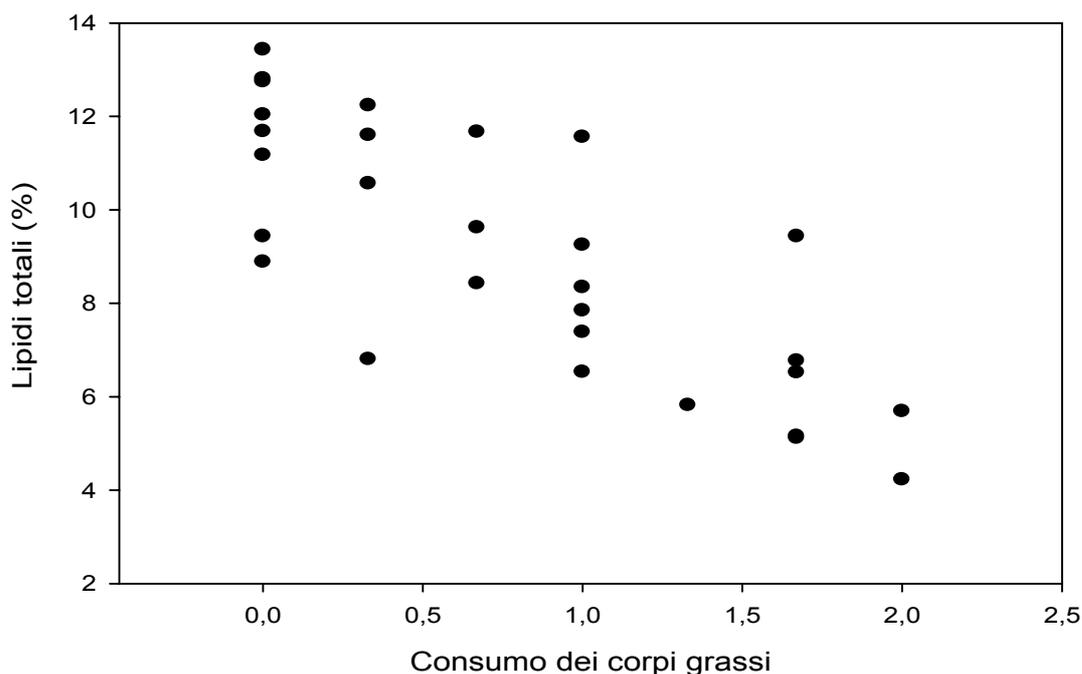


Figura 2.8 Relazione tra il grado di consumo dei corpi grassi e la percentuale di lipidi totali, al termine del pre-svernamento.

2.3.4 Maturazione degli oociti

E' stata osservata una maturazione degli ovari durante il PS (fig. 2.9). La lunghezza media dei 6 oociti basali aumentava con l'aumentare dei giorni di PS ($H_{(2,27)} = 17,68$; $p < 0,001$): gli oociti delle femmine con 60 giorni PS erano il 36% più lunghi di quelli di femmine con 5 giorni di PS. Durante lo svernamento la crescita degli oociti non è stata considerevole, per cui le differenze tra i tre trattamenti sono rimaste significative ($H_{(2,36)} = 23,69$; $p < 0,001$). Nei giorni di incubazione, la lunghezza media dei 6 oociti basali delle femmine con breve e medio PS sono aumentate rispettivamente del 46% e del 35%, contro il 9% registrate per le femmine con lungo PS (fig. 2.9). Gli oociti basali di femmine con PS corti hanno quindi avuto una maggiore crescita durante l'incubazione e non sono emerse differenze significative tra i tre trattamenti al momento della fuoriuscita dal bozzolo ($H_{(2,44)} = 4,10$; $p = 0,13$).

Nel corso della maturazione degli ovari, oltre ad una crescita degli oociti, sono state osservate modificazioni delle cellule nutrici che, svolgendo la loro attività trofica, tendevano a svuotarsi fino a scomparire. La degenerazione completa delle cellule nutrici dell'ultimo oocita dopo l'incubazione è stata osservata in 3, 4 e 2 femmine, rispettivamente con 5, 30 e 60 giorni di PS.

2.3.5 Sopravvivenza e durata dell'incubazione

La durata del PS ha un effetto negativo sul tasso di sopravvivenza delle osmie (fig. 2.10) che è risultato significativamente inferiore in quelle con 60 giorni di PS (77%) che in quelle con PS medio e corto (96 e 98%) ($\chi^2 = 17,38$; gdl = 2; $p = 0,0002$). Una volta messe ad incubare, le femmine con 5 giorni di PS hanno impiegato circa 2,5 giorni in più per uscire dal bozzolo rispetto alle femmine con 30 e 60 giorni di PS ($F_{(2,71)} = 4,02$; $p = 0,022$) (fig. 2.10).

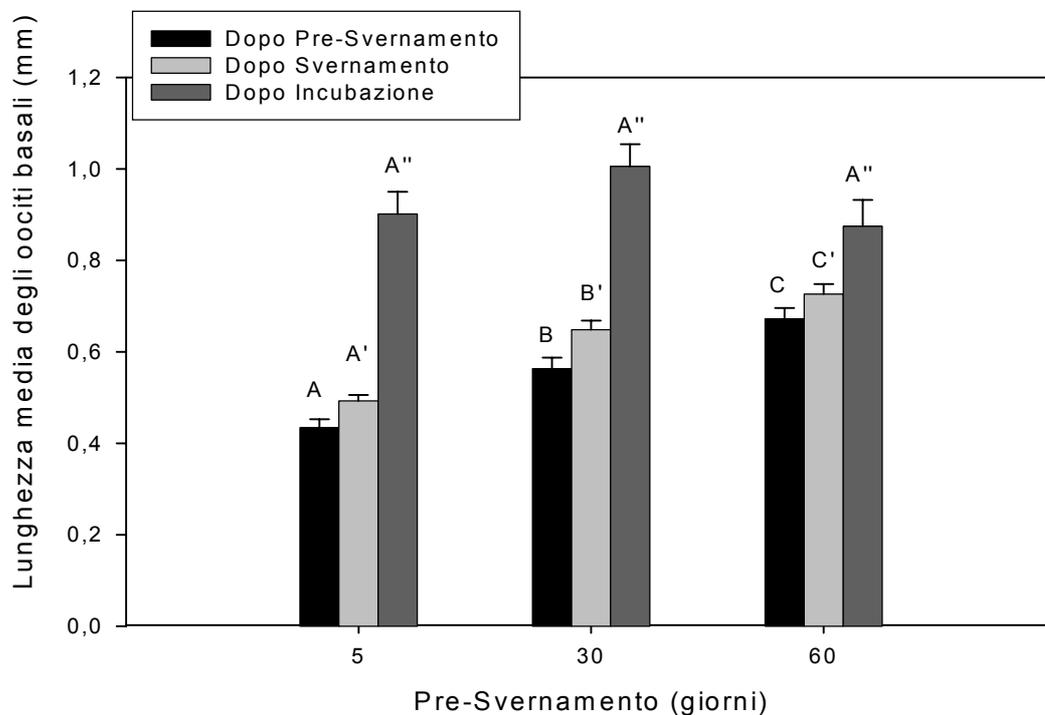


Figura 2.9 Lunghezza media (in mm) dei 6 oociti basali (media \pm SE) al termine del pre-svernamento, dello svernamento e dell'incubazione in femmine di *Osmia lignaria* presvernate per 5, 30 e 60 giorni. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative (Test di Tukey: $P < 0,05$).

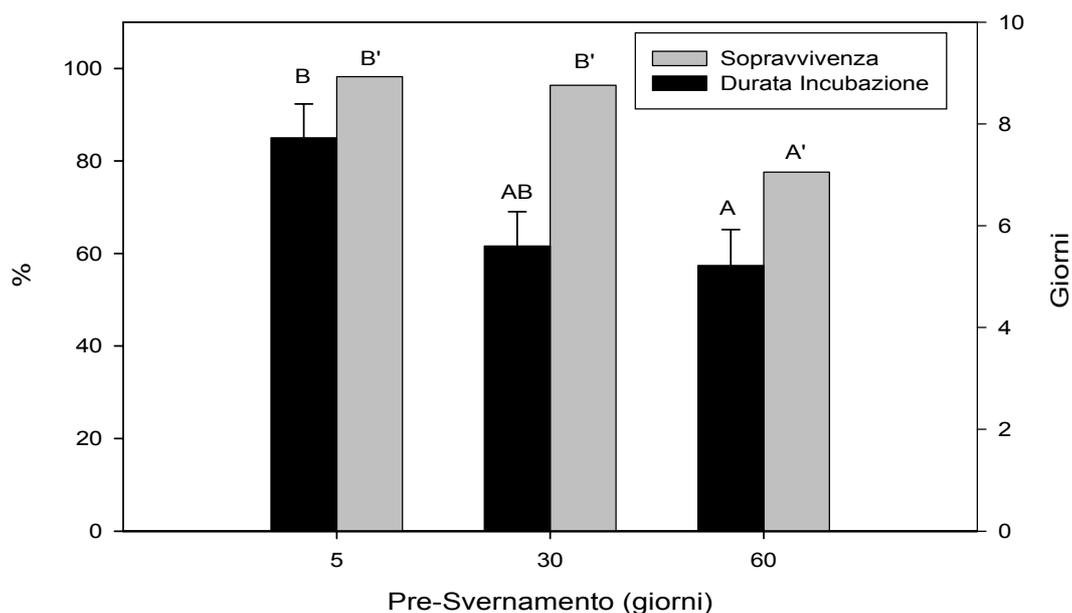


Figura 2.10 Durata media dell'incubazione (media \pm SE) e percentuale di sopravvivenza in femmine di *Osmia lignaria* con 5, 30 e 60 giorni di pre-svernamento. Lettere diverse dello stesso tipo indicano differenze statisticamente significati (Test di Tukey: $P < 0,05$).

2.4 Discussione

In questo studio abbiamo selezionato tre trattamenti (in base alle diverse durate del pre-svernamento - PS) simulando l'arrivo più o meno precoce dell'inverno (inteso come temperature fredde) e abbiamo misurato diversi parametri ecofisiologici riguardanti la diapausa e la sopravvivenza invernale. Per poter isolare l'effetto del PS dall'effetto dello svernamento, la durata di quest'ultimo è stata uguale per tutti i trattamenti. I risultati ottenuti dimostrano che le condizioni di PS hanno avuto un effetto significativo su tutti i parametri misurati e, in ultimo, sulla sopravvivenza.

2.4.1 Sviluppo della diapausa

L'*osmia* adulta entra in diapausa indipendentemente dagli stimoli termici (Bosch, Kemp e Sgolastra, non pubblicato; questo studio). Una volta che il tasso di respirometria è sceso, occorre uno stimolo di abbassamento della temperatura per farlo salire. A differenza di altri insetti (Danks 1987; Hodek e Hodková 1988; Nomura e Ishikawa 2000), l'esposizione

per un adeguato periodo di tempo alle basse temperature è essenziale affinché avvenga il regolare sviluppo della diapausa. Infatti individui non esposti o esposti per un breve periodo di tempo a basse temperature mantengono un basso tasso di respirometria (capitolo 3) e una volta messi ad incubare necessitano di molti giorni per uscire dal bozzolo oppure muoiono prima (Bosch e Kemp 2003, 2004; capitolo 3).

Il tasso di respirometria è stato spesso usato come indice dello stato di diapausa negli insetti (Danks 1987) e con poche eccezioni, esso segue una curva con andamento ad U durante il corso della diapausa. Inoltre, durante la diapausa il tasso di respirometria è relativamente indipendente dalla temperatura (Wigglesworth 1972; Tauber et al. 1986). Generalmente come la diapausa inizia e si intensifica, il tasso di respirometria decresce e continua a scendere fino a raggiungere il suo valore minimo (Tauber et al. 1986). Il tasso di respirometria osservato nelle osmie durante il PS e lo svernamento non segue un chiaro andamento ad U. Le femmine con 5 giorni di PS, ad esempio, a causa della precoce esposizione alle fredde temperature, non raggiungono mai uno stato profondo di diapausa, e durante tutto lo svernamento mantengono un tasso di respirometria sempre più elevato rispetto a femmine con più giorni di PS. Eppure, le femmine con 5 giorni di PS hanno una sopravvivenza (questo studio) ed una vigoria (Bosch, Kemp e Sgolastra, non pubblicato) simile, se non più elevata, delle femmine con 30 giorni di PS. Questo dimostra una sorprendente plasticità nel meccanismo di sviluppo della diapausa e in altri aspetti fisiologici dello svernamento (vedi avanti) in questa specie. Dal punto di vista della dinamica di popolazioni, questa plasticità è molto importante perché consente un alto grado di sopravvivenza in anni con inverni precoci.

2.4.2 Perdita di peso, consumo delle riserve lipidiche e sopravvivenza

Durante il PS avviene una perdita di peso e un consumo molto elevato di corpi grassi e lipidi. Monzón (1998) ha dimostrato, che durante il PS, in adulti di *O. cornuta* vi è anche un elevato consumo delle proteine dei corpi grassi. Quindi, il costo metabolico per mantenere un basso tasso di respirometria quando le temperature sono elevate è alto. Ciò coincide con quanto dimostrato da Jean et al. (1990) per adulti di coccinelle di *Coleomegilla maculata*, in cui tasso giornaliero di perdita di peso e di consumo di lipidi è superiore a temperature alte che a temperature basse. Nel Lepidottero Tortricide *Choristoneura fumiferana*, che entra in diapausa nella stagione estiva come larva, è stato dimostrato che l'esposizione ad alte temperature per un lungo periodo di tempo prima dell'inverno provoca una sostanziale perdita di lipidi e riduce la sopravvivenza larvale (Han e Bause 1997, 1998). In questa specie il

periodo di inizio della diapausa dipende principalmente dal tasso di sviluppo della popolazione parentale che a sua volta dipende dalla temperatura, dalle condizioni alimentari e da altri fattori biotici e abiotici. Pertanto l'inizio della diapausa può variare di anno in anno e da varie località geografiche. Questi risultati coincidono con quanto dimostrato in *O. cornuta* in cui individui presvernati per 15 giorni perdono meno peso, presentano una sopravvivenza e una vigoria maggiore dopo la fuoriuscita dal bozzolo di quelli presvernati per 45 o 75 giorni (Bosch e Kemp 2004). Per questi motivi, possiamo dire che le femmine di *O. lignaria* con 5 giorni di PS iniziano lo svernamento con un "vantaggio fisiologico" rispetto alle femmine con PS medio e lungo. Tuttavia, come già detto, le femmine con 5 giorni di PS mantengono durante tutto lo svernamento un tasso metabolico più elevato e al termine dello svernamento mostrano livelli di lipidi e perdita di peso comparabili a quelli di femmine con 30 giorni di PS. Anche la percentuale di sopravvivenza è risultata simile tra femmine con PS breve e medio. Le femmine con 60 giorni di PS, invece, anche se perdono meno peso e lipidi durante lo svernamento, non recuperano mai il loro "svantaggio" iniziale. Infatti, queste femmine hanno una maggiore mortalità invernale.

La perdita di peso e di corpi grassi hanno ripercussioni importanti sulla fitness individuale delle osmie. Sia in *O. lignaria* che in *O. cornuta*, femmine con minor peso hanno una minore probabilità di iniziare a nidificare (Tepedino e Torchio 1989; Bosch e Vicens 2006). In queste ed altre specie di *Osmia* alcuni studi (Sugiura e Maeta 1989; Bosch e Vicens 2006; Bosch e Kemp, non pubblicato; ma non altri: Tepedino e Torchio 1982; Frohlich e Tepedino 1986; Bosch e Vicens 2006) hanno trovato un rapporto fra peso corporeo, tasso di approvvigionamento e sex ratio della progenie: le femmine con minore peso tendono a produrre più maschi (di taglia minore delle femmine). Strohm (2000) ha trovato una correlazione positiva tra taglia corporea e contenuto relativo di lipidi nella vespa solitaria *Philanthus triangulum*, tuttavia non sono stati trovati effetti di diverse temperature di svernamento su questi due fattori. Le femmine di *O. lignaria* con PS lungo hanno anche una minore vigoria (Bosch, Kemp e Sgolastra, non pubblicato). Rimane da vedere se questa minore vigoria si traduce in una minore longevità in condizioni naturali. Se fosse così, questo potrebbe avere delle ripercussioni molto importanti sulla fitness, poiché in *O. cornuta* la longevità è strettamente legata alla fecondità (Bosch e Vicens 2006).

La relazione fra il contenuto lipidico e il punteggio ottenuto in base alle immagini dei corpi grassi ai raggi X alla fine del PS, dimostra che le radiografie costituiscono un buon strumento diagnostico per la valutazione del grado di consumo delle riserve lipidiche durante

il PS. Questo metodo non è però risultato adeguato per valutare il consumo dei corpi grassi al termine dello svernamento a causa dell'aumento del meconio e della dilatazione dell'intestino che avviene durante lo svernamento. Tuttavia, questo studio dimostra che vi è una notevole perdita di lipidi non solo durante il PS ma anche durante lo svernamento.

2.4.3 Maturazione degli ovari e inizio della nidificazione

I nostri risultati dimostrano che le dimensioni degli oociti aumentano durante i giorni di PS mentre durante lo svernamento la crescita è molto ridotta, e poi diventa molto rapida durante l'incubazione. Per questo motivo al termine dello svernamento, le femmine che hanno avuto un PS più lungo presentavano oociti di maggiori dimensioni. Le femmine con 5 giorni di PS cominciavano lo svernamento con gli oociti meno sviluppati, però, siccome necessitano di più giorni di incubazione, al momento della fuoriuscita dal bozzolo hanno uno sviluppo ovarico simile a quello di femmine con 30 e 60 giorni di PS. In alcune femmine appena uscite dal bozzolo sono stati trovati oociti basali fortemente sviluppati, privi cioè di cellule nutrici. Subito dopo la fuoriuscita dal bozzolo, in genere, le osmie non iniziano a nidificare prima di 2-3 giorni. Questo periodo di pre-nidificazione sembra essere strettamente legato allo sviluppo degli ovari ed è fortemente influenzato dalle condizioni meteorologiche (Maeta 1978; Bosch e Kemp 2001; Bosch non pubblicato). La disponibilità di risorse trofiche in questa fase può perciò essere necessaria alle osmie per terminare il processo di vitellogenesi e lo sviluppo completo degli ovari. Infatti, secondo Richards (1994), in *Megachile rotundata*, l'accesso al polline e al nettare dopo la fuoriuscita dal bozzolo è necessario per stimolare l'inizio della vitellogenesi. Anche se nel nostro studio le dimensioni degli oociti basali delle femmine appena fuoriuscite dal bozzolo non differivano significativamente tra le femmine esposte a diverse durate di PS, non è da escludere che il minor contenuto di riserve energetiche possa influire sulla loro vigoria dopo la fuoriuscita dal bozzolo, come avvenuto in uno studio precedente (Bosch, Kemp e Sgolastra, non pubblicato). In particolare, in annate in cui le condizioni climatiche non sono favorevoli o ci sono fioriture scarse le femmine con lunghi PS potrebbero avere più difficoltà delle altre ad accedere alle risorse trofiche e quindi a completare la maturazione degli ovari.

Pur simulando durate di PS non estreme, ma vicine a quelle naturali, sono emerse considerevoli differenze fisiologiche fra femmine esposte a durate di PS diverse. Ciò dimostra che il momento di sviluppo in adulto e le temperature a fine estate-inizio autunno possono avere un ruolo cruciale sulla fitness individuale e sulla dinamica di popolazione di questa

specie. La plasticità osservata nello sviluppo della diapausa consente alle popolazioni di *O. lignaria* di affrontare con successo inverni precoci. Gli anni con inverni tardivi, invece, sono associati ad un alto costo metabolico e hanno notevoli ripercussioni negative sulle popolazioni di *O. lignaria*. Studi futuri dovrebbero verificare se la durata del PS influisce sulla data di inizio della nidificazione e se i livelli di consumo dei corpi grassi e dei lipidi hanno un effetto sulla longevità, strettamente legata alla fecondità (Bosch e Vicens 2006). Il rapporto fra durata del PS e la vigoria al momento dello fuoriuscita dal bozzolo (Bosch e Kemp 2004) e la sopravvivenza (questo studio) suggeriscono che questo rapporto può esistere. Secondo una ipotesi alternativa, gli individui che dopo l'uscita dal bozzolo presentano una vigoria sufficiente per volare fino ai fiori più vicini ed alimentarsi di nettare e polline, potrebbero recuperare i livelli di riserve metaboliche perse durante il PS e "azzerare il cronometro".

Capitolo 3

Sviluppo della diapausa in *Osmia lignaria* a diversi regimi di svernamento

3.1 Introduzione

Osmia lignaria Say è un Apoideo solitario del nord America. E' una specie monovoltina che sverna come adulto all'interno del bozzolo. Gli adulti sono attivi in primavera da marzo a maggio, secondo le latitudini. In questo periodo, come le temperature diventano più calde, prima i maschi e poi le femmine fuoriescono dal bozzolo e dai nidi. Subito dopo avviene l'accoppiamento e dopo circa 2-4 giorni le femmine cercano una cavità idonea per iniziare l'attività di nidificazione. I nidi sono ricavati da cavità preesistenti e ognuno è costituito da una serie lineare di celle divise da setti di fango. La femmina approvvigiona ogni cella con una massa di polline e nettare sulla quale depone un uovo. In genere nelle celle più interne sono deposte uova femminili mentre in quelle più esterne uova maschili. Dall'uovo schiude la larva che si ciba della provvigione e, dopo 5 stadi larvali, inizia a tessere il bozzolo. A fine estate avviene la metamorfosi in adulto che rimane all'interno del bozzolo fino alla primavera successiva.

Per la loro capacità di essere attive anche a basse temperature e con scarsa intensità luminosa, *O. lignaria* in Nord America e *O. cornuta* in Europa, sono considerate delle ottime alternative all'*Apis mellifera* per l'impollinazione di molte piante che fioriscono in primavera precoce come meorlo, pero, melo e ciliegio (Torchio 1984; Vicens e Bosch 2000a; Bosch e Kemp 2001). L'allevamento in condizioni artificiali o semi artificiali si rende necessario quando si gestiscono grandi popolazioni di osmie da utilizzare per l'impollinazione. Dato che la fioritura di queste colture dura solo 2-3 settimane, per ottenere una buona impollinazione e resa è importante sincronizzare il picco di fioritura della coltura target da impollinare con il picco di attività di volo delle osmie. Infatti, se le femmine escono dai bozzoli quando i fiori non sono ancora aperti, molte di loro si disperderanno alla ricerca di altre piante in fioritura.

Se le femmine invece escono troppo tardi, quando le piante sono in sfioritura, molti fiori non saranno stati impollinati. Sincronizzare il periodo della nidificazione con la fioritura è importante non solo per ottimizzare l'impollinazione ma anche per aumentare la riproduzione delle osmie. Per questi motivi è necessario conoscere i meccanismi fisiologici e i fattori ambientali che regolano lo svernamento in *O. lignaria*.

Alcuni studi (Tasei 1973; Bosch e Blas 1994; Bosch e Kemp 2003, 2004) hanno dimostrato come le condizioni termiche (temperature e durate) durante l'inverno influenzano lo sviluppo e la sopravvivenza di *O. lignaria* e della specie sorella europea *O. cornuta*. Entrambe queste specie richiedono l'esposizione per un adeguato periodo a temperature basse (svernamento) seguito da uno più caldo (incubazione), affinché siano in grado di uscire prontamente dal bozzolo la primavera successiva (Bosch e Kemp 2003, 2004). La durata dello svernamento ha un notevole effetto sulla durata dell'incubazione nelle osmie, infatti, il numero di giorni di caldo richiesto per uscire dal bozzolo al termine dello svernamento è minore se le osmie sono state esposte per un periodo abbastanza lungo a temperature fredde. Una durata dello svernamento troppo lunga (> 180 giorni) o troppo breve (< 90 giorni) fa diminuire il tasso di sopravvivenza, soprattutto a temperature di svernamento relativamente alte (7 °C). Tuttavia è stato dimostrato che all'aumentare della temperatura di svernamento (da 0 °C a 7 °C) diminuiscono i giorni di incubazione richiesti per la fuoriuscita dal bozzolo. In altre parole, i giorni di incubazione necessari alle osmie per fuoriuscire dal bozzolo al termine dello svernamento diminuiscono con l'aumentare della durata e della temperatura dello svernamento (Bosch e Blas 1994; Bosch e Kemp 2003, 2004).

Il tasso di respirometria, in particolare il consumo di O₂, è stato spesso usato come indice dello stato di diapausa negli insetti (Danks 1987) e con poche eccezioni, esso segue una curva con andamento ad U. Durante il corso della diapausa questo tasso è relativamente indipendente dalla temperatura (Wigglesworth 1972; Tauber et al. 1986). Studi precedenti sul tasso di respirometria di *O. lignaria* (Kemp et al. 2004; Bosch, Kemp e Sgolastra, non pubblicato) hanno dimostrato che durante la diapausa invernale, dopo circa due settimane dallo sviluppo in adulto, il tasso di respirometria cala per un breve periodo e sembra poi aumentare nel momento in cui gli individui sono trasferiti prima a 14 °C (acclimatizzazione) e poi a 4 °C (svernamento). La temperatura assumerebbe quindi un ruolo importante in questa fase. Infatti, è stato dimostrato che se si prolunga artificialmente la durata del pre-svernamento (PS), esponendo le osmie per 60 giorni a temperature alte, il loro tasso di respirometria continua a scendere e si mantiene a livelli bassi fino a quando non vengono

esposte a temperature più basse. Viceversa, osmie esposte precocemente a basse temperature (breve PS) non raggiungono mai livelli bassi di respirometria (capitolo 2).

In questo studio è stato misurato il tasso di respirometria e la perdita di peso durante la diapausa invernale in femmine di *O. lignaria* svernate a diverse condizioni di temperatura e di durata. Gli obiettivi specifici di questo studio sono:

- 1) comprendere come il regime termico di svernamento (temperatura e durata) influenza lo sviluppo e il completamento della diapausa invernale in femmine di *O. lignaria*;
- 2) usare l'andamento del tasso di respirometria e della perdita di peso per interpretare i risultati su sopravvivenza, tempo di fuoriuscita dal bozzolo e vigoria ottenuti sotto diversi trattamenti invernali in uno studio precedente (Bosch e Kemp 2003).

I risultati di questa ricerca possono contribuire a comprendere meglio la fisiologia della diapausa nelle osmie, a migliorare i metodi di allevamento, e a sincronizzare il periodo di sfarfallamento delle osmie allevate in condizioni artificiali con la fioritura della coltura da impollinare.

3.2 Materiali e metodi

3.2.1 Esperimento 1: temperatura di svernamento

3.2.1.1 Popolazione e metodi di allevamento

Una popolazione di *O. lignaria* è stata rilasciata il 1° maggio in un meleto situato nei pressi di North Logan (Utah, USA). Come materiale di nidificazione sono stati usati diversi blocchi di legno forati provvisti di cannuce di carta (15 cm di lunghezza, 7,5 mm di diametro). Il 20 giugno, al termine del periodo di nidificazione, i nidi sono stati portati presso il Bee Biology & Systematics Laboratory, Logan, Utah e sono stati divisi in due parti: una parte è stata mantenuta in un incubatore a 22 °C, mentre gli altri sono stati tenuti in un granaio aperto presente nel meleto. Ogni tre giorni a partire dal 5 agosto, periodo previsto di inizio dello sviluppo in adulto (Bosch e Kemp 2000), tutti i nidi nelle cannuce di carta (sia quelli in laboratorio che quelli all'aperto) sono stati radiografati (Stephen e Undurraga 1976). Le radiografie sono state usate per stabilire il sesso degli individui (in genere, le femmine sono più grandi dei maschi e si trovano nelle celle più interne nei nidi) (Torchio 1989; Bosch e Kemp 2001) e per stabilire la data di metamorfosi in adulto.

Più o meno nella parte centrale della curva dello sviluppo in adulto della popolazione allevata a 22 °C (metà agosto), sono state selezionate 28 femmine neo adulte (7 per trattamento). Queste femmine, sempre all'interno dei bozzoli, sono state estratte dalle cannuce di carta e singolarmente trasferite all'interno di capsule di gelatina trasparente. In seguito sono state presvernate a 22 °C per 30 giorni, poi trasferite a 14 °C per 7 giorni e infine, distribuite nei diversi trattamenti di svernamento: 0 °C, 4 °C, 7 °C e 22 °C. Quest'ultimo trattamento è stato scelto per simulare una situazione di assenza di svernamento, cioè queste femmine sono state mantenute alla temperatura di PS. Le osmie degli altri trattamenti sono state mantenute alle temperature di svernamento fino a metà aprile (dopo 203 giorni), in corrispondenza del periodo naturale di fuoriuscita dal bozzolo delle osmie nel nord dello Utah.

Dalla popolazione allevata in condizioni naturali sono state selezionate 7 femmine, estratte dalle cannuce di carta e trasferite in capsule di gelatina. Poi sono state lasciate presvernare e svernare in condizioni naturali all'interno di una scatola di plastica areata posta nel granaio. Queste femmine costituivano il trattamento "condizioni naturali".

3.2.1.2 Tasso di respirometria e perdita di peso

Per ogni femmina di ogni trattamento sono stati misurati i tassi di respirometria (O₂ consumato e CO₂ prodotta in ml/g/h). La prima misurazione è stata fatta dopo circa un mese dallo sviluppo in adulto, quando il tasso di respirometria aveva raggiunto i livelli più bassi (Bosch, Kemp e Sgolastra, non pubblicato; capitolo 2). In seguito, le misurazioni sono state effettuate una volta alla settimana fino al 1° ottobre e successivamente ogni due settimane fino al 14 aprile dell'anno successivo. Le misure di respirometria sono state fatte su 7 femmine contemporaneamente per 2 ore usando il Systems FC-1 O₂ Analyzer ® e il LI-COR 6251 CO₂ Analyzer ® operanti in modi differenziali con un tasso di flusso di 100 ml/min (<http://www.sablesys.com/pushmo2.html>). I bozzoli con le femmine sono stati distribuiti individualmente in cilindri di vetro e posizionati all'interno di un incubatore Peltier (a 22±1 °C), in cui veniva fatto circolare il flusso di aria. I dati sono stati raccolti attraverso il software di acquisizione dati Sable Systems, DATACAN® (<http://www.sablesys.com/datacan.html>). Dopo ogni misurazione le femmine all'interno dei bozzoli sono state pesate. Al termine dello studio, i bozzoli senza le femmine all'interno sono stati pesati e il peso del bozzolo è stato sottratto dai pesi precedentemente misurati al fine di ottenere il peso effettivo delle osmie ad ogni misurazione.

3.2.1.3 Analisi statistica

Il test ANOVA ad una via è stato utilizzato per verificare l'esistenza di differenze significative tra i trattamenti nella % di peso perso durante lo svernamento. Le percentuali di perdita di peso sono riferite al peso dell'osmia all'inizio dello svernamento e, per l'analisi statistica, sono state trasformate in $\arcsen\sqrt{x}$.

3.2.2 Esperimento 2: durata dello svernamento

3.2.2.1 Popolazione e metodi di allevamento

Una popolazione di *O. lignaria* è stata rilasciata a inizio aprile in un frutteto di ciliegio a North Ogden, Utah, USA. Blocchi di legno con cannuce di carta come quelli dell'esperimento 1 sono stati usati come materiale di nidificazione. Al termine del periodo di nidificazione (inizio maggio) i nidi sono stati trasferiti in laboratorio e posti in un incubatore che simulava il termoperiodo giornaliero di Logan, UT (a circa 50 km da North Ogden) degli ultimi 30 anni con termoperiodo di 12 ore (maggio = 18:11 °C; giugno = 21:15 °C; luglio = 24:18 °C; agosto = 22:15 °C). Le temperature massime di ogni termoperiodo corrispondono alla media fra la temperatura massima e la temperatura media mensile. Le temperature minime dei termoperiodi corrispondono alla media fra la temperatura media e la temperatura minima mensile.

Come per l'esperimento 1, nel periodo previsto di inizio pupazione, i nidi sono stati radiografati ogni 3 giorni ed è stato monitorato lo sviluppo in adulto. Il 23 agosto, all'incirca nella parte centrale della curva di sviluppo in adulti della popolazione, 50 bozzoli con femmine neo adulte (10 per trattamento) sono state assegnate in ugual numero a cinque diverse durate di svernamento: 28 giorni (4 settimane), 84 giorni (12 settimane), 140 giorni (20 settimane), 196 giorni (28 settimane) e 252 giorni (36 settimane).

Le condizioni di PS sono state identiche per tutti i trattamenti, cioè le femmine sono state mantenute a 22:15 °C (12:12 h) per 14 giorni dallo sviluppo in adulto e poi acclimate per una settimana a 10 °C. Successivamente le femmine sono state messe a svernare a 4 °C. Al termine delle diverse durate di svernamento, le osmie sono state messe ad incubare a 20 °C fino alla fuoriuscita dal bozzolo. Al termine dello studio su 10 femmine di ogni trattamento sono state calcolate la percentuale di sopravvivenza e la durata dell'incubazione (giorni che impiegano le femmine ad uscire dal bozzolo dal momento in cui vengono messe a 20 °C).

3.2.2.2 Tasso di respirometria e perdita di peso

I tassi di respirometria sono stati misurati su 7 femmine per ogni trattamento. Per ogni trattamento sono state effettuate almeno 5 misurazioni di respirometria: il giorno dopo lo sviluppo in adulto; al termine del PS; 7 giorni dopo il trasferimento a 4 °C; al termine dello svernamento a 4 °C; il giorno dopo il trasferimento a 20 °C (incubazione). Successivamente il tasso di respirometria veniva misurato ogni due settimane fino allo sfarfallamento. Il tasso di respirometria, espresso come consumo di O₂ e produzione di CO₂ (ml/g/hr), e il peso delle femmine sono stati misurati come per l'esperimento 1.

3.2.2.3 Analisi statistica

Le differenze tra i trattamenti nelle percentuali di perdita di peso riferite al momento in cui le osmie sono diventate adulte, sono state analizzate nell'ultima misurazione di respirometria prima dello sfarfallamento (o fino a quando erano ancora in vita per le femmine svermate per 28 giorni). Le percentuali sono state trasformate in $\arcsin\sqrt{x}$ ed è stato utilizzato un'ANOVA ad una via. Il test ANOVA ad una via è stato utilizzato anche per verificare differenze tra i 5 trattamenti di svernamento nella durata dell'incubazione e nella durata complessiva della diapausa (dallo sviluppo in adulto alla fuoriuscita dal bozzolo).

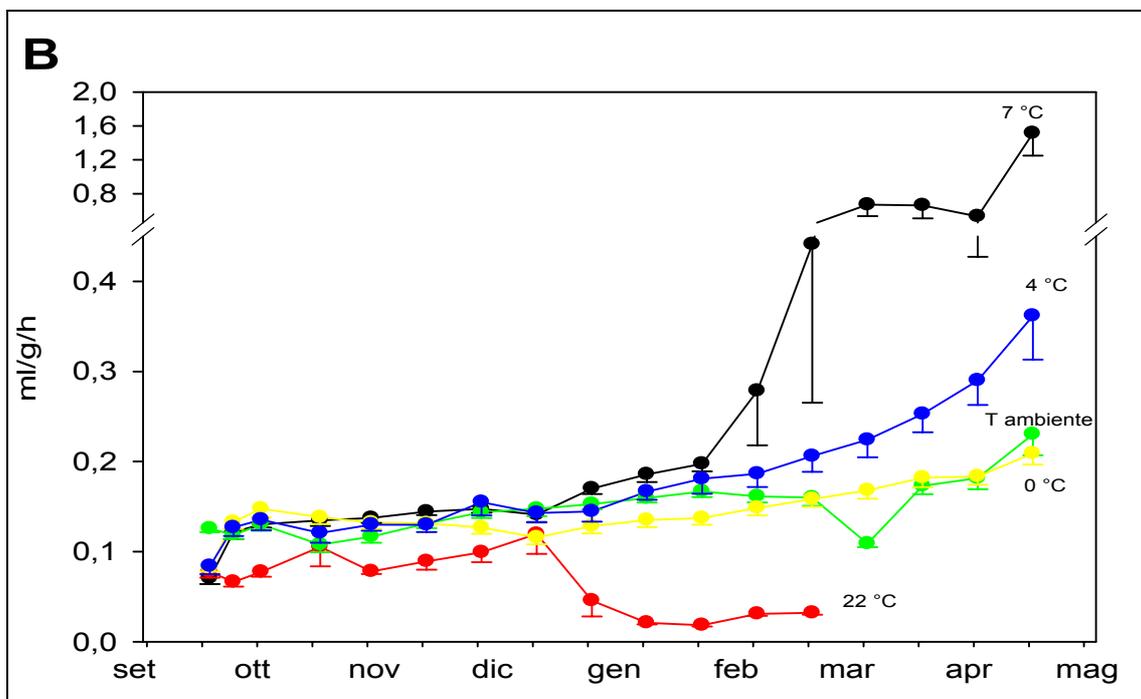
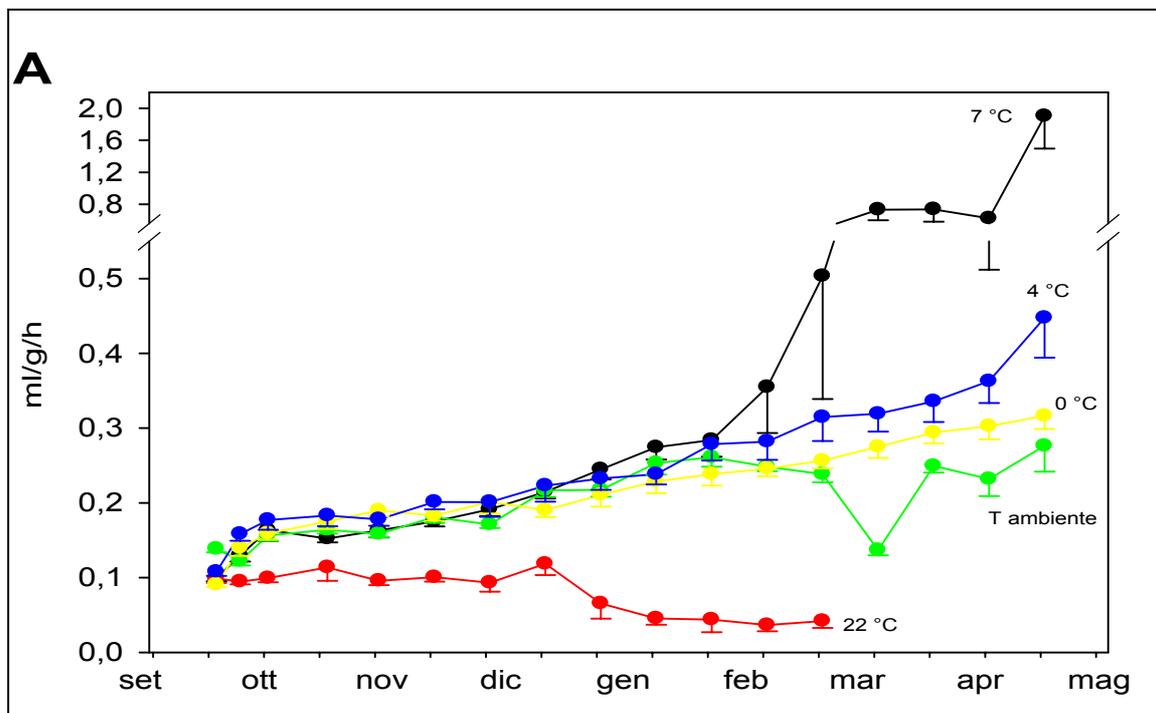
3.3 Risultati

3.3.1 Esperimento 1: temperatura di svernamento

3.3.1.1 Respirometria

Le misure di respirometria sono state iniziate cinque settimane dopo lo sviluppo in adulto, cioè quando il tasso di respirometria è a un livello minimo. Da lì in poi, il tasso di respirometria assume un andamento crescente in tutti i trattamenti, dal momento in cui vengono messe a svernare fino all'uscita dal bozzolo, ad eccezione di quelle mantenute costantemente a 22 °C (figg. 3.1A e 3.1B). Queste ultime mantengono sempre un tasso di respirometria più basso rispetto alle altre femmine e nessuna di loro è stata in grado di sopravvivere fino alla fuoriuscita dal bozzolo. Confrontando le femmine svermate a 0, 4 e 7 °C si nota che il tasso di respirometria aumenta più velocemente nelle femmine svermate a temperature più elevate. In particolare nella seconda parte dello svernamento (ad inizio febbraio, dopo circa 120 giorni dall'inizio dello svernamento), il consumo di O₂ e la produzione di CO₂ delle femmine svermate a 7 °C aumentano in modo quasi esponenziale. Le

femmine svernate a temperatura ambiente (temperatura media del periodo: 3,18 °C con un range compreso tra -14,78 °C e 18,35 °C) presentano un tasso di respirometria simile a quello delle femmine svernate a 4 °C fino a metà gennaio (temperatura media: 3,18 °C con un range compreso tra -10,77 °C e 16,4 °C), successivamente è simile a quello delle femmine svernate 0 °C (temperatura media: 3,17 °C con un range compreso tra -14,78 °C e 18,35 °C).



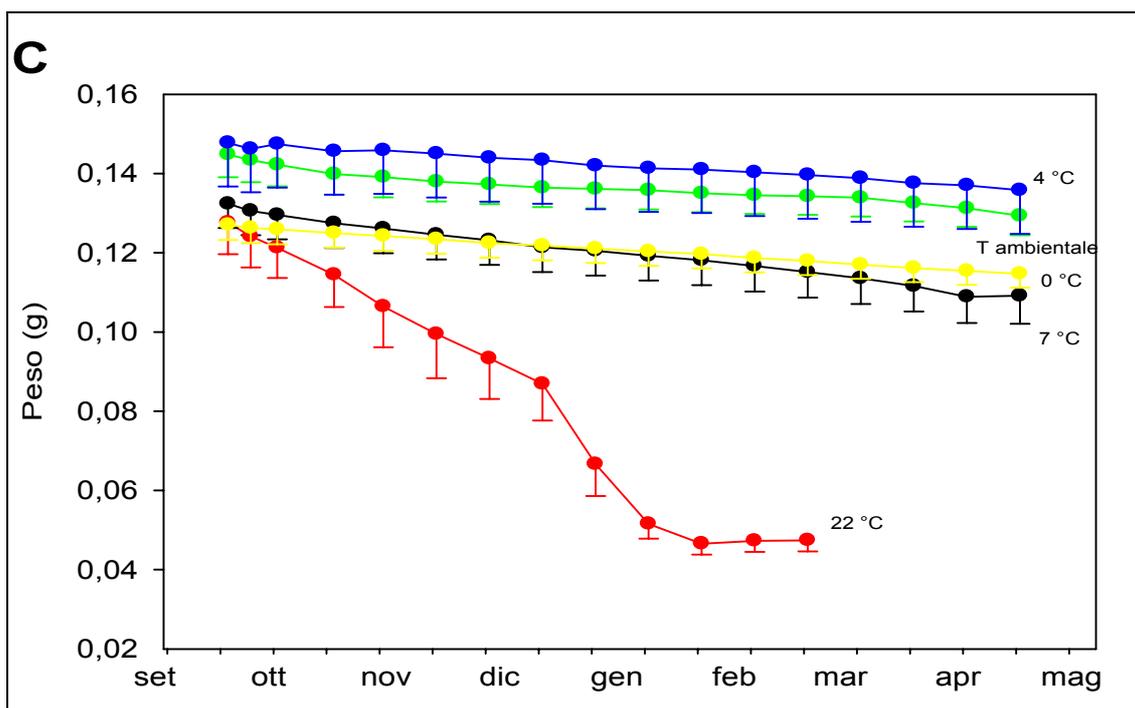


Figura 3.1 Consumo di O₂ (ml/g/hr) (A), produzione di CO₂ (ml/g/hr) (B) e peso (g) (C) (media ± ES) delle femmine svernate a 0, 4, 7, 22 °C e in condizioni naturali.

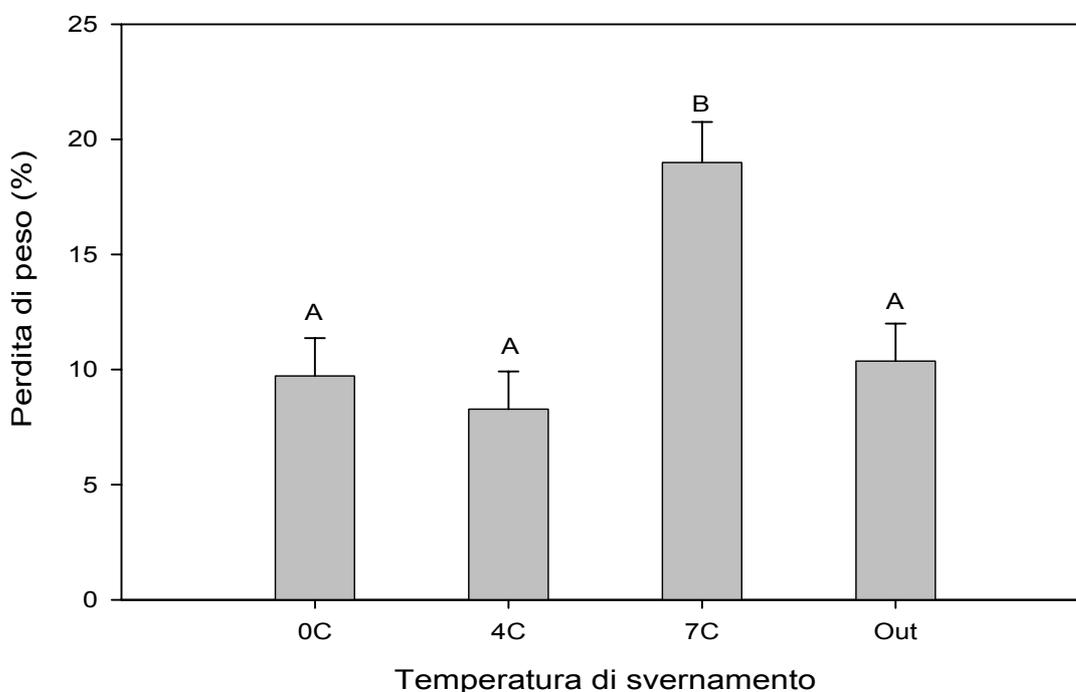


Figura 3.2 Percentuale di perdita di peso (media ± ES) durante lo svernamento delle femmine svernate a 0°, 4°, 7°C e in condizioni naturali (Out). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative (Test di Tukey: $P < 0,05$).

3.3.1.2 Perdita di peso

Le osmie mantenute costantemente a 22 °C perdono rapidamente peso (fig. 3.1C) e muoiono prima di uscire dal bozzolo. Dopo circa 100 giorni dall'inizio delle misurazioni queste femmine avevano perso oltre il 50% del loro peso, con una perdita media giornaliera di 0,6 mg. Negli altri trattamenti la perdita di peso durante lo svernamento è ridotta anche se le femmine svernate a 7 °C perdono significativamente più peso rispetto alle altre ($F_{(3,23)}=8,60$; $P=0,0005$) (fig. 3.2). Sin dall'inizio dello svernamento, gli individui svernati a 7 °C perdono in media 0,18 mg/giorno di peso, contro i 0,06-0,07 mg/giorno degli altri trattamenti.

3.3.2 Esperimento 2: durata dello svernamento

3.3.2.1 Respirimetria

Il giorno dopo lo sviluppo in adulto, il consumo di O₂ e la produzione di CO₂ è di circa 0,25 e 0,20 ml/g/h rispettivamente (fig. 3.3). Durante il PS (dopo 14 giorni) il tasso di respirometria scende attorno a 0,15 ml/g/h (fig. 3.3). Nel momento in cui le femmine di *O. lignaria* vengono messe a svernare a 4 °C il tasso di respirometria comincia a salire e cresce di circa 0,05 ml/g/h ogni mese. Gli individui svernati per 196 giorni, cioè col trattamento di durata che più si avvicina alle condizioni climatiche del Nord dello Utah, al termine dello svernamento presentano un consumo di O₂ di circa 0,45 ml/g/h e una produzione di CO₂ di circa 0,35 ml/g/h. Il giorno dopo il trasferimento a 20 °C (incubazione) il consumo di O₂ diminuisce mentre aumenta la produzione di CO₂.

Per accorciare il periodo di svernamento, abbiamo esposto a 20 °C individui che non avevano ancora raggiunto i livelli di respirometria tipici della fine dello svernamento. Le femmine svernate per solo 28 giorni mostravano un notevole calo nel consumo di O₂ mentre la produzione di CO₂ si manteneva su livelli bassi. Il tasso di respirometria in queste osmie non ha mai superato 0,20 ml/g/h di O₂ consumato e di CO₂ prodotta e quasi tutte sono morte prima di uscire dal bozzolo. Il tasso di respirometria delle osmie svernate per 84 giorni, all'inizio dell'incubazione, aumentava da 0,27 a 0,35 ml/g/h (O₂ consumato) ma poi diminuiva a 0,19 ml/g/h dopo due settimane per poi risalire lentamente nelle misurazioni successive. Le femmine svernate per 140 giorni mostravano, durante l'incubazione, un aumento nella produzione di CO₂ mentre rimaneva simile il consumo di O₂. Allungando la durata dello svernamento a 252 giorni, il giorno dopo il trasferimento a 20 °C il consumo di O₂ passava da 0,55 a 0,42 ml/g/h mentre la produzione di CO₂ scendeva da 0,47 a 0,41 ml/g/h.

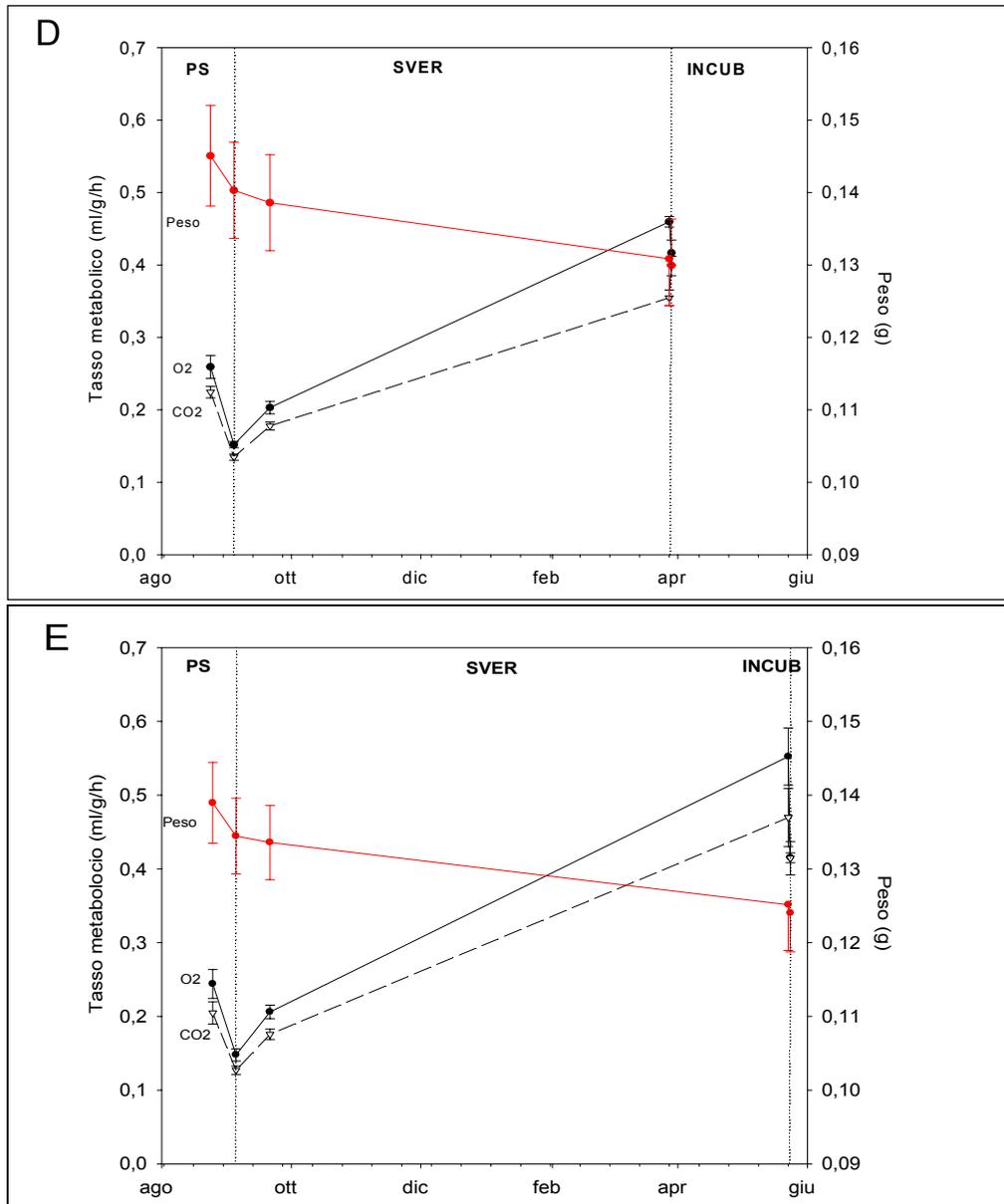


Figura 3.3 Consumo di O₂(ml/g/h), produzione di CO₂ (ml/g/h) e pesi (media ± ES) delle femmine svermate per 28 (A), 84 (B), 140 (C), 196 (D) e 252 (E) giorni.

3.3.2.2 Perdita di peso

La durata dello svernamento ha avuto un effetto significativo sulla perdita di peso totale (dallo sviluppo in adulto all'ultima misurazione di respirometria) ($F_{(4,21)} = 36,29$; $p < 0,0001$) (fig. 3.4). La perdita di peso totale aumenta al diminuire dei giorni di svernamento e di conseguenza all'aumentare dei giorni di incubazione (vedi paragrafo successivo), mentre la perdita di peso prima dell'inizio dell'incubazione è proporzionale ai giorni di svernamento. In totale le femmine svermate per 196 e 252 giorni avevano perso in media circa il 10% del loro peso iniziale da adulto. Nelle femmine svermate per un periodo minore, invece, la perdita

di peso era molto più elevata: gli individui svernati per soli 28 giorni avevano perso oltre il 29% del loro peso iniziale da adulto. Questi individui perdevano gran parte del loro peso durante il periodo di incubazione. Infatti durante lo svernamento le osmie di questo trattamento avevano perso in media 0,05 mg/giorno contro i 0,84 mg/giorno dell'incubazione.

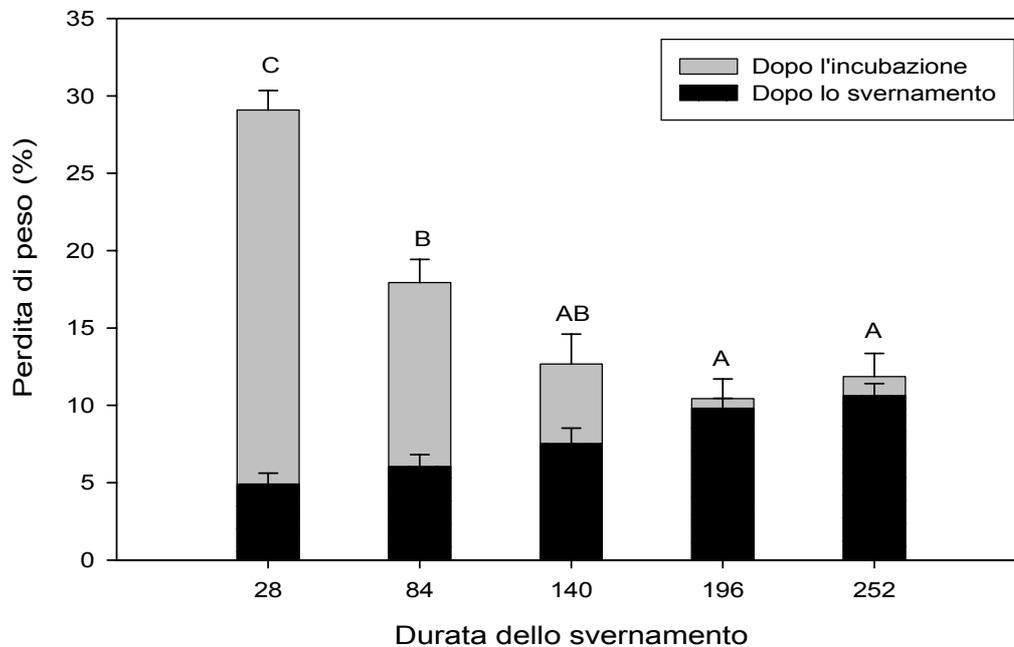


Figura 3.4 Percentuale di perdita di peso (media \pm ES) dopo lo svernamento e dopo l'incubazione (all'ultima misurazione di respirometria prima della fuoriuscita dal bozzolo o per le femmine svernate per 28 giorni, fino a quando erano ancora in vita) in femmine esposte a diverse durate di svernamento. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative (Test di Tukey: $P < 0,05$).

3.3.2.3 Sopravvivenza e durata dell'incubazione

Soltanto una delle femmine svernata per 28 giorni è stata in grado di fuoriuscire dal bozzolo ma è morta entro un giorno. Negli altri trattamenti il tasso di sopravvivenza è stato più elevato: 9 femmine su 10 sono uscite dal bozzolo dopo 196 giorni di svernamento e 7 su 10 negli altri trattamenti. I giorni necessari per uscire a seguito dell'incubazione diminuivano in modo significativo all'aumentare dei giorni di svernamento ($F_{(4,26)} = 102,44$; $p < 0,0001$). In particolare, dopo 28 giorni di svernamento ci sono voluti oltre 100 giorni di incubazione contro 2,86 giorni dopo 252 giorni di svernamento. Sono emerse differenze significative tra i trattamenti ($F_{(4,26)} = 406,65$; $p < 0,0001$) anche se ai giorni di incubazione (necessari per uscire dal bozzolo) si sommano le durate dei corrispettivi trattamenti di svernamento e PS. In questo caso però le femmine svernate per 84 giorni fuoriuscivano dopo circa 150 giorni dallo sviluppo in adulto contro gli oltre 275 giorni delle femmine svernate per 252 giorni (fig. 3.5).

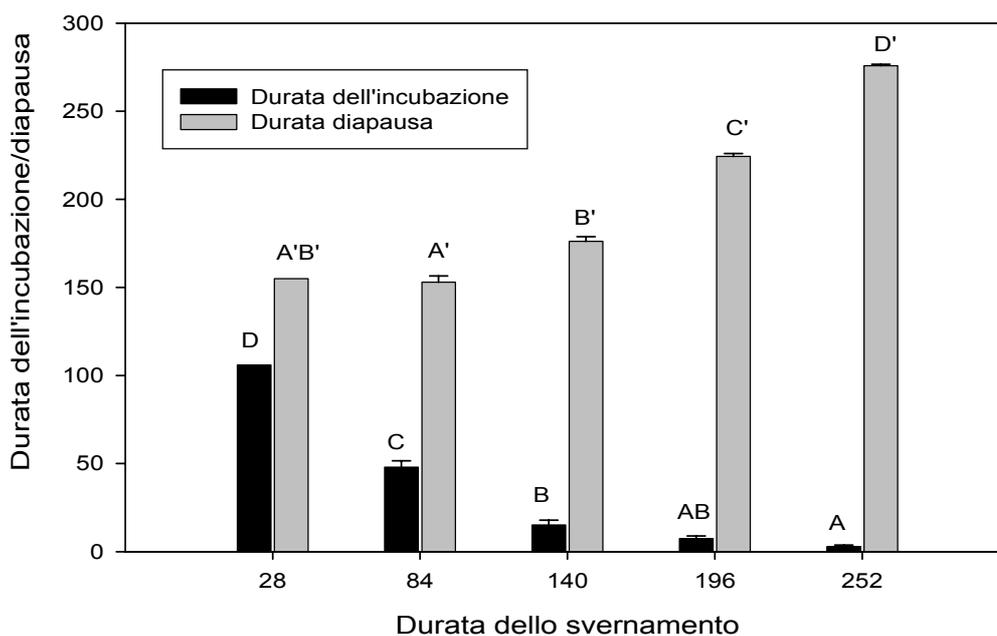


Figura 3.5 Durata (media \pm ES) della fuoriuscita dal bozzolo e durata media della diapausa (dallo sviluppo in adulto all'uscita dal bozzolo) (in giorni) in femmine di *Osmia lignaria* esposte a diverse durate di svernamento. Lettere diverse dello stesso tipo indicano differenze statisticamente significative (Test di Tukey: $P < 0,05$).

3.4 Discussione

3.4.1 Sviluppo della diapausa

In *O. lignaria* il tasso di respirometria passa da circa 0,30 ml/g/h subito dopo lo sviluppo in adulto a circa 0,08 ml/g/h dopo circa 30 giorni di PS e si mantiene a livelli bassi fino a quando le osmie non vengono trasferite a temperature fredde (Kemp et al. 2004; Bosch, Kemp e Sgolastra, non pubblicato; capitolo 2). Durante lo svernamento a 4 °C il tasso di respirometria aumenta di circa 0,1 ml/g/h ogni 8 settimane fino alla fuoriuscita dal bozzolo. Dopo 196 giorni di svernamento a 4 °C, il consumo di O₂ e la produzione di CO₂ raggiungono il valore di circa 0,35 ml/g/h. Questi risultati spiegherebbero come mai se si riduce la durata dello svernamento, cioè si mettono ad incubare le osmie quando il tasso di respirometria è ancora basso, la durata dell'incubazione aumenta (Tasei 1973; van der Steen e de Ruijter 1991; Bosch e Blas 1994; Bosch e Kemp 2003, 2004). In questo studio, le femmine svernate per 84 giorni richiedevano 48 giorni di incubazione a 20 °C contro i soli 3 giorni delle femmine svernate per 252. Inoltre, quando si esponevano le osmie ad un periodo di svernamento sufficientemente lungo, la diapausa procedeva più velocemente a temperature

alte che a temperature basse. Infatti, il tasso di respirometria aumentava più velocemente in osmie svernate a 7 °C che in quelle svernate a 0 °C. Addirittura, alcuni maschi di *O. lignaria* svernati per oltre 150 giorni a 7 °C sono in grado di uscire dal bozzolo senza un periodo di incubazione mentre con 210 giorni di svernamento a 4 °C e a 0 °C occorrono rispettivamente uno e tre giorni di incubazione a 20 °C (Bosch e Kemp 2003). Risultati simili sono stati ottenuti anche in *O. cornuta* (Bosch e Kemp 2004).

Le osmie entrano in diapausa entro pochi giorni dalla metamorfosi in adulto e il suo sviluppo è influenzato fin da subito dalle variazioni di temperatura. Infatti, le osmie presvernate per soli 5 giorni non raggiungono mai i bassi tassi di respirometria degli individui presvernati per almeno 30 giorni e, durante tutto lo sviluppo della diapausa, mantengono sempre un tasso di respirometria più elevato (capitolo 2). E' stato dimostrato che, sia in *O. lignaria* che in *O. cornuta*, la fuoriuscita dal bozzolo di individui non esposti (mantenuti costantemente alle condizioni termiche del PS) o esposti per un breve periodo (<30 giorni) alle temperature fredde è estremamente rara (Bosch e Kemp 2003, 2004). Questi individui reagiscono alle alte temperature abbassando il tasso di respirometria ma ad un costo metabolico proibitivo.

I nostri risultati dimostrano che la temperatura assume un ruolo importante nel regolare la diapausa invernale in *O. lignaria*. Kemp et al. (2004) hanno dimostrato che *O. lignaria* presenta una diapausa estiva allo stato di prepupa che deriverebbe molto probabilmente dalla diapausa prepupale invernale presente in molti Megachilidi (Bosch et al. 2001; Kemp et al. 2004). Infatti, il tasso di respirometria durante la diapausa prepupale di *O. lignaria* presenta un andamento ad U simile alla diapausa invernale di *Megachile rotundata* che sverna come prepupa. Contrariamente alla diapausa da adulto nelle osmie, durante la diapausa prepupale di *M. rotundata*, il tasso di respirometria si mantiene basso durante tutto l'autunno e l'inverno (circa 0,1-0,2 ml/g/h), e soltanto in primavera, quando la prepupa viene messa ad incubare, il tasso di respirometria inizia a salire (Kemp et al. 2004). Inoltre in *M. rotundata* non è richiesto un periodo di temperature fredde durante l'inverno per terminare la diapausa, anche se le basse temperature fanno diminuire il periodo di incubazione necessario per uscire dal bozzolo (Johansen e Eves 1973). Queste differenze in risposta alla temperatura rivelano delle profonde differenze fisiologiche tra la diapausa invernale da adulto di *Osmia* e la diapausa invernale da prepupa di *Megachile*.

Secondo Danks (1987) i fattori ambientali (fotoperiodo, temperatura, umidità, cibo, ecc.) possono influenzare lo sviluppo della diapausa in due modi: (1) favorendo il

mantenimento della diapausa o (2) permettendone il suo sviluppo. Nel primo caso (1) la temperatura può assumere il ruolo di far mantenere l'insetto in diapausa. Durante la diapausa, la sensibilità a questo fattore può decrescere gradualmente o improvvisamente e può terminare attraverso uno stimolo preciso o anche in sua assenza (Tauber et al. 1984). In molti insetti che terminano la diapausa a fine autunno o all'inizio dell'inverno, quando le temperature sono al di sotto della soglia di sviluppo, è molto comune una fase di quiescenza post-diapausa (Tauber et al. 1984). In questo caso l'insetto è in grado di rispondere rapidamente al sopraggiungere delle condizioni favorevoli per lo sviluppo o per riprodursi. In *O. lignaria*, invece, i nostri risultati suggeriscono che non è possibile fare una distinzione chiara tra diapausa e post-diapausa.

Nel secondo caso (2), Hodek (1983) distingue i processi della diapausa che evolvono ad un tasso standard (*processi orotelici*) da quelli che evolvono rapidamente (*processi tachitelici*). Il completamento orotelico della diapausa può essere usato per spiegare lo sviluppo della diapausa mentre il completamento tachitelico viene usato per indicare la fase di attivazione. La diapausa può essere completata sia dai processi orotelici che tachitelici. Se l'attivazione avviene precocemente nel corso della diapausa, quando i processi orotelici non sono ancora avanzati, i processi tachitelici impiegano più tempo per completare la diapausa rispetto a quando i processi orotelici sono avanzati o quasi completati. Nel caso delle osmie il periodo di svernamento potrebbe rappresentare il processo orotelico, mentre l'incubazione potrebbe rappresentare la fase di attivazione. La diapausa procede più velocemente ad alte temperature invernali (7 °C) rispetto alle basse (0 °C). Inoltre la durata dell'incubazione (fase di attivazione) diminuisce con l'aumentare della durata dello svernamento (fase di sviluppo della diapausa) (Bosch e Blas 1994; Bosch e Kemp 2003, 2004). Tuttavia in natura l'aumento delle temperature dall'inverno alla primavera segue un andamento graduale e pertanto non è facile definire un confine netto tra la fine dei processi orotelici e l'inizio di quelli tachitelici. Lo sviluppo della diapausa nelle osmie rispecchia il modello proposto da Sawyer et al. (1993). Secondo questi autori, durante lo sviluppo della diapausa la risposta alla temperatura cambia gradualmente al procedere della diapausa stessa. Si presume che la diapausa passi attraverso una serie discreta di *k* substadi o classi di maturità, ognuno dei quali presenta un proprio tasso di sviluppo temperatura-dipendente. Nelle osmie, nessuno stimolo è richiesto per l'induzione della diapausa e, subito dopo lo sviluppo in adulto, il tasso di respirometria si mantiene ad un livello minimo (PS) finché non vengono esposte a temperature più fredde (svernamento). Durante lo svernamento il tasso di respirometria cresce regolarmente a seconda della

temperatura ma, nelle femmine svernate a 7 °C, l'aumento è maggiore, soprattutto nella seconda parte dello svernamento. A mano a mano che la diapausa procede, la sua soglia di sviluppo si sposta da una temperatura più bassa ad una più alta. Allungando il periodo di svernamento la durata complessiva della diapausa aumenta. Infatti in autunno le alte temperature (PS) fanno intensificare la diapausa mentre le basse la fanno avanzare (svernamento). In primavera le alte temperature (incubazione) fanno terminare la diapausa e assicurano una rapida fuoriuscita dal bozzolo delle osmie mentre le basse temperature la inibiscono (svernamento). In questo modo viene evitata un'innaturale terminazione della diapausa in autunno quando si susseguono vari giorni di temperature miti, mentre le basse temperature dell'inverno consentono di sincronizzare il ciclo biologico tra gli individui della stessa popolazione con le fioriture primaverili.

3.4.2 *Metabolismo e sopravvivenza*

Oltre che sullo sviluppo della diapausa, le temperature e la durata di svernamento hanno un notevole effetto sul metabolismo (perdita di peso e consumo di riserve energetiche) e sul tasso di sopravvivenza e la fitness di *O. lignaria*. Femmine non esposte a temperature invernali mantengono un livello basso di respirometria, mostrano un'elevata perdita di peso, consumano tutte le loro riserve energetiche (in particolare lipidi dei corpi grassi) e non sono in grado di fuoriuscire dal bozzolo (Bosch, Kemp e Sgolastra, non pubblicato; capitolo 2; questo studio). Sia in *O. lignaria* che in *O. cornuta* la perdita di peso è molto più rapida durante le alte temperature del PS (0,2-0,4 mg/giorno) e dell'incubazione (0,8-2,0 mg/giorno) che durante lo svernamento (0,05-0,09 mg/giorno) (Bosch e Kemp 2003, 2004; Kemp et al. 2004; capitolo 2). I nostri risultati dimostrano che nella diapausa invernale di *O. lignaria* il costo per mantenere basso il tasso di respirometria alle alte temperature è molto elevato (Bosch, Kemp e Sgolastra, non pubblicato; capitolo 2). Infatti, molti insetti rispondono ai periodi di stress abbassando il loro tasso metabolico ma ciò sembra essere accompagnato da un costo in termini di fitness (Parsons 1993, 1996; Chown e Gaston 1999). In *M. rotundata*, invece, il peso durante il PS e lo svernamento rimane molto stabile e questa specie appare essere molto più tollerante di *O. lignaria* ai lunghi e caldi periodi invernali (Richards et al. 1987; Kemp e Bosch 2001; Kemp et al. 2004). Anche in osmia la perdita di peso durante la diapausa estiva allo stadio di prepupa è minima (Bosch e Vicens 2002; Kemp et al. 2004). In *Bombus terrestris*, che come le osmie sverna da adulto, è stato dimostrato che le diverse temperature di svernamento non hanno nessuna influenza sulla sopravvivenza mentre ha

invece un effetto importante la durata della diapausa (Beekman et al. 1998). Nei bombi sembra non esistere una durata minima di svernamento e il tasso di sopravvivenza diminuisce con l'aumentare della durata della diapausa (Beekman et al. 1998). Tuttavia come in *Osmia*, la durata della pre-ovideposizione (che può essere paragonata alla durata dell'incubazione per le osmie) è influenzata sia dalla temperatura che dalla durata dello svernamento: il periodo di pre-ovideposizione decresce con il diminuire delle temperature e con l'aumentare della durata dello svernamento (Beekman et al. 1998).

Nelle popolazioni di *O. lignaria* del nord dello Utah, almeno 90 giorni di svernamento sono necessari per avere una buona percentuale di sopravvivenza, tuttavia per una rapida e sincronizzata fuoriuscita dal bozzolo dopo l'incubazione e un'elevata longevità occorrono da 150 a 200 giorni di svernamento (Bosch e Kemp 2003). In questo studio nelle femmine svernate per meno di 196 giorni la perdita di peso totale aumenta con il diminuire della durata dello svernamento. Comunque, uno svernamento troppo lungo (oltre 200 giorni a 4 °C) o a temperature relativamente troppo elevate (oltre 150 giorni a 7 °C) ha effetti negativi sulla sopravvivenza e la longevità (Bosch e Kemp 2003, 2004). Le femmine svernate a 7 °C mostrano un tasso metabolico e una perdita di peso più elevata rispetto a quelle svernate a temperature inferiori. Questi risultati coincidono con quelli di Irwin e Lee (2000) in *Eurosta solidaginis* (Fitch) e di Jean et al. (1990) in *Coleomegilla maculata lengi* Timberlake in cui la sopravvivenza e la vigoria diminuiscono negli individui svernati a temperature miti. In molti insetti, le fredde temperature sono importanti per conservare le riserve metaboliche e quindi per mantenere alta la vigoria e bassa la mortalità (Hodek 1983; Hodek e Hodková 1988)

In conclusione possiamo affermare che le condizioni termiche durante lo svernamento sono estremamente importanti per ottenere popolazioni vitali e pronte ad attivarsi in primavera. Per popolazioni di *O. lignaria* del nord dello Utah una durata dello svernamento da 150 a 210 giorni a 0 °C o 4 °C è sufficiente per garantire una buona sopravvivenza e una rapida fuoriuscita dai bozzoli dopo l'incubazione. Le femmine svernate a questi regimi sono anche quelle che mostrano un tasso di respirometria più simile a quelle svernate in condizioni naturali. Inoltre, le diverse popolazioni di *Osmia* sembrano essere adattate alle condizioni invernali locali. Sia in *O. lignaria* che in altre specie di osmie è stato dimostrato che popolazioni di basse latitudini, che volano in febbraio-marzo, richiedono meno giorni di svernamento per essere pronte ad uscire dai bozzoli in primavera, di popolazioni di alte latitudini che volano ad aprile (Tasei 1973; Bosch e Blas 1994; Bosch e Kemp 2000; capitolo 4).

Capitolo 4

Effetti della durata del pre-svernamento sulla fitness in di femmine *Osmia lignaria*

4.1 Introduzione

Negli insetti la sincronizzazione del ciclo biologico con le variazioni delle condizioni ambientali rappresenta un aspetto fondamentale per la loro sopravvivenza e, molte specie hanno evoluto diverse strategie per arrivare al periodo critico dell'anno nel momento giusto (Dingle 1986). La diapausa è uno stato geneticamente determinato di bassa attività metabolica che permette agli insetti di sopravvivere alle condizioni ambientali estreme e di sincronizzare il loro ciclo biologico con i cambiamenti stagionali. Tuttavia sia il momento dell'entrata in diapausa che le condizioni stesse della diapausa comportano un costo in termini di riserve energetiche. Le riserve metaboliche accumulate nei corpi grassi prima dell'inizio della diapausa invernale sono usate per il mantenimento della diapausa e la sopravvivenza durante lo svernamento (Tauber et al. 1986; Danks 1987; Leather et al. 1993). In molti casi però la diapausa può avere un effetto non solo sulla sopravvivenza durante lo svernamento ma anche sulla susseguente fitness. Ad esempio, larve del Dittero *Eurosta solidaginis* svernate artificialmente ad alte temperature (12 °C) mostravano una forte perdita di peso, una ridotta sopravvivenza e un basso potenziale riproduttivo (Irwin e Lee 2000). Nell'Imenottero parassitoide *Asobara tabida*, l'aumento della lunghezza della diapausa non solo produceva una più alta mortalità ma causava un calo nella produzione di uova, nelle riserve di grassi e nel peso degli adulti sfarfallanti (Eilers e van Alphen 2002). Risultati simili sono stati osservati anche nell'acaro *Tetranychus urticae* (Kroon e Veenendaal 1998). Musolin e Numata (2003) hanno dimostrato che le femmine di *Nezara viridula* (Heteroptera: Pentatomidae) che diventavano adulte ed entravano in diapausa in ottobre vivevano più a lungo e producevano più uova delle femmine che diventavano adulte ed entravano in diapausa in settembre. Nelle larve di *Choristoneura fumiferana* che entravano precocemente in

diapausa ed erano esposte per lungo tempo alle temperature alte prima dell'arrivo dell'inverno presentavano un elevato consumo di riserve energetiche e molte di loro morivano durante lo svernamento (Han e Bauce 1998). Anche in varie specie di *Drosophila* è stato dimostrato che la capacità di svernamento variava con il periodo di sfarfallamento prima dell'arrivo delle temperature invernali (Ohtsu et al. 1995). Tutti questi risultati suggeriscono che le condizioni di sviluppo della diapausa possono influenzare la fitness durante la fase post-diapausa. Questo trade-off diventa specialmente rilevante nella situazione attuale di grossi cambiamenti climatici legati al fenomeno del "global warming" (Houghton et al. 2001). Alcuni studi hanno riportato delle variazioni negli eventi fenologici in diverse specie di insetti dovuti all'aumento delle temperature (Miles et al. 1997; Kuchlein e Ellis 1997; Roy e Sparks 2000; Visser et al. 2001). Studi precedenti hanno dimostrato che la sincronizzazione fra la diapausa invernale e l'abbassamento delle temperature in autunno-inverno ha un effetto sulla sopravvivenza invernale nell'ape solitaria *Osmia lignaria* (Bosch, Kemp e Sgolastra, non pubblicato; capitolo 1). In questa specie, lo sviluppo pre-immaginale avviene in primavera-estate e dopo la metamorfosi in adulto l'insetto non esce dal bozzolo ma entra in diapausa. Entro 5 giorni dalla muta in adulto le osmie entrano in diapausa senza l'intervento di stimoli ambientali (Bosch, Kemp e Sgolastra, non pubblicato; capitolo 1). L'adulto in diapausa sverna all'interno del bozzolo fino alla primavera successiva. Il periodo che intercorre dalla muta in adulto (fine estate-inizio autunno) all'abbassamento delle temperature invernali è definito pre-svernamento (PS). Nelle osmie, dato che il periodo di sviluppo in adulto si può protrarre per oltre un mese, è possibile trovare nella stessa popolazione individui che hanno avuto un rapido sviluppo e quindi sono esposti ad un lungo PS (individui precoci) ed individui che si sono sviluppati più lentamente e che subiscono un breve PS (individui tardivi) (Bosch, Kemp e Sgolastra, non pubblicato). Inoltre l'arrivo delle basse temperature in autunno può variare fortemente tra gli anni, pertanto, la durata del PS può cambiare di anno in anno (Bosch, Kemp e Sgolastra, non pubblicato; capitolo 1). Infatti, gli individui svernati come pupe o prepupe muoiono, o diventano adulti non vitali nell'anno successivo (Bosch 1994; Bosch e Kemp 2000; Bosch et al. 2006). Tuttavia anche l'esposizione per un lungo periodo alle temperature alte di fine estate-inizio autunno ha un effetto negativo su questi insetti. Studi precedenti condotti sia su *O. lignaria* che sulla specie europea *O. cornuta* hanno dimostrato che individui esposti ad un lungo PS (60 giorni) hanno una minore probabilità di sopravvivere all'inverno, mostrano un'elevata perdita di peso, un forte consumo dei corpi grassi e delle riserve lipidiche e proteiche, oltre a una ridotta longevità in laboratorio dopo la fuoriuscita dal bozzolo

(Monzón 1998; Bosch e Kemp 2004; capitolo 1; Bosch, Kemp e Sgolastra, non pubblicato). Rimane da vedere se questa perdita di vigore si ripercuote negativamente sulla performance post-diapausa dell'adulto.

L'obiettivo di questo studio è valutare se la durata del PS ha un effetto non solo sulla sopravvivenza invernale (capitolo 1) ma anche sulla longevità, la fecondità ed altri fattori coinvolti nel successo riproduttivo delle femmine di *O. lignaria*. Negli insetti, lo sviluppo degli ovari è un processo limitato dalla disponibilità dei nutrienti (proteine, lipidi, vitamine e minerali), pertanto ogni fattore che ne influenza l'acquisizione si ripercuote sulla produzione di uova (Wheeler 1996). In particolare, è stato dimostrato il ruolo delle proteine e dei lipidi accumulate nei corpi grassi durante la vitellogenesi (Gilmour 1965; Wigglesworth 1972; Chapman 1998). Quindi, una diminuzione importante delle riserve di nutrienti, durante il PS, potrebbe far diminuire la fecondità fenotipica, come trovato in altri insetti (Irwin e Lee 2000; Eilers e van Alphen 2002; Musolin e Numata 2003). Lo stesso consumo dei corpi grassi durante il PS potrebbe avere un effetto negativo sul tasso di maturazione degli ovari delle femmine dopo la fuoriuscita dal bozzolo. Questo rallentamento farebbe aumentare la durata della pre-nidificazione e quindi ritardare l'inizio della nidificazione. Ciò farebbe diminuire la durata della nidificazione che è altamente correlata con la fecondità in *O. cornuta* (Bosch e Vicens 2006). Infine, le femmine che hanno "subito" un lungo PS, essendo più deboli, potrebbero essere meno efficienti nella raccolta del polline e del nettare e quindi avere un basso tasso di approvvigionamento. In questo caso, verrebbero prodotte provvigioni più piccole e/o la sex ratio della progenie potrebbe essere spostata maggiormente verso il sesso maschile, che è di taglia minore. Questo fenomeno si riscontra in *Osmia* verso la fine del periodo della nidificazione quando, le femmine, man mano che invecchiano, riducono il tasso di approvvigionamento (Tepedino e Torchio 1982; Frohlich e Tepedino 1986; Sugiura e Maeta 1989; Bosch e Vicens 2005). Dato che il peso corporeo è altamente correlato col peso della provvigione (Bosch e Vicens 2002; questo studio) e che gli individui piccoli hanno una minore probabilità di sopravvivere durante lo sviluppo e l'inverno (Tepedino e Torchio 1982; Bosch e Kemp 2004; Bosch e Vicens 2006), le femmine con molti giorni di PS vedrebbero ancora più ridotta la loro fitness.

4.2 Materiali e metodi

4.2.1 *Osmia lignaria*

Osmia lignaria è un Apoideo solitario del nord America. E' una specie monovoltina che nidifica all'interno di siti pre-costituiti come nidi abbandonati di altri Imenotteri o fori su legno praticati da insetti xilofagi. Gli adulti in diapausa svernano all'interno del bozzolo fino all'anno successivo. In primavera, quando le temperature aumentano, prima i maschi e poi le femmine fuoriescono dai bozzoli e dai nidi. Dopo qualche giorno, le femmine accoppiate vanno alla ricerca di una cavità idonea per nidificare (Bosch e Kemp 2001). Il sito di nidificazione prescelto viene marcato individualmente dalla femmina (Guedot et al. 2006) che inizia la costruzione del primo setto di fango. I nidi sono costituiti da una serie lineare di celle pedotrofiche divise da setti di fango, ogni cella è approvvigionata con una massa (o provvigione) di polline e nettare su cui viene deposto un uovo. Le celle più interne e più grandi sono occupate dalla progenie di sesso femminile (uova diploidi) mentre quelle più esterne dalla progenie di sesso maschile (uova aploidi). Quando il nido è stato tappato con l'ultimo setto di fango, la femmina va alla ricerca di altre cavità idonee per nidificare. L'attività di nidificazione dura circa 3 settimane durante le quali una femmina può arrivare a deporre fino a 20 uova, con una media di un uovo al giorno (Torchio 1989; Bosch e Kemp 2001).

4.2.2 Popolazione e metodi di allevamento

La popolazione di *O. lignaria* utilizzata in questo studio deriva da una rilasciata in un frutteto di ciliegio a North Ogden (Utah, USA) ad inizio aprile 2004. Blocchi di legno preforati con cannuce di carta (15 cm di lunghezza e 7,5 mm di diametro) inserite all'interno di fori, sono stati usati come materiale di nidificazione (Torchio 1982). Al termine del periodo di nidificazione (inizio maggio 2004) i nidi sono stati trasferiti presso il Bee Biology & Systematics Laboratory, Logan, Utah e posti in un incubatore che simulava le temperature mensili di Logan (tab. 4.1) fino ad aprile 2005. Le temperature diurne mensili sono state ottenute calcolando la media fra la temperatura massima e la temperatura media mensile. Le temperature notturne mensili sono state ottenute calcolando la media fra la temperatura minima e la temperatura media mensile.

Ogni 3 giorni, dal 15 luglio 2004, periodo previsto di inizio pupazione (Bosch e Kemp 2000), i nidi sono stati radiografati (Stephen e Undurraga 1976) ed è stato monitorato lo sviluppo in adulto di *O. lignaria* su 494 femmine. Di queste sono state selezionate 82

femmine con diverse date di arrivo in adulto. Dato che il periodo di sviluppo in adulto nella popolazione è durato circa un mese (fig. 4.1) e l'inizio dello svernamento è stato fatto coincidere con il 1° ottobre 2004 (nel momento in cui si sono abbassate le temperature), la durata del PS delle femmine selezionate andava da un minimo di 21 giorni ad un massimo di 70 giorni in base alla data di sviluppo in adulto. Per evitare un possibile effetto della taglia corporea sul successo riproduttivo (Bosch e Vicens 2006), tutte le femmine scelte erano di taglia simile.

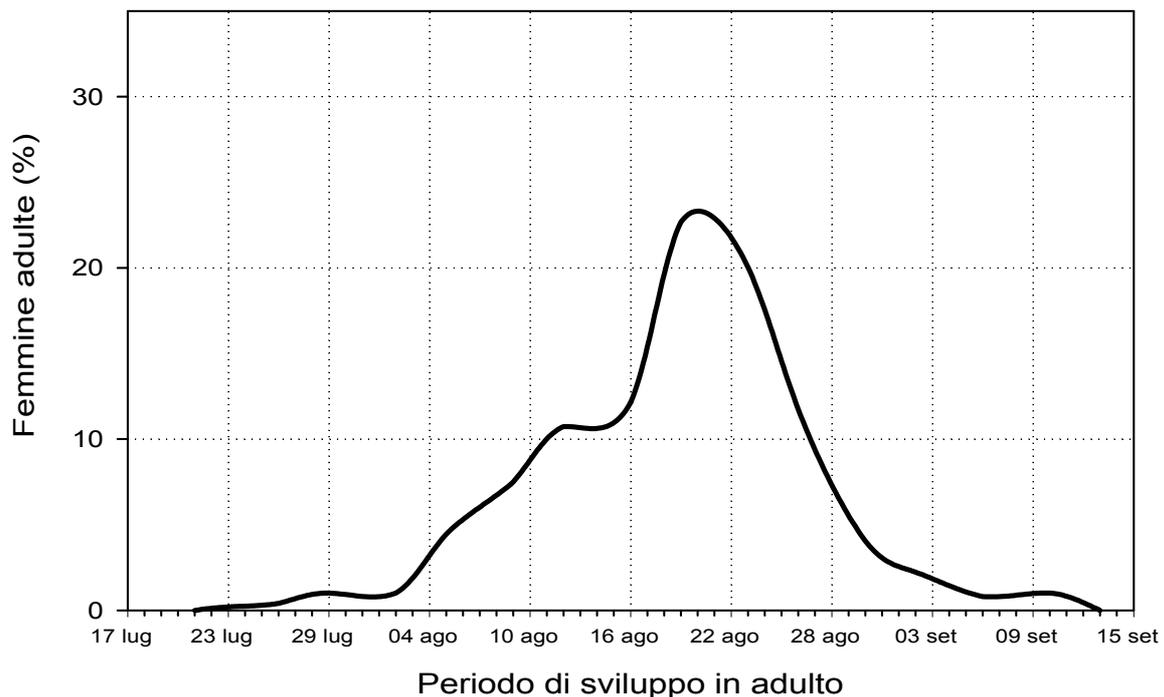


Figura 4.1 Curva giornaliera di sviluppo in adulto di femmine di *Osmia lignaria* del nord dello Utah nel 2004 (n = 494).

4.2.3 Sito e materiali di nidificazione

Lo studio è stato condotto nella primavera 2005 all'interno di una serra (fig. 4.2). La serra (dimensioni della base: 8,7 x 9,8 x 2,4 m; apice del tetto triangolare = 4,5 m) era coltivata con *Phacelia tanacetifolia* Bentham (Hydrophyllaceae), che garantisce una buona risorsa di polline e nettare per *O. lignaria* (Williams e Christian 1991; Carreck e Williams 1997). Come materiale di nidificazione sono stati usati sei blocchi di legno, come quelli già descritti, e posizionati nella serra con i fori (294 in totale) orientati verso sud-est. Per facilitare le osservazioni, le cavità di nidificazione sono state numerate con gessetti a cera bianchi. Ogni blocco era fissato ad un palo di sostegno in metallo a circa 1,2 m dal suolo.



Figura 4.2 Serra utilizzata per la sperimentazione. In alto due femmine di *Osmia lignaria* marcate.

4.2.4 Nidificazione

Il 17 aprile 2005 le femmine selezionate e circa 200 maschi sono stati messi ad incubare a 26 °C fino alla fuoriuscita dal bozzolo. Subito dopo la fuoriuscita dal bozzolo, le femmine sono state anestetizzate al freddo (4 °C) per 15 minuti e marcate individualmente con colori a smalto. I maschi e le femmine marcate, e quindi riconoscibili individualmente, sono stati rilasciati nella serra man mano che fuoriuscivano dal bozzolo in modo da avere circa 30 femmine nidificanti. I blocchi di legno sono stati osservati più volte durante i giorni di nidificazione per registrare le date in cui è stato completato ogni nido e la femmina che lo aveva approvvigionato. Inoltre, ogni sera dopo il tramonto, per tutta la durata della prova, sono state ispezionate le cavità di nidificazione con una torcia elettrica ed è stato contato il numero di femmine presenti nelle loro cavità (Bosch e Kemp 2001). Al fine di stimare l'attività di nidificazione, cioè di stabilire il numero di celle prodotte al giorno per femmina (tasso di produzione giornaliero di celle), le canucce di carta occupate sono state estratte con un paio di pinzette e il punto raggiunto dalla femmina nella costruzione del suo nido, visibile in trasparenza sulla cannuccia, è stato contrassegnato con la data del rispettivo giorno.

Tabella 4.1 Termoperiodi mensili di 12 ore impostati per simulare le temperature di Logan (UT, USA). In modo da simulare un caldo pre-svernamento, a settembre sono state mantenute le stesse temperature di agosto. Le temperature corrispondenti a settembre sono in parentesi.

Mese	Termoperiodo ° C
Gennaio	-1:6
Febbraio	0: 2
Marzo	8: 0
Aprile	13: 0
Maggio	18: 11
Giugno	21: 15
Luglio	24: 18
Agosto	22: 15
Settembre	22 (18): 15 (9)
Ottobre	8:2
Novembre	1:-3
Dicembre	-3:-7

4.2.5 Analisi dei nidi

Il 28 maggio 2005, al termine dell'attività di nidificazione di tutte le femmine, i nidi sono stati ritirati dalla serra e radiografati. In base alle osservazioni notturne è stato possibile datare ogni cella e sapere quale femmina l'aveva approvvigionata e vi aveva ovideposto. La progenie nei nidi è stata fatta sviluppare in condizioni naturali in una centralina posizionata di fronte al laboratorio. A metà luglio i nidi sono stati aperti. Le provvigioni non terminate dalle femmine nidificanti o rimaste nei nidi a causa della mortalità delle uova o delle larve giovani, sono state disidratate per 24 ore a 110 °C e poi pesate (peso secco). I bozzoli con la progenie sono stati messi ognuno in capsule di gelatina individualmente marcate. Ogni individuo (dentro il bozzolo) è stato pesato nel giorno di sviluppo in adulto. La popolazione è stata lasciata svernare in condizioni naturali all'interno di una scatola di plastica e la temperatura al suo interno è stata registrata ogni ora. La primavera successiva (aprile 2006) è stata registrata la data di fuoriuscita dal bozzolo di ogni individuo e i bozzoli vuoti sono stati pesati per risalire al peso originario dell'adulto. La mortalità dopo lo svernamento è stata valutata aprendo i bozzoli delle osmie che non vi erano fuoriuscite naturalmente. Per valutare la sex ratio primaria nel caso di uova o larve morte, il sesso veniva stabilito in base alla taglia e alla posizione della cella nel nido, in genere le uova femminili sono deposte nelle provvigioni più grandi e nelle celle posizionate in fondo ai nidi (Torchio 1989).

Per calcolare l'investimento parentale (vedi paragrafo successivo) si è stabilito la relazione tra il peso della provvigione e il peso dell'adulto. Da altri nidi di *O. lignaria*, sono

state prelevate 34 provvigioni con le uova (scelte in modo da avere lo stesso numero di maschi e di femmine) e subito pesate (peso fresco). Successivamente le provvigioni sono state disidratate per 24 ore a 110 °C e ripeseate per ottenere il peso secco. I contenuti (provvigioni e uova) di altre 20 celle maschili e 20 femminili sono stati posti individualmente in blocchi di argilla (Torchio e Bosch 1992) e mantenuti a 22 °C. A fine estate, quando gli individui sono diventati adulti sono stati pesati all'interno dei bozzoli.

4.2.6 Analisi statistica

Per analizzare le relazioni tra i pesi della provvigione fresca e secca, e tra pesi della provvigione fresca e l'adulto, sono state effettuate delle regressioni lineari semplici. Questo ci ha permesso di stimare il peso della provvigione fresca (per calcolare l'investimento parentale) dal peso dell'adulto nel bozzolo e dal peso della provvigione secca rimasta nel nido.

Per ogni femmina nidificante sono stati rilevati i seguenti dati: 1. durata del periodo di incubazione (giorni necessari per uscire dal bozzolo dal termine dello svernamento); 2. durata del periodo di pre-nidificazione (giorni trascorsi dalla fuoriuscita dal bozzolo all'inizio della nidificazione); 3. durata dell'attività di nidificazione (dal giorno della prima cella approvvigionata all'ultima); 4. fecondità (numero di uova deposte); 5. investimento parentale (peso fresco di polline e nettare accumulato dalle femmine per approvvigionare le celle); 6. tasso di approvvigionamento (peso di tutte le celle costruite/periodo di nidificazione). Dato che l'usurpazione di nidi è un fenomeno comune in *O. lignaria* (Tepedino e Torchio 1994), le celle completate da più di una femmina o quelle non completate venivano considerate a metà; 7. sex ratio primaria della progenie ($\frac{\text{♂♂}}{\text{♂♂}+\text{♀♀}}$); 8. mortalità della progenie (durante lo sviluppo e lo svernamento); 9. peso medio della progenie maschile e femminile. Le percentuali di mortalità e la sex ratio sono state trasformate in $\arcsen\sqrt{x}$.

Dato che alcune delle femmine lanciate in serra non hanno nidificato, è stato valutato il possibile effetto della durata del PS e dell'incubazione sull'insediamento con una regressione logistica multipla. La relazione fra il periodo di incubazione, il periodo di pre-nidificazione ed il periodo di nidificazione con la durata del PS è stata analizzata con delle regressioni semplici. La fecondità, l'investimento parentale, il tasso di approvvigionamento, la sex ratio, la mortalità e la taglia della progenie sono state analizzate con delle regressioni multiple usando la durata del PS e la durata della nidificazione come variabili indipendenti.

4.3 Risultati

4.3.1 Relazione tra il peso della provvigione e il peso dell'adulto

Il peso delle provvigioni fresche era altamente correlato sia col peso delle provvigioni secche (fig. 4.3) che col peso dell'adulto nel bozzolo (fig. 4.4). Dai pesi secchi delle provvigioni rimaste nei nidi si è risaliti ai pesi freschi della provvigione con la seguente equazione di regressione: peso fresco della provvigione = $0,0051 + 1,3269 * \text{peso secco della provvigione}$. Dai pesi degli adulti nel bozzolo è stato possibile risalire al peso originario della provvigione fresca utilizzando le seguenti equazioni di regressione: peso fresco della provvigione = $0,0536 + 2,5522 * \text{peso dell'adulto} (\text{♂♂})$; peso fresco della provvigione = $0,0580 + 2,2187 * \text{peso dell'adulto} (\text{♀♀})$.

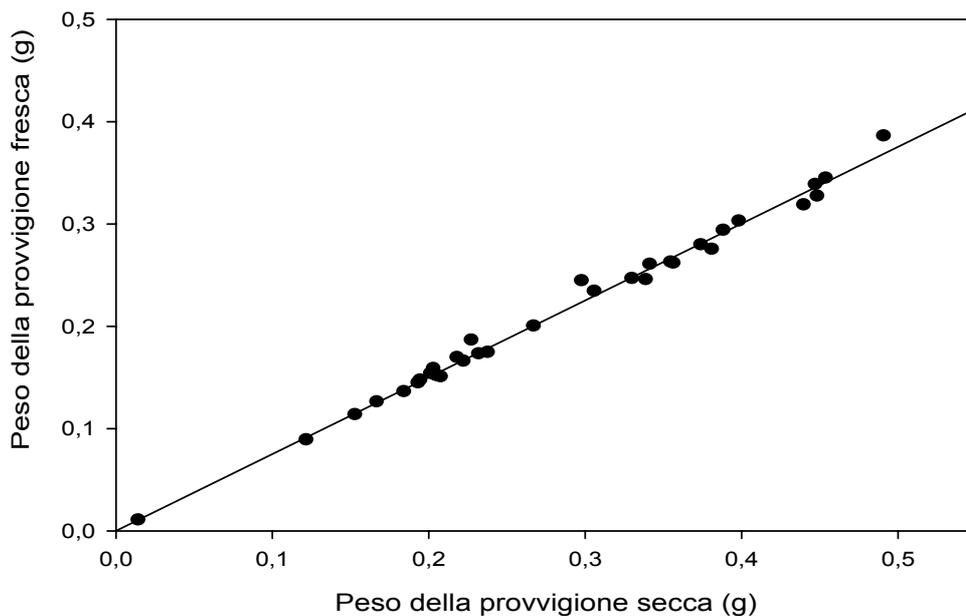


Figura 4.3 Relazione tra peso secco e peso fresco della provvigione in *Osmia lignaria* ($R = 0,996$, $P < 0,0001$, $N = 34$).

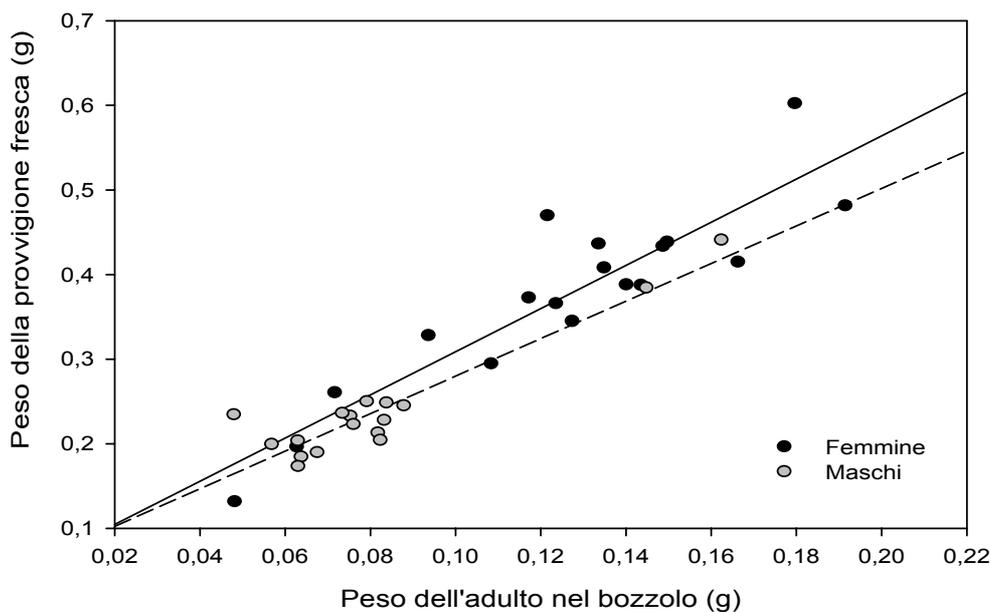


Figura 4.4 Relazione tra peso fresco della provvigione e peso dell'adulto in maschi e femmine di *Osmia lignaria* (Maschi: $R = 0,934$, $P < 0,0001$, $N = 17$; Femmine: $R = 0,902$, $P < 0,0001$, $N = 18$).

4.3.2 Periodo di incubazione e insediamento

In totale nella serra si sono insediate e quindi hanno nidificato 26 femmine su un totale di 72 femmine rilasciate. La durata del PS non avuto nessun effetto sulla probabilità di insediamento ($F_{(1,69)} = 1,42$; $P = 0,24$). Invece, la durata dell'incubazione ha avuto un effetto significativo sulla probabilità di nidificazione ($F_{(1,69)} = 52,58$; $P < 0,001$). Infatti, le femmine insediate nella serra hanno impiegato la metà di tempo a fuoriuscire dal bozzolo ($3,12 \pm 0,65$ giorni di incubazione) rispetto a quelle che non hanno nidificato ($6,33 \pm 2,23$ giorni di incubazione). In particolare, tra le femmine insediate, c'è stata una alta variabilità nella durata del PS (da un minimo di 29 ad un massimo di 64 giorni), nella durata del periodo di incubazione (2-4 giorni) e nella durata della pre-nidificazione (2-9 giorni) (tab. 4.2). Le femmine iniziarono a nidificare in media dopo quattro giorni dal rilascio in serra. Sia la durata dell'incubazione ($R = 0,32$; $P = 0,111$) che la durata della pre-nidificazione ($R = 0,151$; $P = 0,461$) non erano in relazione con la durata del PS.

4.3.3 Attività di nidificazione e fecondità

La durata media della nidificazione è stata di 17 giorni, ma anche in questo caso è emersa una notevole variabilità tra le femmine (da 3 a 36 giorni di nidificazione – tab. 4.2), tuttavia non era correlata con la durata del PS ($R = 0,02$; $P = 0,932$). Le femmine che si sono insediate hanno prodotto in totale 571 celle. Il numero di uova deposte per femmina

(fecondità) andava da un minimo di 2 a un massimo di 48 (tab. 4.2) ed è risultato essere altamente correlato con la durata della nidificazione piuttosto che con la durata del PS (tab. 4.3). Il tasso di approvvigionamento è stato molto variabile tra le femmine (da 0,14 a 2,33 celle al giorno) ma non è risultato essere correlato con la durata del PS e con la durata della nidificazione (tabb. 4.2 e 4.3).

4.3.4 Sex ratio primaria e investimento parentale

E' emersa una forte variabilità tra le femmine nella sex ratio primaria e nell'investimento parentale calcolato in base ai pesi freschi delle provvigioni. La sex ratio primaria della progenie ($\text{♂♂}:\text{♂♂}+\text{♀♀}$) andava da 0 (progenie solo femminile) a 1 (progenie solo maschile) mentre l'investimento parentale variava da 0,4 g a 14,0 g di polline-nettare fresco raccolto per femmina (tab. 4.2). Entrambe le variabili erano fortemente correlate con la durata della nidificazione mentre non era significativo l'effetto della durata del PS (tab. 4.3).

4.3.5 Progenie

Il tasso di mortalità totale della progenie è stato in generale elevato e comunque molto variabile tra le femmine nidificanti. La mortalità media della progenie variava da 0 % a 80 % (tab. 4.2) e non era correlata né con la durata del PS né con la durata della nidificazione (tab. 4.3). Il peso medio della progenie maschile andava da 0,072 g a 0,129 g, mentre quella femminile andava da 0,107 g a 0,196 g (tab. 4.2). Anche in questo caso non sono emerse relazioni tra queste variabili e la durata del PS e della nidificazione (tab. 4.3).

Tabella 4.2 Variabilità relativa all'attività di nidificazione e al successo riproduttivo di femmine di *Osmia lignaria* nidificanti all'interno della serra.

	N	Media	Dev. Stand.	Max	Min
Durata dell'incubazione ¹	26	3,12	0,65	4,00	2,00
Durata della pre-nidificazione ¹	26	4,15	1,43	9,00	2,00
Durata della nidificazione ¹	26	16,35	10,50	36,00	3,00
Fecondità ²	26	21,23	15,12	48,00	2,00
Investimento parentale ³	26	6,17	4,25	13,99	0,40
Tasso di celle prodotte ⁴	26	1,40	0,50	2,33	0,14
Sex ratio primaria ⁵	26	0,62	0,21	1,00	0,00
Mortalità della progenie ⁶	26	45,64	19,02	80,00	0,00
Peso della progenie ♂ ³	25	0,099	0,015	0,129	0,072
Peso della progenie ♀ ³	24	0,158	0,022	0,196	0,107

¹in giorni; ²uova deposte; ³in grammi; ⁴celle prodotte per giorno; ⁵ $\text{♂♂}:\text{♂♂}+\text{♀♀}$; ⁶in percentuale.

Tabella 4.3 Risultati delle regressioni multiple fra diverse variabili legate al successo riproduttivo di femmine di *Osmia lignaria* e la durata del PS e della nidificazione.

	Modello				Durata del PW		Durata della nidificazione	
	R2	F	gdl	P	β	P	β	P
Fecondità	0,60	16,95	2,23	<0,0001		NS	0,77	<0,0001
Investimento parentale	0,54	13,59	2,23	0,0001		NS	0,73	<0,0001
Tasso di approvvigionamento	0,04	0,43	2,23	0,66		NS		NS
Sex ratio primaria	0,39	7,28	2,23	0,004		NS	0,59	0,001
Mortalità della progenie	0,03	0,38	2,23	0,69		NS		NS
Peso della progenie ♂	0,16	2,06	2,23	0,15		NS		NS
Peso della progenie ♀	0,14	1,75	2,23	0,20		NS		NS

NS – Non Significativo

4.4 Discussione

Nelle osmie, è stato dimostrato che una lunga esposizione a temperature alte prima dello svernamento (pre-svernamento - PS) ha un forte effetto sullo sviluppo della diapausa, sulla perdita di peso e sul consumo dei corpi grassi e delle riserve lipidiche. Queste perdite si traducono in una elevata mortalità invernale e, negli individui che sono in grado di fuoriuscire dal bozzolo, una minore vigoria post-invernale (Bosch e Kemp 2004; capitolo 1; Bosch, Kemp e Sgolastra, non pubblicato). L'obiettivo di questo studio era quello di capire se le perdite avvenute durante il PS comportano anche una diminuzione di fitness nelle femmine che fuoriescono dal bozzolo. In teoria, la diminuzione della fitness poteva avvenire attraverso tre meccanismi: 1) una bassa probabilità di insediamento (cioè di nidificare); 2) una maturazione più lenta degli ovari che farebbe aumentare il periodo di pre-nidificazione (e diminuire il periodo di nidificazione); 3) una minore vigoria che farebbe ridurre la longevità (altamente correlata con la fecondità fenotipica) e/o il tasso di approvvigionamento. Un basso tasso di approvvigionamento farebbe ridurre la taglia delle provvigioni e quindi della progenie (con il conseguente incremento della mortalità e lo spostamento della sex ratio verso il sesso maschile). Dai nostri risultati non sono emerse differenze significative nella fitness tra le femmine con diversi giorni di PS. Sia le femmine precoci (esposte a molti giorni di PS) che quelle tardive (esposte a pochi giorni di PS) hanno mostrato stessi livelli di performance riproduttive dopo la fuoriuscita dal bozzolo.

4.4.1 Insemediamento

La durata del PS non ha influito sulla probabilità di insemediamento delle femmine in serra. Invece, è stata significativa l'influenza della durata dell'incubazione. Le femmine non nidificanti hanno "subito" un periodo d'incubazione doppio rispetto a quelle insediate. Durante l'incubazione le osmie perdono in media circa 2 mg al giorno di peso corporeo contro i 0,4 mg durante il PS (capitolo 1). Infatti, anche se il periodo di incubazione è molto corto, la temperatura è più elevata e il tasso di respirometria è più alto rispetto al PS (capitolo 1 e 2). Per questo motivo dato che il peso corporeo dopo la fuoriuscita dal bozzolo è positivamente correlato con la probabilità di nidificazione (Tepedino e Torchio 1982, Bosch e Vicens 2006) è possibile che le femmine incubate per molti giorni, perdendo molto peso, non sono poi state in grado di nidificare.

4.4.2 Maturazione degli ovari

Non si è trovato un effetto della durata del PS sul periodo di pre-nidificazione. Come dimostrato nel capitolo 1, le dimensioni medie degli oociti subito dopo la fuoriuscita dal bozzolo non differiscono tra le femmine con diverse durate di PS. Nonostante il basso tasso di respirometria durante il PS, c'è una maturazione importante degli oociti e quindi le femmine presvernate per lungo tempo hanno una maggiore crescita degli oociti. Tuttavia le femmine con meno giorni di PS riescono a recuperare lo svantaggio durante l'incubazione. La maturazione completa degli oociti avviene però durante il periodo di pre-nidificazione. Evidentemente le riserve energetiche rimaste nelle femmine con molti giorni di PS sono state sufficienti per completare la maturazione degli ovari durante la pre-nidificazione.

4.4.3 Longevità e tasso di approvvigionamento

Non è emerso un effetto del PS sulla fecondità delle femmine nidificanti e sul tasso di approvvigionamento. I nostri risultati coincidono con quelli ottenuti in *Bombus terrestris* in cui né le temperature né le durate dello svernamento influenzano le performance post-diapausa delle regine svernate (Beekman et al. 1998; Beekman e van Stratum 2000). A differenza delle osmie, le regine dei bombi svernano come adulti già fecondati e in primavera iniziano subito la costituzione della colonia. Questi studi hanno dimostrato che, come in *O. lignaria* (capitolo 1), le durate dello svernamento influenzano la sopravvivenza, ma non la fecondità e la capacità di formare le colonie. Tuttavia, in queste prove, alle regine sopravvissute alla diapausa veniva fornito polline e nettare prima e durante la costituzione

della colonia (Beekman et al. 1998; Beekman e van Stratum 2000). Altri studi effettuati sui bombi hanno dimostrato che la disponibilità di polline influenza sia la longevità (Smeets e Duchateau 2003) che lo sviluppo degli ovari (Duchateau 1989). Anche in *Apis mellifera* è stato dimostrato che una dieta altamente proteica allo stato di adulto aumenta lo sviluppo degli ovari (Hoover et al. 2006). Nelle osmie il consumo di polline (proteine) durante il periodo di pre-nidificazione potrebbe servire per recuperare le riserve energetiche perse e per completare la maturazione degli ovari, così come dimostrato nell'ape taglia foglia *Megachile rotundata* (Richards 1994) e in alcune *Ceratina* (Kurihara et al. 1981). Come evidenziato anche in altri studi è possibile che gli insetti riescano a compensare le riserve energetiche perse durante lo svernamento alimentandosi subito dopo l'uscita dalla diapausa (Ishihara e Shimada 1995; Chang et al. 1996). Le femmine precoci (con molti giorni di PS) di *O. lignaria* riescono a recuperare il "gap" iniziale in termini di riserve energetiche perse durante il PS alimentandosi subito dopo la fuoriuscita dal bozzolo. In studi effettuati precedentemente sulle osmie (Bosch e Kemp 2004; Bosch, Kemp e Sgolastra, non pubblicato) la vigoria era stata valutata misurando la longevità in laboratorio senza somministrazione di alimento. Questi risultati però non coincidono con diversi studi fatti su altri insetti, che hanno trovato un trade-off fra diapausa e fecondità (Bradshaw et al. 1998; Irwin e Lee 2000; Ellers e van Alphen 2002; Musolin e Numata 2003). Ellers e van Alphen (1997) hanno dimostrato che esiste un trade-off tra le uova prodotte e i lipidi nei parassitoidi, dato che entrambi dipendono dalla stessa limitata quantità di energia disponibile negli adulti. Le riserve di lipidi possono essere usate per la produzione delle uova o essere usate direttamente per la mobilità, il metabolismo, ecc. Tuttavia la disponibilità di cibo è in grado di annullare questo trade-off (Eijs e van Alphen 1999).

Secondo Jervis e Ferns (2004), il diverso meccanismo e il momento della completa maturazione degli ovari influenzano il successo riproduttivo delle femmine. Infatti, nelle specie che sfarfallano con gli ovari già completamente sviluppati, il successo riproduttivo è legato al numero di uova mature presenti negli ovari e alle riserve dei corpi grassi investite nella maturazione delle uova. Nel caso di specie, come le osmie, che completano la maturazione degli ovari dopo la fuoriuscita dal bozzolo, il fattore limitante nel successo riproduttivo non è il numero di uova mature presenti, ma piuttosto la disponibilità di risorse (fiori e nidi). Potenzialmente una femmina di osmia, nel corso della sua vita, è in grado di ovideporre fino a 40-50 uova ma solo raramente ne depone più di 10-20 (Maeta 1978; Tepedino e Torchio 1982; Frohlich e Tepedino 1986; Bosch 1994; Bosch e Vicens 2005;

Bosch e Vicens 2006). La maturazione degli oociti procede in modo alternato durante la nidificazione e solo uno maturo per volta è presente negli ovari. Il tasso di maturazione dell'oocita è in relazione al tasso di approvvigionamento: quando la provvigione viene terminata l'uovo viene deposto. Tuttavia le femmine non sono in grado di mantenere per molto tempo le uova mature e nei casi in cui le condizioni climatiche o la fine della fioritura impediscono l'approvvigionamento delle celle, gli oociti maturi vengono deposti su provvigioni piccole o vengono degenerati (Maeta e Kurihara 1971). Il riassorbimento delle uova può servire nei megachilidi anche per recuperare le proteine in casi di carenza di risorse trofiche per la femmina (Sihag 1986). Quindi nelle osmie, più che la durata del PS, è la durata della nidificazione che influenza il successo riproduttivo (fecondità, investimento parentale e sex ratio) delle femmine (Bosch and Vicens 2006).

In conclusione, ci sono due periodi, il PS e l'incubazione, durante i quali le osmie adulte dentro al bozzolo sono esposte a temperature elevate. Entrambi i periodi sembrano avere un effetto importante sulla fitness. Un PS troppo lungo provoca una forte perdita di peso e di riserve energetiche che comportano un'elevata mortalità invernale e una minore vigoria. Dopo l'inverno, il periodo di incubazione sembra imporre un secondo costo metabolico. In popolazioni con periodi di PS troppo lunghi, alcune femmine muoiono durante l'incubazione perchè non hanno abbastanza energia per finire di rosicchiare il bozzolo. Altre femmine riescono a fuoriuscire dal bozzolo, però non sono abbastanza vigorose per volare fino ai fiori ed alimentarsi (Bosch e Kemp 2004). Gli individui che riescono a sopravvivere all'inverno e ad alimentarsi sembrano essere in grado di ricostruire le riserve metaboliche e non vedono diminuita la loro fitness.

Studi futuri dovrebbero studiare l'effetto combinato della durata del PS e della durata dell'incubazione. Il rapporto fra queste due variabili non è lineare: la durata dell'incubazione è minore quando quella del PS è intermedia (30 giorni) (Bosch, Kemp e Sgolastra, non pubblicato). Secondo questo modello, i livelli di fitness più elevati si potrebbero raggiungere non con periodi di PS corti, ma con periodi di PS intermedi. Individui svernati come pupe o come adulti neo formati, non sono in grado di superare l'inverno (Bosch et al. 2006; Maeta et al. 2006). La selezione favorirà quindi quei genotipi che si svilupperanno sufficientemente presto da raggiungere lo stato adulto prima dell'arrivo delle temperature invernali, ma tardi a sufficienza da evitare un lungo PS.

Capitolo 5

Tasso di sviluppo di due popolazioni di *Osmia lignaria* di diverse latitudini

5.1 Introduzione

Tutti i fattori, abiotici e biotici, che agiscono sugli organismi viventi sono soggetti continuamente a cambiamenti temporali e stagionali. Negli insetti la sincronizzazione del ciclo biologico con le variazioni stagionali rappresenta un adattamento molto importante. Infatti la selezione naturale favorisce quelli individui che sincronizzano in modo appropriato il loro ciclo biologico con gli eventi ambientali (Taylor 1980; Dingle 1986; Tauber et al. 1986; Danks 1987). Lo sviluppo e la durata delle varie fasi fenologiche del ciclo biologico sono negli insetti, come in tutti gli organismi ectotermici, regolati dalle temperature ambientali. Le condizioni climatiche locali possono differire enormemente sia nel tempo che nello spazio. In genere, con l'aumentare della latitudine, c'è una diminuzione della durata della stagione calda e un aumento della durata e dell'intensità della stagione fredda (cioè del periodo in cui sono presenti temperature che non consentono lo sviluppo). Per questo motivo, le specie che presentano un ampio areale di distribuzione sono esposte a condizioni climatiche molto diverse. Queste specie mostrano variazioni sostanziali nella stagionalità del ciclo biologico tra le diverse popolazioni geografiche che possono essere controllate dall'ambiente o, più spesso, essere il risultato di adattamenti genetici alle condizioni locali (Tauber et al. 1986). Questi ceppi geneticamente differenti che sono specializzati a vivere limitatamente in certi habitat sono detti ecotipi. I meccanismi principali con cui le popolazioni di insetti sincronizzano il loro ciclo biologico con le condizioni locali sono due: il voltinismo e la compensazione fisiologica.

Per voltinismo si intende il numero di generazioni che un insetto può compiere in un anno. Alcune specie che presentano un ampio areale di distribuzione sono multivoltine alle latitudini (o altitudini) più basse e monovoltine alle latitudini più alte (Danks 1987). Infatti, le

specie con diapausa facoltativa possono cambiare il numero di generazioni durante la stagione favorevole in base alla temperatura. Ad esempio a nord, il coleottero *Atrachya menetriesi* è monovoltino ed entra in diapausa allo stato embrionale, mentre al diminuire delle latitudini, l'incidenza delle uova che non entrano in diapausa aumenta e quindi si produce una parziale seconda generazione (Ando 1983). La falena *Hyphantia cunea* è invece trivoltina a sud e bivoltina a nord (Gomi 1996).

In altri casi l'adattamento di una specie ad un ampio areale di distribuzione avviene attraverso una compensazione fisiologica, cioè, alle stesse temperature, le popolazioni di zone fredde hanno un tasso di sviluppo più elevato. Infatti, secondo Taylor (1981), in molti insetti le popolazioni che vivono a basse latitudini o altitudini presentano un lento tasso di sviluppo e se spostate alle altitudini o latitudini più alte possono non essere in grado di completare neanche una generazione. In genere, nelle popolazioni di bassa latitudine la temperatura ottimale di sviluppo è più alta. Ad esempio, in popolazioni di varie latitudini di *Chrysopa carnea* è stato dimostrato che la soglia di temperatura di sviluppo tende a decrescere con l'aumentare delle latitudini (Tauber e Tauber 1978). Risultati simili sono stati osservati in molte altre specie di insetti (revisione in Tauber et al. 1986; Traoré et al. 2006).

Osmia lignaria è un Apoideo solitario del Nord America, è presente dal sud del Canada (55° N) al nord del Messico (30° S), attraversando gran parte degli Stati Uniti (Rust 1974). A causa dell'ampio areale di distribuzione, questa specie si trova esposta a diverse condizioni climatiche, in particolare di temperatura (tab. 5.1).

Tabella 5.1 Temperature mensili (media, minima e massima) di San Luis Obispo, CA (35° N) nel 2005-06 e di Logan, UT (43° N) nel 1997-98.

MESE	Temperature mensili (°C) di San Luis Obispo CA	Temperature mensili (°C) di Logan UT
Gennaio	13,3 (1,6-26,7)	-0,4 (-12,5; 7,4)
Febbraio	11,2 (1,6-22,9)	0,86 (-8,8; 9,3)
Marzo	12,5 (2,5-27,9)	2,54 (-14,7; 17,4)
Aprile	14,0 (3,2-32,0)	7,6 (-2,4; 25,5)
Maggio	16,8 (5,8-33,2)	13,2 (2,5; 25,8)
Giugno	16,9 (5,1-32,0)	18,1 (2,9; 32,0)
Luglio	20,5 (11,8-35,5)	20,9 (7,1; 34,7)
Agosto	20,3 (10,6-38,6)	22,0 (10,7; 33,2)
Settembre	18,7 (9,2-42,8)	16,2 (3,3; 30,2)
Ottobre	18,0 (8,3-33,8)	8,0 (-4,6; 26,2)
Novembre	16,2 (5,4-28,3)	2,1 (-9,8; 14,9)
Dicembre	13,9 (10,0-14,8)	-6,2 (-17,1; 4,0)

Le popolazioni del nord sono sottoposte durante l'anno a temperature medie più basse e subiscono uno svernamento più lungo e intenso rispetto alle popolazioni del sud. Ciò comporta delle differenze fenologiche tra le diverse popolazioni. In primavera, da febbraio a maggio, a seconda delle latitudini, prima i maschi e poi le femmine fuoriescono dai nidi pedotrofici e iniziano a nidificare. Le popolazioni del nord volano in aprile-maggio (popolazione tardiva) mentre quelle del sud in febbraio-marzo (popolazione precoce). Per questa specie è importante sincronizzare il periodo di nidificazione con le fioriture primaverili in quanto la disponibilità di molti fiori su cui bottinare durante la nidificazione equivale ad una maggiore disponibilità trofica per la progenie con conseguente aumento della loro fitness (Tepedino e Torchio 1982). L'attività di nidificazione dura circa un mese durante il quale la femmina costruisce uno o più nidi. Ogni nido è costituito da una serie lineare di celle divise da setti di fango. La femmina approvvigiona ogni cella con un panetto di polline e nettare sulla cui estremità depone un uovo. Dall'uovo schiude una larva che si alimenta della provvigione. Raggiunto il quinto stadio larvale, l'insetto tesse un bozzolo ed entra in uno stato di dormienza diapausa-mediata (*sensu* Tauber et al. 1986). Durante questa fase, la prepupa presenta un basso tasso di respirometria e una bassa perdita di peso (Kemp et al. 2004). La metamorfosi in adulto avviene a fine estate-inizio autunno. L'adulto rimane all'interno del bozzolo e sverna in diapausa (diapausa invernale allo stato di adulto) fino alla primavera successiva. In questa fase l'esposizione alle basse temperature è essenziale per il completamento della diapausa e per essere in grado di fuoriuscire dal bozzolo non appena le temperature iniziano ad aumentare in primavera (Bosch e Kemp 2003; capitolo 1). *O. lignaria* è una specie monovoltina che sverna come adulto. Individui svernanti come prepupe o pupe non sono vitali (Bosch e Kemp 2000; Bosch et al. 2006). Dato che nelle aree di alte latitudini o altitudini il periodo di nidificazione avviene tardi e le temperature post-estive iniziano presto a diminuire, le osmie di queste aree devono sviluppare più rapidamente di quelle delle aree più calde. Alternativamente, le popolazioni precoci potrebbero sviluppare allo stesso tasso delle popolazioni tardive e "subire" un lungo pre-svernamento (adulti esposti alle temperature calde idonee per lo sviluppo). Tuttavia, durante il pre-svernamento gli adulti presentano un'elevata perdita di peso e quelli presvernati per oltre un mese mostrano evidenti segni di consumo dei corpi grassi e una ridotta sopravvivenza invernale (Bosch e Kemp 2004; capitolo 1). Per questo motivo, la sincronizzazione del periodo di sviluppo in adulto con l'abbassamento delle temperature invernali a livello locale è critico per spiegare l'ampio areale di distribuzione di *O. lignaria*.

In questo studio si confronta il tasso di sviluppo (da uovo ad adulto) di due popolazioni di *Osmia lignaria* di diverse latitudini. La popolazione tardiva è originaria della Cache Valley vicino a Logan, USA (Utah del nord: 40° 43' N, 111° 53' W) mentre quella tardiva è originaria della California Central Valley vicino a San Luis Obispo, USA (California centrale: 35° 17' N, 120° 41' W). L'obiettivo dello studio è comprendere i meccanismi che consentono ad ogni popolazione di sincronizzare il loro arrivo in adulto con l'abbassamento delle temperature in autunno-inverno. In particolare, vogliamo sapere se la popolazione del sud ha un tasso di sviluppo più basso, e se questo, avviene in tutti gli stadi di sviluppo o solo in alcuni.

5.2 Materiali e Metodi

5.2.1 Popolazione precoce

La popolazione precoce è stata ottenuta nei pressi di San Luis Obispo, CA, USA. Come materiale di nidificazione sono state usate cannuce di carta (15 cm di lunghezza e 7,5 mm di diametro) inserite in blocchi di legno (Torchio 1982). Il 21 marzo e il 7 aprile 2005, due serie di nidi tappati sono stati spediti al Bee Biology and Systematics Laboratory a Logan UT, dove le cannuce sono state aperte. In ogni nido, le celle con le uova non schiuse sono state datate assumendo un tasso di approvvigionamento di circa una cella al giorno (Phillips e Klostermeyer 1978; Torchio 1989). Il sesso alle uova è stato assegnato in base alla dimensione della provvigione e alla posizione all'interno del nido (Levin 1966; Phillips e Klostermeyer 1978; Torchio 1989); il sesso è stato confermato dopo l'uscita degli insetti dai bozzoli. Le celle dei maschi e delle femmine sono state assegnate in ugual numero ai vari trattamenti di temperatura, assicurandosi che a nessun trattamento venivano assegnate due celle dallo stesso nido e sesso. I campioni erano costituiti da circa 35 maschi e 30 femmine per trattamento.

Ogni provvigione con le uova (o le larve al 1° stadio di sviluppo) sono state numerate e trasferite in celle artificiali di argilla (Torchio e Bosch 1992). Per evitare la perdita di umidità dalle provvigioni, le celle di argilla sono state coperte con vetrini copri-oggetto per microscopio. I blocchi di argilla sono state trasferite negli incubatori, tre dei quali a temperatura costante: 20 °C, 26 °C e 29 °C, e uno a temperatura fluttuante: 14:27 °C con un ciclo giornaliero di 8:16 h (temperatura media = 22.6 °C). I blocchi di argilla venivano controllati giornalmente e annotate le date di schiusa dell'uovo, di inizio della defecazione e

la data di inizio e completamento della tessitura del bozzolo. Al termine della tessitura del bozzolo, ogni individuo veniva posto in una capsula chiara di gelatina e radiografato ogni lunedì e giovedì (Stephen e Undurraga 1976). Le immagini ai raggi X sono state usate per registrare le date di pupazione e di muta in adulto. Dopo l'arrivo in adulto, le osmie sono state progressivamente trasferite a temperature fredde per simulare l'inverno: 14 giorni alla temperatura del trattamento (pre-svernamento) + 7 giorni a 20 °C + 180 giorni a 4 °C. Al termine dello svernamento le osmie sono state incubate a 22 °C e controllate giornalmente in modo da registrare la data di fuoriuscita dal bozzolo.

Un trattamento aggiuntivo "condizioni naturali" è stato utilizzato per conoscere in natura le date di inizio pupazione, sviluppo in adulto e fuoriuscita dal bozzolo. Alcuni nidi completati sono stati inseriti in blocchi di legno e lasciati sviluppare in condizioni naturali di San Luis Obispo (tab. 1). A partire dal 6 luglio 2005 ogni 2 settimane i nidi sono stati radiografati e il numero di pupe e di adulti è stato registrato. Da febbraio 2006 i nidi sono stati controllati giornalmente e registrate le date di fuoriuscita dal bozzolo.

5.2.2 Popolazione tardiva

I dati sulla durata e sul tasso di sviluppo di una popolazione tardiva di *O. lignaria* derivano da uno studio precedente (Bosch e Kemp 2000) effettuato sui tempi di sviluppo di una popolazione del nord dello Utah (Logan, Cache Valley) allevata in condizioni artificiali di temperatura costante: 18 °C, 22 °C, 26 °C, 29 °C e fluttuante 14:27 °C (8h:16h). In aggiunta è stata misurata la durata di sviluppo da uovo a pupa e da pupa ad adulto su alcuni individui mantenuti in condizioni naturali di Logan.

5.2.3 Calcolo dei gradi-giorno per lo sviluppo

I gradi-giorno (GG) necessari per completare lo sviluppo larvale e di pupa sono stati calcolati per ogni individuo utilizzando la seguente formula: $GG = (T - T_{\min}) * DS$ (Pruess 1983; Wagner et al. 1984; Higley et al. 1986). DS e T sono rispettivamente la durata e la temperatura a cui le osmie sono state esposte durante lo sviluppo. T_{\min} è la soglia minima di temperatura al di sotto della quale il tasso di sviluppo è pari a 0. La T_{\min} è stata stimata estrapolando l'intercetta x dalla retta di regressione lineare ($y = a + bx$) ottenuta con il tasso di sviluppo (1/durata dello sviluppo) alle diverse temperature ($T_{\min} = -a / b$). Dato che la durata della prepupa non seguiva un andamento lineare con le temperature, i gradi-giorno per questo periodo non sono stati calcolati.

5.2.4 *Analisi statistica*

La durata dello sviluppo completo da uovo ad adulto nella popolazione precoce è stata analizzata con un'ANOVA a 2 vie con la temperatura (20 °C, 26 °C, 29 °C e 14:27 °C) e il sesso come fattori.

Le durate larvale (da uovo alla tessitura del bozzolo), della prepupa e della pupa sono state confrontate tra le due popolazioni usando l'ANOVA a 3 vie, con la popolazione, la temperatura e il sesso come fattori. In questo caso, abbiamo utilizzato solo le temperature di allevamento coincidenti per le due popolazioni (26 °C, 29 °C e 14:27 °C). I gradi-giorno calcolati per lo stato larvale e quello di pupa sono stati confrontati con un'ANOVA a 2 vie considerando la popolazione e il sesso come variabili indipendenti.

Successivamente, per valutare quale fase contribuisce maggiormente a determinare la data di arrivo in adulto entro la popolazione, è stato effettuato un'analisi di regressione multipla con 3 variabili indipendenti: durata dello stato larvale, dello stato di prepupa e quello di pupa. La variabile dipendente era il momento di arrivo in adulto. Questo è stato fatto (separatamente per i maschi e per le femmine) nelle due popolazioni alla temperatura di 14:27 °C (il trattamento in cui è stato registrato il più alto tasso di sopravvivenza in entrambe le popolazioni). La tolleranza delle tre variabili indipendenti andava da 0,75 a 0,98, indicando assenza di eccessiva colinearità.

5.3 Risultati

5.3.1 *Popolazione precoce*

Le diverse temperature di allevamento influenzano molto significativamente la durata dello sviluppo completo da uovo ad adulto delle osmie ($F_{(3,137)} = 108,490$; $P < 0,001$) (tab. 2). Lo sviluppo più veloce si è registrato alla temperatura fluttuante. Il fattore sesso è stato significativo ($F_{(1,137)} = 41,788$; $P < 0,001$): le femmine si sono sviluppate più lentamente dei maschi. L'interazione temperatura-sesso è risultata non significativa ($F_{(3,137)} = 2,387$; $P = 0,072$). Alle temperature costanti le durate dello stato larvale e dello stato pupale sono diminuite all'aumentare della temperatura (tab. 5.2). Invece, la durata media della prepupa è risultata minore a 26 °C. La prepupa è stata l'unica fase dello sviluppo in cui sono stati registrati i valori più bassi di durata alla temperatura fluttuante (tab. 5.2).

Al 1° ottobre 2005, il 68% delle femmine e il 47% dei maschi allevati a 20°C erano ancora prepupe. Questi individui (10 maschi e 13 femmine) sono stati svernati come prepupe

a 4 °C per 180 giorni e nella primavera successiva (2006) sono stati trasferiti a 14:27 °C (8:16 h) per consentirne lo sviluppo completo. Una volta diventati adulti, questi individui sono stati svernati per il secondo anno (altri 180 giorni a 4 °C). Nel gennaio 2007, 9 maschi e 9 femmine di questi individui semivoltini sono stati in grado di fuoriuscire dal bozzolo dopo, rispettivamente, $4,00 \pm 0,41$ e $5,67 \pm 0,33$ giorni di incubazione a 22 °C.

5.3.2 *Popolazione tardiva*

I risultati relativi alla durata di sviluppo della popolazione tardiva sono stati analizzati in uno studio precedente (Bosch and Kemp 2000) e sono mostrati in tabella 5.3.

5.3.3 *Confronto tra le due popolazioni*

La durata media della larva è significativamente maggiore nella popolazione precoce rispetto a quella tardiva (fig. 5.1 e tab.5.4). Anche la temperatura ha un effetto importante sulla durata, infatti alla temperatura di 29 °C lo sviluppo è più rapido, mentre è più lento a temperatura fluttuante (fig. 5.1 e tab. 5.4). Le femmine impiegano significativamente più giorni dei maschi per completare la fase larvale (fig. 5.1 e tab. 5.4). C'è stata una interazione significativa popolazione-temperatura e popolazione-sesso. Le differenze della durata larvale fra temperature e sesso sono state meno pronunciate nella popolazione tardiva.

La durata della prepupa nella popolazione precoce è circa il doppio di quella tardiva (fig. 5.2 e tab. 5.4). Anche la temperatura ha avuto un effetto significativo (fig. 5.2 e tab. 5.4). Alla temperatura fluttuante entrambe le popolazioni impiegavano meno tempo per completare lo sviluppo della prepupa. In generale, le femmine impiegano più tempo rispetto ai maschi per completare la fase prepupale (fig. 5.2 e tab. 5.4). C'è stata una significativa interazione popolazione-temperatura (tab. 5.4). Nella popolazione precoce la durata della prepupa è stata più lunga a 29 che a 26 °C, mentre nella popolazione tardiva è successo il contrario (Fig. 5.2).

Anche la durata della pupa è stata significativamente minore nella popolazione tardiva (fig. 5.3 e tab. 5.4). La durata della pupa diminuiva all'aumentare della temperatura di allevamento (fig. 5.3 e tab. 5.4). I maschi impiegano meno giorni rispetto alle femmine per pupare (fig. 5.3 e tab. 5.4). C'è stata una interazione significativa popolazione-temperatura (tab. 5.4). Alla temperatura fluttuante, la durata della pupa è stata leggermente più elevata per la popolazione tardiva (fig. 5.3). C'è anche stata una interazione significativa popolazione-sesso (tab. 5.4). Le differenze fra maschi e femmine sono state molto più piccole nella popolazione tardiva (fig. 5.3).

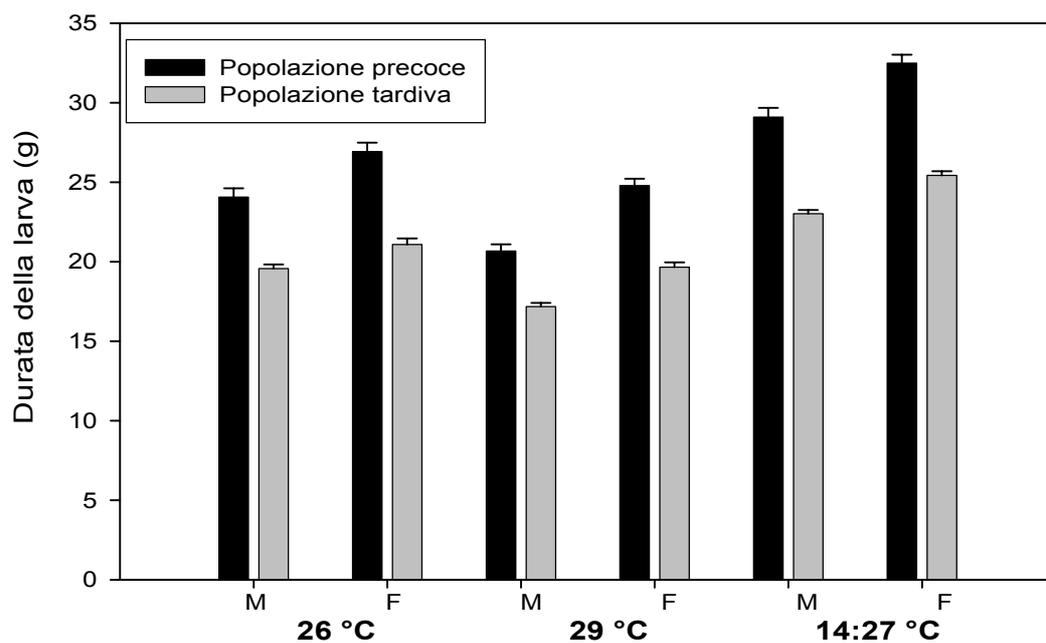


Figura 5.1 Confronto tra la popolazione precoce e quella tardiva nella durata della larva dei maschi e delle femmine allevate alle stesse temperature.

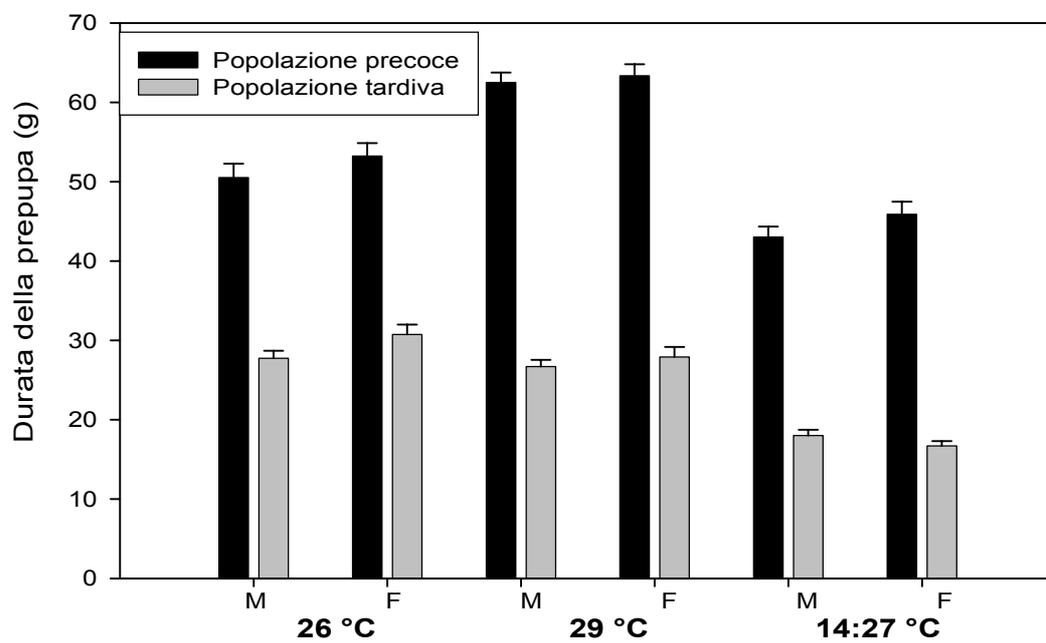


Figura 5.2 Confronto tra la popolazione precoce e quella tardiva nella durata della prepupa dei maschi e delle femmine allevate alle stesse temperature.

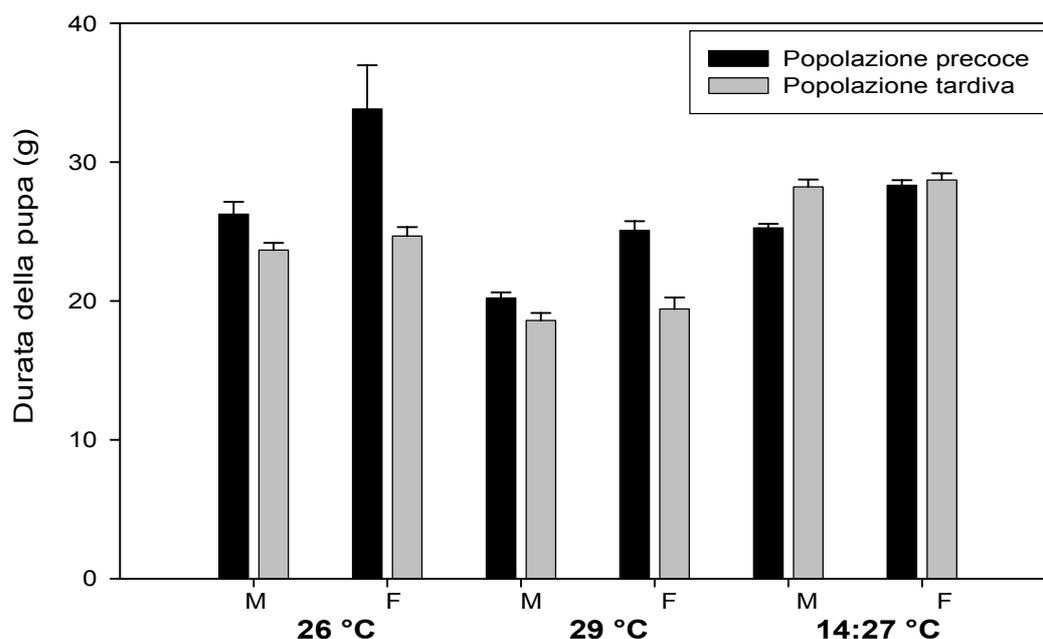


Figura 5.3 Confronto tra la popolazione precoce e quella tardiva nella durata della pupa dei maschi e delle femmine allevate alle stesse temperature.

Tabella 5.4 Tabella ANOVA della durata della larva, della prepupa e della pupa in relazione alla popolazione, alla temperatura e al sesso.

Fattore	Larva			Prepupa			Pupa		
	gdl	F	P	gdl	F	P	gdl	F	P
Popolazione	1,499	583,74	<0,001	1,466	1695,16	<0,001	1,406	31,35	<0,001
Temperatura	2,499	342,60	<0,001	2,466	154,17	<0,001	2,406	117,09	<0,001
Sesso	1,499	159,57	<0,001	1,466	5,01	0,03	1,406	40,56	<0,001
Popolazione x Temp.	2,499	8,91	<0,001	2,466	29,87	<0,001	2,406	27,73	<0,001
Popolazione x Sesso	1,499	8,96	0,002	1,466	0,72	0,4	1,406	22,22	<0,001
Temperatura x Sesso	2,499	2,10	0,12	2,466	0,87	0,42	2,406	2,32	0,1
Pop. X Temp. X Sesso	2,499	0,18	0,83	2,466	1,25	0,29	2,406	1,42	0,24

Non sono emerse grosse differenze fra le due popolazioni nella soglia minima di temperatura per lo sviluppo larvale (tab. 5.5). Invece, i gradi-giorno necessari per completare lo sviluppo larvale (tab. 5.5) sono significativamente maggiori nella popolazione precoce rispetto a quella tardiva ($F_{(1,616)} = 585,12$; $P < 0,001$). Le femmine richiedono più gradi-giorno dei maschi ($F_{(1,616)} = 818,52$; $P < 0,001$). L'interazione popolazione-sesso è risultata significativa ($F_{(1,616)} = 177,50$; $P = 0,001$) perchè le differenze fra sessi è maggiore nella popolazione precoce.

Tabella 5.5 Equazioni di regressione lineare del tasso di sviluppo larvale e pupale alle diverse temperature, soglia termica minima di sviluppo (T_{min}) e gradi-giorno (media \pm ES) delle due popolazioni. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative (Test di Tukey: $P < 0,05$).

Stato	Popolazione	Sesso	Retta di regressione	R	F	P	Tmin	Gradi-Giorno
Larva	Precoce	♂	$Y = -0,0305 + (0,00279 * X)$	0,89	401,78	<0,001	10,9	366,50 \pm 4,21 b
		♀	$Y = -0,0151 + (0,00196 * X)$	0,90	377,88	<0,001	7,7	515,53 \pm 5,06 d
	Tardiva	♂	$Y = -0,0286 + (0,00309 * X)$	0,85	617,71	<0,001	9,3	327,88 \pm 2,33 a
		♀	$Y = -0,0225 + (0,00266 * X)$	0,81	345,73	<0,001	8,5	382,21 \pm 3,06 c
Pupa	Precoce	♂	$Y = -0,0378 + (0,00302 * X)$	0,93	340,28	<0,001	12,5	336,32 \pm 5,81 b
		♀	$Y = -0,0286 + (0,00235 * X)$	0,89	84,06	<0,001	12,2	430,74 \pm 12,86 c
	Tardiva	♂	$Y = -0,0399 + (0,00329 * X)$	0,79	335,26	<0,001	12,1	313,19 \pm 3,78 a
		♀	$Y = -0,0335 + (0,00295 * X)$	0,74	164,17	<0,001	11,4	349,87 \pm 4,73 b

Tabella 5.6 Risultati della regressione multipla e coefficienti Beta delle variabili indipendenti (durata larvale, prepupale e pupale) dei modelli additivi per la data di arrivo in adulto in maschi e femmine delle popolazioni precoce e tardiva.

Popolazione	Sesso	Modello					Larva		Prepupa		Pupa	
		R	R ²	gdl	F	P	β	P	β	P	β	P
Precoce	♂	0,63	0,4	3,29	6,27	0,002	-0,56	0,001	0,6	0,001	0,18	NS
	♀	0,48	0,23	3,29	2,88	0,053	-0,15	NS	0,42	0,03	0,40	0,41
Tardiva	♂	0,98	0,96	3,50	401,87	<0,001	0,11	<0,001	0,87	<0,001	0,67	<0,001
	♀	0,97	0,94	3,38	183,45	<0,001	0,08	NS	0,65	<0,001	0,70	<0,001

NS – Non significativo

Le soglie minime di temperatura per lo sviluppo pupale sono state simili per le due popolazioni (tab. 5.5). Invece, i gradi-giorno necessari per completare lo sviluppo pupale sono risultati significativamente differenti tra le due popolazioni ($F_{(1,424)} = 51,46$; $P < 0,001$). La popolazione precoce richiede più gradi-giorno della popolazione tardiva. Le femmine richiedono più gradi-giorni dei maschi ($F_{(1,424)} = 81,77$; $P < 0,001$) (tab. 5.5). L'interazione è risultata significativa ($F_{(1,424)} = 15,86$; $P < 0,001$), infatti le differenze fra i sessi sono più pronunciate nella popolazione precoce.

La soglia minima per completare lo sviluppo prepupale è più alta per la popolazione precoce. In questa popolazione allevata a 20 °C, il 47% dei maschi e il 68% delle femmine non sono stati in grado di completare la diapausa prepupale, mentre nella popolazione tardiva allevata a 18 °C erano circa il 16% dei maschi e il 37% delle femmine (fig. 5.4). La durata della prepupa non aumenta in modo lineare con l'aumentare della temperatura. Nella

popolazione precoce la durata minima è stata registrata a 26 °C (tab. 5.2). Nella popolazione tardiva, la durata prepupale è stata simile a 26 e 29 °C (tab. 5.3). In entrambe le popolazioni, le osmie allevate a temperatura fluttuante terminano lo sviluppo prepupale più velocemente delle osmie esposte a temperatura costante.

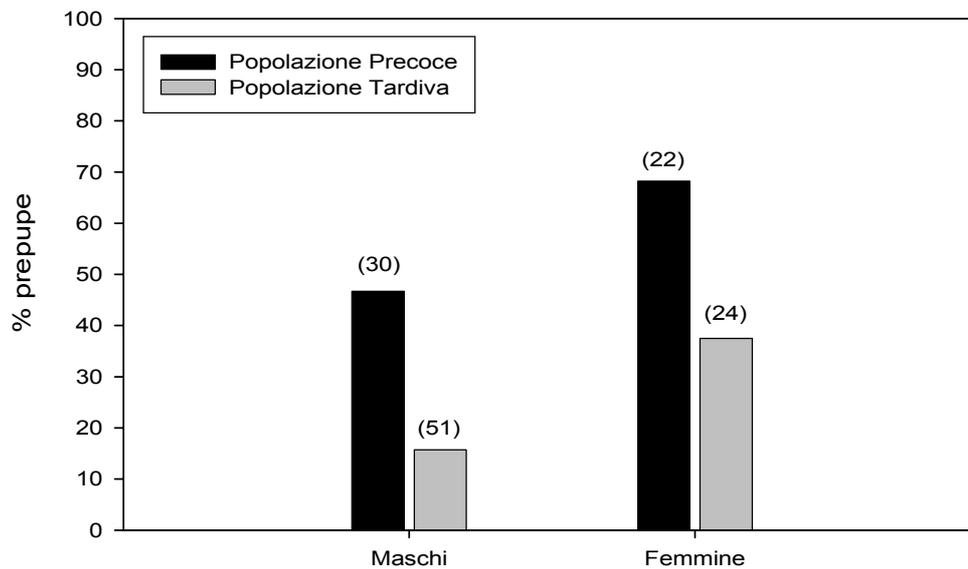


Figura 5.4 Percentuale di individui di *O. lignaria* di San Luis Obispo, CA (Popolazione precoce) e di Logan, UT (Popolazione tardiva) allevate rispettivamente a 20 °C e a 18 °C che non hanno pupato entro il primo anno. In parentesi la dimensione del campione (n).

In condizioni naturali tutte le osmie del trattamento “condizioni naturali” della popolazione precoce avevano pupato entro il 19 agosto ed entro il 4 ottobre 2005 erano tutte diventate adulte. La durata completa dello sviluppo nella popolazione precoce allevata in condizioni naturali è di oltre 160 giorni. La temperatura ambientale di San Luis Obispo durante il periodo di sviluppo (da metà marzo a fine settembre) andava da 2,5 a 42,8 °C con una temperatura media di 17,6 °C (tab. 5.1). Durante lo svernamento la temperatura minima non scendeva mai al di sotto di 1,6 °C con una temperatura media da ottobre 2005 a febbraio 2006 di 14,5 °C (tab. 5.1). Nel 2006 i primi maschi di questa popolazione hanno iniziato la fuoriuscita dal bozzolo l’11 febbraio mentre le prime femmine l’8 marzo. Nella popolazione tardiva allevata in condizioni naturali di Logan lo sviluppo in adulto avveniva molto più presto, entro il 30 agosto. In questa popolazione la durata media dello sviluppo da uovo ad adulto era di circa 97 giorni e la temperatura durante questo periodo (15 maggio-30 agosto) variava da 1,7 a 45,7 °C con una temperatura media di 19,5 °C (tab. 5.1). Durante lo

svernamento, da settembre 1997 ad aprile 1998 la temperatura di Logan andava da -17,1 °C a 29,1 °C con una media di 2,6 °C (tab. 5.1). In condizioni naturali, in primavera, le osmie sono fuoriuscite dal bozzolo in aprile.

Sia per i maschi che per le femmine di entrambe le popolazioni, il momento di arrivo in adulto è risultato correlato con tutte o quasi tutte le variabili prese in considerazione (durata della larva, la prepupa e la pupa) (tab. 5.5). Tuttavia, come si evidenzia dai valori dei coefficienti Beta, il fattore principale è stato la durata della prepupa (tab. 5.5).

5.4 Discussione

Sia nella popolazione precoce che in quella tardiva, la temperatura fluttuante è stata quella che ha provocato la minore mortalità. In tutti gli stati di sviluppo, ad eccezione dalla prepupa, risulta esserci una regressione lineare tra la temperatura di allevamento e il tasso di sviluppo. Risultati simili sono stati osservati in *Osmia cornifrons* (Maeta 1978; Maeta et al. 2006). In *O. lignaria* le temperature minime di sviluppo stimate per la fase larvale e pupale sono state di 8-11 °C e circa 12 °C, rispettivamente. In *O. cornifrons* queste soglie sono di 7-14 °C e circa 10 °C, rispettivamente (Maeta 1978; Maeta et al. 2006). I valori medi dei gradi-giorno confermano che i maschi si sviluppano più rapidamente delle femmine in entrambe le popolazioni avvantaggiando la proterandria. I nostri risultati dimostrano che esistono delle profonde differenze nel modo in cui la temperatura influenza la durata dello stato di prepupa da quello di pupa o quello di larva. Infatti mentre la relazione tra temperatura e tasso di sviluppo nella pupa e nella larva è di tipo lineare, nello stato di prepupa questa relazione assume una forma ad U invertita. La prepupa subito dopo aver completato la tessitura del bozzolo entra in una fase di dormienza mediata dalla diapausa (*sensu* Tauber et al. 1986), durante la quale le osmie presentano un basso tasso di respirometria e una scarsa perdita di peso (Bosch e Vicens 2002; Kemp et al. 2004). In condizioni artificiali, affinché la diapausa prepupale venga completata è richiesta una temperatura fluttuante o superiore ad una certa soglia (più di 18 °C per la popolazione tardiva, più di 20 per la popolazione precoce). Maeta et al. (2006), hanno dimostrato che è possibile mantenere a 10 °C le prepupe di *O. cornifrons* per oltre 430 giorni. Questi individui, se poi vengono incubati a 22 °C, sviluppano in adulti sani. Le prepupe di *O. lignaria*, se svernate e poi incubate, sono quasi tutte in grado di pupare ma raramente formano adulti sani e comunque, il loro ciclo biologico non è in sincronia con il loro ciclo naturale. Alle temperature intermedie (da 22 a 26 °C) la prepupa sviluppa più

rapidamente (Kemp e Bosch 2005; Maeta et al. 2006; questo studio). L'aumento del periodo prepupale osservato alle temperature più calde (29 e 32°C), sia nella popolazione precoce che in quella tardiva (Kemp e Bosch 2005), potrebbe ritardare l'arrivo in adulto nelle popolazioni esposte ad estati particolarmente calde.

Le popolazioni del nord dello Utah, che volano tardi in primavera (aprile-maggio), raggiungono lo stato adulto a fine agosto in coincidenza con l'abbassamento delle temperature invernali (Bosch e Kemp 2000). Nelle aree più calde di latitudini minori come nella California centrale, le popolazioni di *O. lignaria* volano precocemente in primavera (febbraio-marzo) e diventano adulte a fine settembre, sempre in coincidenza con l'abbassamento delle temperature (fig. 5.5 e tab. 5.1). In questo modo, in entrambe le popolazioni, viene evitato che l'adulto nel bozzolo sia esposto per un lungo periodo alle temperature calde di fine estate (pre-svernamento). Come dimostrato nel capitolo 1, un lungo pre-svernamento ha degli effetti negativi sulla sopravvivenza invernale. Confrontando la durata totale dello sviluppo delle due popolazioni di *O. lignaria* allevate alle stesse condizioni termiche (26 °C, 29 °C e 14:27 °C) emerge che le osmie del nord dello Utah impiegano dai 26 ai 50 giorni in meno rispetto alla popolazione della California. Sia per completare lo sviluppo larvale che quello di pupa, la popolazione precoce richiedeva significativamente più gradi-giorno di quella tardiva.

In condizioni naturali la dormienza prepupale in *Osmia* dura 1-3 mesi (Bosch e Kemp 2000, Bosch et al. 2000). A 20 °C, il 56% degli individui di *O. lignaria* della popolazione precoce non sono stati in grado di completare la diapausa prepupa in confronto al 23% della popolazione tardiva allevata a 18 °C. Risultati simili sono stati ottenuti in *O. cornuta* allevata a 25 °C, in cui il 12% della popolazione precoce (attiva a febbraio) non era in grado di pupare contro il 2% della popolazione tardiva (attiva a marzo) (Bosch 1994a). Dal confronto delle due popolazioni di *O. lignaria* allevate alle stesse condizioni artificiali di temperatura (26 °C, 29 °C e 14:27 °C), emerge che nella popolazione tardiva la durata della prepupa è circa il doppio di quella precoce. Risultati simili sono stati osservati anche nelle due specie europee di *Osmia* (*O. cornuta* e *O. rufa*) allevate a 21 °C, in cui la prepupa durava rispettivamente 65 e 30 giorni. Anche in questo caso la durata è in relazione con la distribuzione geografica e con l'inizio dell'attività di nidificazione. Infatti *O. cornuta* è più meridionale e inizia a nidificare circa un mese prima di *O. rufa* (Tasei 1973). In condizioni naturali le popolazioni di basse latitudini o che volano precocemente in primavera impiegano più di due mese per completare lo stato di prepupa contro approssimativamente un mese delle popolazioni di alte latitudini o che volano tardi in primavera (Bosch et al. 2000; questo studio). Quando una popolazioni

tardiva di *O. lignaria* del nord dello Utah era stata forzata artificialmente a volare presto in primavera (febbraio) per impollinare il mandorlo in California, la loro progenie esprimeva un breve periodo prepupale sia alle condizioni artificiali che in quelle della California (Bosch et al. 2000). Questi risultati suggeriscono una componente genetica per lo sviluppo della diapausa in *Osmia* e indicano un possibile adattamento alle condizioni climatiche locali (Ayres e Scriber 1994). La durata del periodo prepupale potrebbe anche essere influenzata da un effetto fenologico materno (Mousseau e Dingle 1991). Per esempio, lo sviluppo della diapausa potrebbe dipendere dalle condizioni del fotoperiodo che ha incontrato la generazione materna, come suggerito per *Megachile rotundata* (Parker e Tepedino 1982, Kemp e Bosch 2001). In uno studio non pubblicato, una popolazione tardiva di *O. lignaria* fu divisa in due gruppi. Il primo gruppo fu rilasciato in un mandorlo in febbraio, due mesi prima del suo normale periodo di volo, e il secondo gruppo fu rilasciato in un ciliegio in aprile, nel suo naturale periodo di volo (Bosch e Kemp, non pubblicato). Le progenie di entrambi i gruppi erano allevate alle stesse condizioni. In accordo con un possibile effetto materno, la durata della prepupa era significativamente più lunga nel primo gruppo, ma solo di 2-6 giorni, un periodo molto breve se confrontato con i due mesi di differenza nell'epoca di volo tra i due gruppi parentali.

Le differenze nel tasso di sviluppo tra le due popolazioni di *O. lignaria* di diversa origine geografica esposte alle stesse temperature sono molto più grandi nello stato di prepupa che in quello di larva o di pupa (fig. 5.5). Allo stesso tempo, in entrambe le popolazioni, la maggior parte delle variazioni tra gli individui nel momento di sviluppo in adulto è in relazione alla durata della prepupa. Quindi, la durata della diapausa prepupale è il meccanismo principale con il quale le popolazioni di *Osmia* sincronizzano il momento di sviluppo in adulto con l'abbassamento delle temperature in autunno-inverno. Questo meccanismo può essere definito adattativo solo se mostra un effetto positivo sulla fitness. Infatti se le popolazioni del nord o del sud non differiscono nella fitness quando incontrano le condizioni termiche del nord e del sud, allora non si può dire che queste differenze tra le popolazioni siano una risposta adattativa alle diverse condizioni climatiche (Bradshaw et al. 2000). I risultati di questo studio suggeriscono che le popolazioni di osmie sono adattate alle condizioni termiche locali. Infatti, allevando la popolazione tardiva dello Utah alle condizioni di basse latitudini, verrebbe esposta ad un lungo pre-svernamento con gravi conseguenze sulla mortalità invernale (capitolo 1). Viceversa le condizioni termiche del nord dello Utah non permettono alla popolazione precoce della California di completare la dormienza prepupale e

molti individui potrebbero essere “sorpresi” dall’abbassamento delle temperature autunnali prima di aver completato lo sviluppo in adulto. Infatti, secondo Taylor (1981), con l’aumentare delle latitudini aumenta la temperatura necessaria per ottenere il tasso massimo di sviluppo. Anche le condizioni dello svernamento variano fortemente in base alle latitudini per cui in futuro sarà necessario confrontare l’effetto dello svernamento sulle due popolazioni.

Osmia lignaria è un ottimo impollinatore di piante di interesse agrario, alternativo all’ape domestica (*Apis mellifera*) (Torchio 1976, 2003; Bosch e Kemp 2001; Bosch et al. 2006). Dal punto di vista applicativo i nostri risultati dimostrano che un sistema gestionale di osmie, da utilizzare per l’impollinazione, deve tener conto di queste differenze fenologiche tra popolazioni di aree geografiche diverse. La sincronizzazione del ciclo biologico delle osmie con le variazioni stagionali ha un effetto importante non solo sulla loro sopravvivenza, ma anche sul loro utilizzo come impollinatori. Soprattutto per quelle colture che hanno un breve periodo di fioritura, è importante sincronizzare la fuoriuscita dal bozzolo delle osmie in primavera con la fioritura della coltura target da impollinare (capitolo 2).

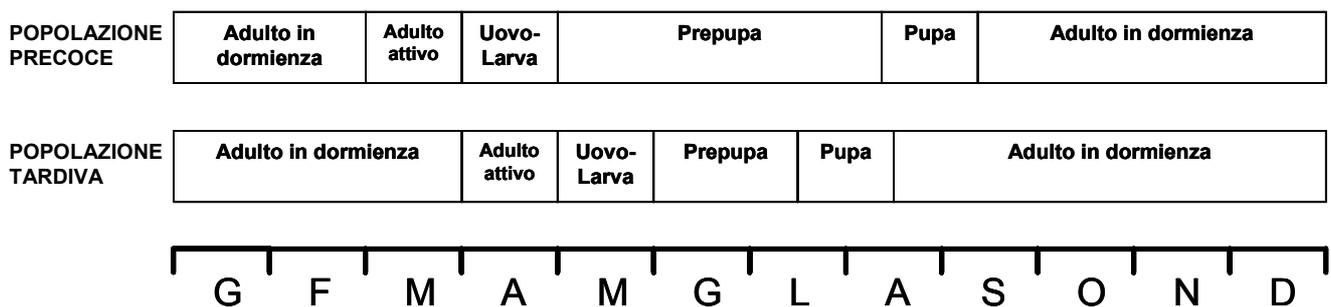


Figura 5.5 Fenologia approssimativa dello sviluppo in popolazioni precoci e tardive di *Osmia lignaria*.

Tabella 5.2 Durata (in giorni) degli stadi di sviluppo di maschi e femmine di *O. lignaria* di San Luis Obispo, CA (Popolazione Precoce) allevati a diversi regimi di temperatura.

Trattamento	Sesso	Uovo-Larva		Prepupa		Pupa		Uovo-adulto	
		n	Media \pm ES	n	Media \pm ES	n	Media \pm ES	n	Media \pm ES
20 °C	♂	36	40,75 \pm 0,60	16	56,75 \pm 3,32	16	44,63 \pm 1,94	16	141,38 \pm 3,40
	♀	30	42,60 \pm 0,43	6	62,17 \pm 7,05	5	52,20 \pm 1,50	7	166,86 \pm 10,40
26 °C	♂	33	24,06 \pm 0,55	26	50,54 \pm 1,74	8	26,25 \pm 0,88	8	99,75 \pm 4,37
	♀	28	26,93 \pm 0,56	25	53,24 \pm 1,64	6	33,83 \pm 3,15	5	112,80 \pm 5,20
29 °C	♂	30	20,67 \pm 0,43	32	62,53 \pm 1,24	32	20,22 \pm 0,40	30	103,27 \pm 1,52
	♀	32	24,78 \pm 0,43	29	63,34 \pm 1,47	13	25,08 \pm 0,67	13	116,38 \pm 2,21
14:27 °C	♂	34	29,09 \pm 0,58	34	43,03 \pm 1,32	34	25,26 \pm 0,29	33	96,91 \pm 1,58
	♀	33	32,48 \pm 0,52	33	45,91 \pm 1,57	33	28,33 \pm 0,37	33	106,73 \pm 1,77

Tabella 5.3 Durata (in giorni) degli stadi di sviluppo di maschi e femmine di *O. lignaria* di Logan, UT (Popolazione tardiva) allevati a diversi regimi di temperatura (modificato da Bosch e Kemp 2000).

Trattamento	Sesso	Uovo-Larva		Prepupa		Pupa		Uovo-adulto	
		n	Media \pm ES	n	Media \pm ES	n	Media \pm ES	n	Media \pm ES
18 °C	♂	56	38,73 \pm 0,34	47	34,94 \pm 1,33	44	48,64 \pm 1,04	44	122,55 \pm 1,39
	♀	44	40,77 \pm 0,37	22	38,45 \pm 2,04	20	47,85 \pm 0,94	20	128,25 \pm 2,49
22 °C	♂	60	24,53 \pm 0,23	53	29,13 \pm 1,15	48	32,38 \pm 0,54	48	84,77 \pm 1,13
	♀	45	27,49 \pm 0,24	41	29,20 \pm 1,10	41	33,15 \pm 0,59	41	90,17 \pm 1,14
26 °C	♂	60	19,57 \pm 0,27	58	27,76 \pm 0,95	58	23,67 \pm 0,51	58	70,97 \pm 1,01
	♀	48	21,08 \pm 0,38	42	30,76 \pm 1,23	40	24,68 \pm 0,64	40	76,10 \pm 1,25
29 °C	♂	64	17,17 \pm 0,24	62	26,69 \pm 0,85	60	18,60 \pm 0,53	60	62,55 \pm 1,29
	♀	46	19,65 \pm 0,30	39	27,90 \pm 1,30	38	19,42 \pm 0,83	37	66,35 \pm 1,39
14:27 °C	♂	58	23,02 \pm 0,24	56	18,04 \pm 0,71	54	28,22 \pm 0,52	54	69,31 \pm 0,83
	♀	45	25,42 \pm 0,26	42	16,71 \pm 0,60	42	28,71 \pm 0,47	42	70,74 \pm 0,79

Bibliografia

- Ando Y. (1983). Diapause and geographic variation in a leaf beetle. In: Diapause and Life Cycle Strategies in Insects (eds. Brown V. K. and Hodek I.).
- Asensio E. (1984). *Osmia (Osmia) cornuta* Latr. pollinisateur potentiel des arbres fruitiers en Espagne (Hymenoptera, Megachilidae). Fifth International Symposium on Pollination, Versailles, France. INRA. pp. 461-465.
- Ayres P. M. e Scriber J. M. (1994). Local adaptation to regional climates in *Papilio canadensis* (Lepidoptera: Papilionidae). Ecological Monographs 64: 465-482.
- Beekman M. e van Stratum P. (2000). Does the diapause experience of bumblebee queens *Bombus terrestris* affect colony characteristics? Ecological Entomology 25: 1-6.
- Beekman M., van Stratum P. e Lingeman R. (1998). Diapause survival and post-diapause performance in bumblebee queens (*Bombus terrestris*). Entomologia Experimentalis et Applicata 89: 207-214.
- Bosch J. (1994a). Improvement of field management of *Osmia cornuta* (Latreille) (Hymenoptera, Megachilidae). Apidologie 25: 71-83.
- Bosch J. (1994b). The nesting behaviour of the mason bee *Osmia cornuta* (Latr.) with special reference to its pollinating potential (Hymenoptera, Megachilidae). Apidologie 25: 84-93.
- Bosch J. e Blas M. (1994). Foraging behaviour e pollinating efficiency of *Osmia cornuta* and *Apis mellifera* on almond (Hymenoptera: Megachilidae, Apidae). Applied Entomology and Zoology 29: 1-9.
- Bosch J. e Kemp W. P. (2000). Development and emergence of the orchard pollinator, *Osmia lignaria* (Hymenoptera, Megachilidae). Environmental Entomology 29: 8-13.
- Bosch J. e Kemp W. P. (2001). How to manage the blue orchard bee as an orchard pollinator, Sustainable Agriculture Network. Beltsville, Maryland.
- Bosch J. e Kemp W. P. (2002). Developing and establishing bee species as crop pollinators: the example of *Osmia* spp. (Hymenoptera: Megachilidae) and fruit trees. Bulletin of Entomological Research 92: 3-16.
- Bosch J. e Kemp W. P. (2003). Effect of wintering duration and temperature on survival and emergence time in the orchard pollinator *Osmia lignaria* (Hymenoptera: Megachilidae). Environmental Entomology 32: 711-716.

- Bosch J. e Kemp W. P. (2004). Effect of pre-wintering and wintering temperature regimes on weight loss, survival, and emergence time in the mason bee *Osmia cornuta* (Hymenoptera: Megachilidae). *Apidologie* 35: 469-479.
- Bosch J. e Vicens N. (2002). Body size as an estimator of production costs in a solitary bee. *Ecological Entomology* 27: 129-137.
- Bosch J. e Vicens N. (2005). Sex allocation in the solitary bee *Osmia cornuta*: do females behave in agreement with Fisher's theory? *Behavioral Ecology and Sociobiology* 59: 124-132.
- Bosch J. e Vicens N. (2006). Relationship between body size, provisioning rate, longevity and reproductive success in females of the solitary bee *Osmia cornuta*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 60: 26-33.
- Bosch J., Kemp W. P. e Peterson P. S. (2000). Management of *Osmia lignaria* (Hymenoptera: Megachilidae) populations for almond pollination: Methods to advance bee emergence. *Environmental Entomology* 29: 874-883.
- Bosch J., Maeta Y. e Rust R. (2001). A phylogenetic analysis of nesting behavior in the genus *Osmia* (Hymenoptera: Megachilidae). *Annals of the Entomological Society of America* 94: 617-627.
- Bosch J., Kemp W. P. e Trostle G. (2006). Bee populations return and cherry yields in an orchard pollinated with *Osmia lignaria* (Hymenoptera: Megachilidae). *Journal of Economic Entomology* 99(2): 408-413.
- Bradshaw W. E., Armbruster P. A. e Holzapfel C. M. (1998). Fitness consequences of hibernal diapause in the pitcher-plant mosquito, *Wyeomyia smithii*. *Ecology* 79(4): 1458-1462.
- Bradshaw W. E., Fujiyama S. e Holzapfel C. M. (2000) Adaptation to the thermal climate of North America by the pitcher-plant mosquito, *Wyeomyia smithii*. *Ecology* 81(5): 1262-1272.
- Brasse D. (2001). Overview about the poisoning incidents in honeybee populations and their clarification in Germany from 1996 to 1998, in: Belzunces L., Pelissier C., Lewis G. (eds.) Hazards of pesticides to bees, Les Colloques, n. 98, INRA, Paris, France, pp. 141-147.
- Buckner J. S. e Hagen M. M. (2003). Triacylglycerol and phospholipids fatty acids of the silverleaf whitefly: composition and biosynthesis. *Archives of Insect Biochemistry e Physiology* 53: 66-79.
- Buckner J. S., Kemp W. P. e Bosch J. (2004). Characterization of triacylglycerols from overwintering prepupae of the alfalfa pollinator *Megachilidae rotundata* (Hymenoptera: Megachilidae). *Archives of Insect Biochemistry e Physiology* 57: 1-14.

- Carreck N. L. e Williams I. H. (1997). Observations on two commercial flower mixtures as food sources for beneficial insects in the UK. *Journal of Agricultural Science, Cambridge* 128: 397-403.
- Chang Y.-F., Tauber M. J. e Tauber C. A. (1996). Reproduction and quality of F₁ offspring in *Chrysoperla carnea*: differential influence of quiescence, artificial-induced diapause, and natural diapause. *Journal of Insect Physiology* 42 (6): 521-528.
- Chapman R. F. (1998). *The Insects. Structure and Function*. 4th Edition. Cambridge University Press.
- Chown S. L. e Gaston K. J. (1999). Exploring links between physiology and ecology at macro-scales: the role of respirometry in metabolism in insects. *Biology Review* 74: 87-120.
- Danks H. V. (1987). *Insect dormancy: an ecological perspective*, Biological Survey of Canada (Terrestrial Arthropods), Ottawa, Ontario, Canada.
- Delaplane K.S. e Mayer D.F. (2000). *Crop pollination by bees*, CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Denlinger D.L. (1991). Relationship between cold hardiness and diapause. In: *Insects at Low Temperature* (Edited by Lee Jr. R. E. and Denlinger D. L.), pp. 174–198. Chapman and Hall, New York.
- Dingle H. (1986). The evolution of insect life cycle syndromes. In: *The Evolution of Insect Life Cycles*. (Edited by F. Taylor and R. Karban), pp 187-203. Springer-Varlog N. Y.
- Duchateau M. J. (1989). Ovarian development and egg laying in workers of *Bombus terrestris*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 51: 199-213.
- Eijs I. E. M. e van Alphen J. J. M. (1999). Life history correlations: why are hymenopteran parasitoids an exception? *Ecology Letters* 2: 27-35.
- Ellers J. e van Alphen J. J. M. (1997). Life history evolution in *Asobara tabida*: plasticity in allocation of fat reserves to survival and reproduction. *Journal of Evolutionary Biology* 10: 771-785.
- Ellers J. e van Alphen J. J. M. (2002). A trade-off between diapause duration and fitness in female parasitoids. *Ecological Entomology* 27: 279-284.
- Fletcher M. e Barnett L. (2003). Bee pesticide poisoning incidents in the United Kingdom, *Bulletin of Insectology* 56 (1): 141-145.
- Folch J., Lee M. e Slone-Stanley G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *Journal of Biological Chemistry*, 226: 497-509.

- Free J. B. (1993). Insect pollination of crops, 2nd edition. Academic Press, London, UK
Kearns C. A.
- Frohlich D. R. e Tepedino V. J. (1986). Sex ratio, parental investment, and interparent variability in nesting success in a solitary bee. *Evolution* 40(1): 142-151.
- Gilmour D. (1965). The metabolism of insects. W. H. Freeman and Company. San Francisco.
- Gomi T. (1996) Regional differences in diapause and post-diapause development of the fall webworm, *Hyphantria cunea* Drury (Lepidoptera: Arctiidae). *Applied Entomology and Zoology* 31: 462-464.
- Gôukon K., Maeta Y. e Sakagami S. F. (1987). Seasonal changes in ovarian state in a eusocial halictine bee, *Lasioglossum duplex*, based on stages of the oldest oocytes in each ovariole (Hymenoptera: Halictidae). *Researches on Population Ecology* 29: 255-269.
- Guedot C., Pitt-Singer T. L., Buckner J. S., Bosch J. e Kemp W. P. (2006). Olfactory cues and nest recognition in the solitary bee *Osmia lignaria*. *Physiological Entomology* 31: 110-119.
- Han E.-N. e Bauce E. (1997). Effects of early temperature exposure on diapause development of spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae). *Environmental Entomology* 26(2): 307-310.
- Han E.-N. e Bauce E. (1998). Timing of diapause initiation, metabolic changes and overwintering survival of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. *Ecological Entomology* 23: 160-167.
- Higley L. G., Pedigo L. P. e Ostlie K. R. (1986). DEGDAY: A program for calculating degree-days, and assumptions behind the degree-day approach. *Environmental Entomology* 15: 999-1016.
- Hodek I. (1983). Role of environmental factors and endogenous mechanisms in the seasonality of reproduction in insectes diapausing as adults. In: V. K. Brown & I. Hodek (eds), *Diapause e Life Cycle Strategies in Insects*. Dr W. Junk, The Hague, pp. 9-33.
- Hodek I. e Hodková M. (1988). Multiple role of temperature during insect diapause: a review. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 49: 153-165.
- Hoover S. E. R., Higo H. A. e Winston M. L. (2006). Worker honey bee ovary development: seasonal variation and the influence of larval and adult nutrition. *Journal of Comparative Physiology. B* 176: 55-63.
- Houghton J. T. et al. (2001). In: *Climate Change 2001: The Science of Climate Change* (Cambridge University Press, New York 2001).
- Irwin T. J. e Lee R. E. (2000). Mild winter temperatures reduce survival and potential fecundity of the goldenrod gall fly, *Eurosta solidaginis* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Insect Physiology* 46: 655-661.

- Ishihara M. e Shimada M. (1995). Trade-off in allocation of metabolic reserves: effects of diapause on egg production and adult longevity in a multivoltine bruchid, *Kytorhinus sharpianus*. *Functional Ecology* 9: 618-624.
- Jean C., Coderre D. e Tourneur J.-C. (1990). Effects of temperature and substrate on survival and lipid consumption of hibernating *Coleomegilla maculata lengi* (Coleoptera: Coccinellidae). *Environmental Entomology* 19(6): 1657-1662.
- Jervis M. A. e Ferns P. N. (2004). The timing of egg maturation in insects: ovigeny index and initial egg load as measures of fitness and of resource allocation. *Oikos* 107: 449-460.
- Johansen C. A. e Eves J. D. (1973). Effects of Chilling, Humidity and Seasonal Conditions on Emergence of the Alfalfa Leafcutting Bee. *Environmental Entomology* 2(1): 23-26.
- Kemp W. P. e Bosch J. (2001). Postcocooning temperatures and diapause in the alfalfa pollinator *Megachile rotundata* (Hymenoptera: Megachilidae). *Annals of the Entomological Society of America* 94(2): 244-250.
- Kemp W. P. e Bosch J. (2005). Effect of temperature on *Osmia lignaria* (Hymenoptera: Megachilidae) prepupa-adult development, survival, and emergence. *Journal of Economic Entomology* 98(6): 1917-1923.
- Kemp W. P., Bosch J. e Dennis B. (2004). Oxygen consumption during the life cycle of the prepupa-wintering bee *Megachile rotundata* (F.) and the adult-wintering bee *Osmia lignaria* Say (Hymenoptera: Megachilidae). *Annals of the Entomological Society of America* 97: 161-170.
- Kevan P.G. e Philips P. (2001). The economic impacts of pollinator declines: an approach to assessing the consequences. *Conservation Ecology* 5 (1) <http://www.consecol.org/vol5/iss1/art8>.
- Kroon A. e Veenendaal R. L. (1998). Trade-off between diapause and other life-history traits in the spider mite *Tetranychus urticae*. *Ecological Entomology* 23: 298-304.
- Krunic M.D. e Stanisavljevic L. (2006). The biology of the European orchard bee *Osmia cornuta*. Izdavac, Belgrade.
- Kuchlein J. H. e Ellis W. N. (1997). Climate-induced changes in the microlepidoptera fauna of the Netherlands and the implications for nature conservation. *Journal of Insect Conservation* 1: 73-80.
- Kurihara M., Maeta Y., Chiba K. e Sakagami S. F. (1981). The relation between ovarian conditions and life cycle in two small carpenter bees, *Ceratina flavipes* and *C. japonica* (Hymenoptera, Anthophoridae). *Journal of the Faculty of Agriculture, Iwate University* 15(3): 131-153.
- Ladurner E., Santi F., Maccagnani B. e Maini S. (2002). Pollination of caged hybrid seed red rape with *Osmia cornuta* e *Apis mellifera* (Hymenoptera Megachilidae and Apidae). *Bulletin of Insectology* 55: 9-11.

- Ladurner E., Recla L., Wolf M., Zelger R. e Burgio G. (2004). *Osmia cornuta* (Hymenoptera: Megachilidae) densities required for apple pollination: a cage study. *Journal of Apicultural Research* 43: 118–122.
- Lamb R. J. (1992). Developmental rate of *Acyrtosiphon pisum* (Homoptera: Aphididae) at low temperatures: implications for estimating rate parameters for insects. *Environmental Entomology* 21: 10-19.
- Leather S. R., Walters K. F. A. e Bale J. S. (1993). *The ecology of insect overwintering*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Levin M. D. (1966). Biological notes on *Osmia lignaria* and *Osmia californica* (Hymenoptera: Apoidea, Megachilidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* 39: 524-535.
- Maccagnani B., Ladurner E., Tesoriero D., Sgolastra F. e Burgio G. (2003a). The use of *Osmia cornuta* (Latreille) (Hymenoptera Megachilidae) for pear pollination: a reason to adopt low impact farming system in a landscape management perspective. *Landscape management for Functional Biodiversity. IOBC wprs Bulletin* 26(4): 101-106.
- Maccagnani B., Ladurner E., Santi F. e Burgio G. (2003b). *Osmia cornuta* (Hymenoptera, Megachilidae) as a pollinator of pear (*Pyrus communis*): fruit- and seed-set. *Apidologie* 34, 207-216.
- Maeta Y. (1978). Comparative studies on the biology of the bees of the genus *Osmia* in Japan, with special reference to their management for pollination of crops (Hymenoptera, Megachilidae). *Bulletin of the Tohoku National Agricultural Experiment Station* 57: 1-221 (in Giapponese).
- Maeta Y. (1990). Utilization of wild bees. *Farming Japan* 24: 13-19.
- Maeta Y. e Kurihara M. (1971). Anatomical and histological studies on the oogenesis and oosorption of terminal oocytes within the genus *Osmia*. *Kontyû* 39: 138-158.
- Maeta Y. e Kitamura T. (1974). How to manage the Mame-ko bee (*Osmia cornifrons* Radoszkowski) for pollination of fruit crops. Naganoshi, Ask Co Ltd (in Giapponese).
- Maeta Y., Kurihara M. e Hara K. (1981). Biological e histological studies on the ovarian development of the European pine sawfly *Neodiprion sertifer* GEOFFROY (Hymenoptera, Diprionidae). *Kontyû* 49(4): 577-596.
- Maeta, Y. Nakanishi K., Fujii K. e Kitamura K. (2006). Exploitation of systems to use a univoltine Japanese mason bee, *Osmia cornifrons* (Radoszkowski), throughout the year for pollination of greenhouse crops (Hymenoptera: Megachilidae). *Chugoku Kontyû* 20: 1-17
- Maus C., Curé G. e Schmuck R. (2003). Safety of imidacloprid seed dressings to honey bees: a comprehensive overview e compilation of the current state of knowledge. *Bulletin of Insectology* 56: 51-57.

- Michener, C. D. (2000). The bees of the world. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland.
- Miles J. E., Bale J. S. e Hodkinson I. D. (1997). Effects of temperature elevation on the population dynamics of the upland heather psyllid *Strophingia ericae* (Curtis) (Homoptera: Psylloidea). *Global Change Biology* 3: 291-297.
- Monzón, V. H. (1998). Biología de *Osmia cornuta* Ltr. (Hymenoptera, Megachilidae) y su utilización como polinizador de peral (*Pyrus communis*). Ph.D. dissertation, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain.
- Monzón V. H., Bosch J. e Retana J. (2004). Foraging behavior and pollinating effectiveness of *Osmia cornuta* (Hymenoptera: Megachilidae) and *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) on “Comice” pear. *Apidologie* 35: 575-585.
- Mousseau T. A. e Dingle H. (1991). Maternal effects in insect life histories. *Annual Review of Entomology* 36: 511-534.
- Musolin D. L. e Numata H. (2003). Timing of diapause induction and its life-history consequences in *Nezara viridula*: is it costly to expand the distribution range? *Ecological Entomology* 28: 694-703.
- Nomura M. e Ishikawa Y. (2000). Biphasic effect of low temperature on completion of winter diapause in the onion maggot, *Delia antiqua*. *Journal of Insect Physiology* 46: 373-377.
- Ohtsu T., Kimura M. T. e Hori S. H. (1995). The influence of eclosion timing on winter survival and triacylglycerol accumulation in four temperate species of *Drosophila*. *Physiological Entomology* 20: 248-252.
- Parker F. D. e Tepedino V. J. (1982) Maternal influence on diapause in the alfalfa leafcutting bee (Hymenoptera: Megachilidae). *Annals of the Entomological Society of America* 75: 407-410.
- Parsons P. A. (1993). The importance and consequences of stress in living e fossil populations: from life-history variation to evolutionary change. *American Naturalist* 142: S5-S20.
- Parsons P. A. (1996). Stress, resources, energy balances, and evolutionary change. *Evolutionary Biology* 29: 39-72.
- Philips J. K. e Klostermeyer E. C. (1978). Nesting behaviour of *Osmia lignaria propinqua* Cresson (Hymenoptera: Megachilidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* 51: 91-108.
- Pruess K. P. (1983). Day-degree methods for pest management. *Environmental Entomology* 12: 613-619.
- Richards K. W. (1994). Ovarian development in the alfalfa leafcutter bee, *Megachile rotundata*. *Journal of Apicultural Research* 33: 199-203

- Richards K. W., Whitfield G. H. e Schaalje G. B. (1987). Effects of temperature e duration of winter storage on survival and period of emergence for the alfalfa leafcutter bee (Hymenoptera: Megachilidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* 60: 70-76.
- Roy D. B. e Sparks T. H. (2000). Phenology of British butterflies and climate change. *Global Change Biology* 6: 407-416.
- Rust R. W. (1974). The systematics and biology of the genus *Osmia*, subgenera *Osmia*, *Chalcosmia* and *Cephalosmia* (Hymenoptera: Megachilidae). *Wasmann Journal of Biology* 32: 1-93.
- Sawyer A. J., Tauber M. J., Tauber C. A. e Ruberson J. R. (1993). Gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) egg development: a simulation analysis of laboratory and field data. *Ecological Modelling* 66: 121-155.
- Sihag R. C. (1986). Why does the alfalfa pollinating sub-tropical bee *Megachile flavipes* make false nesting? *Zoologischer Anzeiger* 217: 228-233.
- Smeets P. e Duchateau M. J. (2003). Longevity of *Bombus terrestris* workers (Hymenoptera: Apidae) in relation to pollen availability, in the absence of foraging. *Apidologie* 34: 333-337.
- Southwick E.E. e Southwick L. (1992). Estimating the economic value of honey bees (Hymenoptera: Apidae) as agricultural pollinators in the United States. *Journal of Economic Entomology* 85: 621-633.
- Stephan W. P. e Undurraga J. M. (1976). X-radiography, an analytical tool in population studies of the leafcutter bee, *Megachile pacifica*. *Journal of Apicultural Research* 15: 81-87.
- Strohm E. (2000). Factors affecting body size and fat content in a digger wasp. *Oecologia* 123: 184-191.
- Sugiura N. e Maeta Y. (1989). Parental investment and offspring sex ratio in a solitary mason bee, *Osmia cornifrons* (Radoszkowski) (Hymenoptera, Megachilidae). *Japanese Journal of Entomology* 57(4): 861-875.
- Tasei J. N. (1973). Observations sur le development d'*Osmia cornuta* Latr. et *Osmia rufa* L. (Hymenoptera Megachilidae). *Apidologie* 3: 295-315.
- Tauber M. J., Tauber C. A. e Sasaki M. (1986). *Seasonal Adaptations of Insects*. Oxford University Press, New York.
- Taylor F. (1980). Timing in the life histories of insects. *Theoretical population biology* 18(1): 112-124.
- Taylor F. (1981). Ecology and evolution of physiological time in insects. *The American Naturalist* 117(1): 1-23.

- Tepedino V. J. e Torchio P. F. (1982). Phenotypic variability in the nesting success among *Osmia lignaria propinqua* females in a glasshouse environment (Hymenoptera: Megachilidae). *Ecological Entomology* 7: 453-462.
- Tepedino V. J. e Torchio P. F. (1989). The influence of nest-hole selection on sex ratio and progeny size in *Osmia lignaria propinqua* females in a glasshouse environment (Hymenoptera: Megachilidae). *Annals of the Entomological Society of America* 82: 355-360.
- Tepedino V. J. e Torchio P. F. (1994). Founding and usurping: equally efficient paths to nesting success in *Osmia lignaria propinqua* (Hymenoptera: Megachilidae). *Annals of the Entomological Society of America* 87: 946-953.
- Torchio P. F. (1976). Use of *Osmia lignaria* Say (Hymenoptera: Apoidea: Megachilidae) as a pollinator in an apple and prune orchard. *Journal of the Kansas Entomological Society* 49: 475-482.
- Torchio P. F. (1981). Field experiments with *Osmia lignaria propinqua* Cresson as a pollinator in almond orchards: II, 1976 studies (Hymenoptera: Megachilidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* 54: 824-836.
- Torchio P. F. (1982). Fields experiments with *Osmia lignaria propinqua* Cresson as a pollinator in almond orchards: III, 1977 studies (Hymenoptera: Megachilidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* 55: 101-116.
- Torchio P. F. (1984). Field experiments with the pollinator species, *Osmia lignaria propinqua* Cresson (Hymenoptera: Megachilidae) in apple orchards: III, 1977 studies. *Journal of the Kansas Entomological Society* 57: 517-521.
- Torchio P.F. (1985). Field experiments with the pollinator species, *Osmia lignaria propinqua* Cresson in apple orchards: V, (1979-1980) methods of introducing bees, nesting success, seed count, fruit yields (Hymenoptera: Megachilidae). *Journal of the Kansas Entomology Society* 58: 448-464.
- Torchio P. F. (1989). In-nest biologies and development of immature stages of three *Osmia* species (Hymenoptera: Megachilidae). *Annals of the Entomological Society of America* 82: 599-615.
- Torchio P. F. (2003). The development of *Osmia lignaria* as a managed pollinator of apple and almond crops: a case history. In: For non-native crops, whence pollinators of the future? K. Stickler and J. H. Cane (Eds). pp. 67-84.
- Torchio P. F. and Bosch J. (1992). Biology of *Tricrania stansburyi*, a meloid beetle cleptoparasite of the bee *Osmia lignaria propinqua* (Hymenoptera: Megachilidae). *Annals of the Entomological Society of America* 85: 713-721.
- Torchio P. F. e Tepedino V. J. (1982). Parsivoltinism in three species of *Osmia* bees. *Psyche* 89: 221-238.

- Traoré L., Pilon J.-G., Fourinier F. e Boivin G. (2006). Adaptation of the development process of *Anaphes victus* (Hymenoptera : Mymaridae) to local climatic conditions across North America. *Annals of the Entomological Society of America* 99(6): 1121-1126.
- van der Steen J. e de Ruijter A. (1991). The management of *Osmia rufa* L. for pollination of seed crops in greenhouses. *Proceedings of Experimental and Applied Entomology* 2:137-141.
- Vicens N. e Bosch J. (2000a). Pollinating efficacy of *Osmia cornuta* and *Apis mellifera* (Hymenoptera: Megachilidae, Apidae) on 'Red Delicious' apple. *Environmental Entomology* 29(2): 235-240.
- Vicens N. e Bosch J. (2000b). Weather-dependent pollinator activity in an apple orchard, with special reference to *Osmia cornuta* and *Apis mellifera* (Hymenoptera: Megachilidae and Apidae). *Environmental Entomology* 29(3): 413-420.
- Visser M. E. e Holleman L. J. M. (2001). Warmer springs disrupt the synchrony of oak and winter moth phenology. *Proceeding of the Royal Society B* 268: 289-294.
- Wagner T. L., Wu H-I., Sharpe P. J. Schoolfield e Coulson R. N. (1984). Modelling insect development rates: a literature review and application of a biophysical model. *Annals of the Entomological Society of America* 77: 208-225.
- Wheeler D. (1996). The role of nourishment in oogenesis. *Annual Review of Entomology* 41: 407-431.
- Wigglesworth, V. B. (1972). *The principles of insect physiology*. Methuen, London, England
- Williams I.H. (1996). Aspect of bee diversity and crop pollination in the European Union. In: Matheson A., Buchmann S. L., O'Toole C., Westrich P., Williams I. H. (eds.) *The Conservation of Bees*, Academic Press, London, UK, pp. 63-80.
- Williams I. H. and Christian D. G. (1991). Observations on *Phacelia tanacetifolia* Bentham (Hydrophyllaceae) as a food plant for honey bees and bumble bees. *Journal of Apicultural Research* 30: 3-12.
- Yamada M., Oyama N., Skita N., Shirasaki S. e Tsugawa C. (1971). The ecology of the megachilid bee *Osmia cornifrons* and its utilization for apple pollination. *Bulletin of the Aomori Apple Experiment Station* 15: 1-80 (in Giapponese).

Ringraziamenti

Durante questi tre anni di Dottorato ho avuto la fortuna e il piacere di conoscere e di lavorare con molte persone che mi hanno aiutato nella realizzazione di questa tesi.

Vorrei innanzi tutto ringraziare il Prof. **Stefano Maini**, mio tutore, il Prof. **Piero Baronio**, coordinatore del corso di Dottorato, e la dott.ssa **Luisa Dindo** per il loro sostegno scientifico e non solo. Un solo grazie non può bastare a **Jordi Bosch**, mio cotutore, per i suoi preziosi consigli, per la sua infinita disponibilità e per i suoi insegnamenti che mi ha dato durante tutti questi anni. Un grazie particolare va a tutte quelle persone che mi hanno aiutato e sostenuto durante la mia permanenza al Logan Bee Lab. Ringrazio in modo particolare **Bill Kemp**, capo del Logan Bee Lab, per aver sempre creduto in me e per avermi ospitato nel suo laboratorio. Ringrazio inoltre **Glen Trostle** e **Shaila Kalaskar** per il loro prezioso aiuto nella realizzazione delle prove e **Theresa Pitts-Singer** e **Jim Buckner** per i loro consigli. Un grazie a **tutti gli altri del Bee Lab** che mi hanno accolto positivamente nel loro laboratorio. Grazie infinite ad **Edith Ladurner** che mi è sempre stata vicina e mi ha sempre aiutato nei momenti di bisogno. Vorrei inoltre ringraziare **Claudio Porrini**, per i suoi insegnamenti sul “mondo delle api” e per avermi aiutato nei momenti di difficoltà, e i miei colleghi di lavoro a Bologna: **Piotr Medrzycki**, **Donato Tesoriero** e **Serena Alessandrini**.

Ringrazio infine tutti i miei **colleghi e amici dell'area di Entomologia di Bologna** e la **mia famiglia** per avermi sostenuto in questi anni.