

# INDICE

## 1. Introduzione e scopo

1.1 Mutualismo tra pianta e formica.....	1
1.2 Nettàri e nettare extrafiore.....	3
1.2.1 Produzione e secrezione del nettare extrafiore.....	5
1.3 <i>Vicia faba</i> .....	7
1.3.1 Il nettàrio extrafiore della <i>Vicia faba</i> .....	9
1.4 Elettrofisiologia e segnali elettrici nelle piante.....	10
1.4.1 Il segnale elettrico.....	11
1.4.2 Tipi di segnale elettrico.....	12
1.4.2.1 Potenziale d'azione (AP).....	12
1.4.2.2 Variazione di potenziale (VP).....	13
1.5 Composti organici e terpeni.....	15
1.6 Lipidi.....	16
1.7 Formiche e lotta biologica.....	18
1.8 Scopo del progetto.....	20

## 2. Materiali e metodi

2.1 Materiale vegetale e condizioni di crescita.....	23
2.2 Indagini elettrofisiologiche del nettàrio extrafiore.....	23
2.2.1 Acquisizione a singolo elettrodo dei segnali elettrici extracellulari indotti da uno stimolo meccanico.....	24
2.2.2 Acquisizione a singolo elettrodo dei segnali elettrici extracellulari: prove supplementari..	25
2.2.3 Acquisizione a doppio elettrodo dei segnali elettrici extracellulari indotti da uno stimolo meccanico.....	27

2.2.4	Acquisizione dei segnali elettrici extracellulari spontanei tramite Multielectrode Array Methodology.....	27
2.2.5	Applicazione degli inibitori nell'acquisizione a singolo elettrodo dei segnali elettrici extracellulari.....	28
2.2.6	Applicazione degli inibitori nell'acquisizione dei segnali elettrici extracellulari spontanei..	30
2.2.7	Monitoraggio della resistenza intracellulare.....	30
2.3	Indagini di microscopia.....	31
2.3.1	Analisi istochimica.....	31
2.3.2	Analisi ultrastrutturale.....	32
2.3.3	Acquisizioni al microscopio confocale.....	33
2.3.3.1	Analisi delle proprietà bioelettriche del nettario extrafiore.....	33
2.3.3.2	Analisi dei lipidi.....	34
2.3.3.3	Analisi dei terpeni.....	35
2.4	Quantificazione dei terpeni per via spettrofotometrica.....	35
2.5	Indagini morfologiche e fisiologiche.....	37
2.5.1	Disegno sperimentale.....	37
2.5.2	Campionamento e determinazione dei dati morfologici e fisiologici.....	38
2.6	Contributo della candidata alle attività sperimentali.....	38

### 3. Risultati

3.1	Indagini elettrofisiologiche.....	40
3.1.1	Acquisizione a singolo elettrodo dei segnali elettrici extracellulari indotti da uno stimolo meccanico.....	40
3.1.2	Acquisizione a singolo elettrodo dei segnali elettrici extracellulari: prove supplementari..	41
3.1.3	Acquisizione a doppio elettrodo dei segnali elettrici extracellulari indotti da uno stimolo meccanico.....	41
3.1.4	Acquisizione dei segnali elettrici extracellulari spontanei tramite Multielectrode Array Methodology.....	42
3.1.5	Applicazione degli inibitori nell'acquisizione a singolo elettrodo dei segnali elettrici extracellulari.....	43

3.1.6 Applicazione degli inibitori nell'acquisizione dei segnali elettrici extracellulari spontanei....	45
3.1.7 Monitoraggio della resistenza intracellulare.....	46
3.1.8 Indagine sulle proprietà bioelettriche dei tessuti del nettario extrafiore al confocale.....	48
3.2 Analisi dei terpeni.....	51
3.2.1 Indagine istochimica.....	51
3.2.2 Quantificazione dei terpeni con microscopia confocale.....	52
3.2.3 Quantificazione dei terpeni con estrazione chimica.....	53
3.3 Anali al T.E.M.....	55
3.3.1 Caratterizzazione ultrastrutturale dei tricomi.....	55
3.4 Analisi dei lipidi.....	59
3.4.1 Quantificazione dei lipidi con microscopia confocale.....	59
3.5 Indagini morfo-fisiologiche delle piante.....	62

## 4. Discussione

4.1 La natura elettrica dei nettari extrafioreali.....	65
4.2 Fisiologia delle piante durante la simbiosi mutualistica.....	67
4.3 La natura biochimica ed ultrastrutturale dei nettari extrafioreali.....	69
4.3.1 Sostanze terpeniche.....	69
4.3.2 Caratterizzazione ultrastrutturale dei tricomi.....	70
4.3.3 Sostanze lipidiche.....	71
4.4 Analisi morfo-fisiologica delle piante.....	72
4.5 L'interazione pianta-formica.....	74

5. Conclusione.....	76
---------------------	----

6. Bibliografia.....	78
----------------------	----



# 1. Introduzione e scopo

## 1.1 Mutualismo tra pianta e formica

Tra le strategie ecologiche che più profondamente hanno influenzato la struttura degli ecosistemi naturali c'è il mutualismo, un rapporto vantaggioso bidirezionale tra due organismi viventi. La simbiosi mutualistica è il risultato di una lunghissima storia di co-evoluzione degli organismi interessati, che negli ultimi anni ha attirato sempre più l'attenzione di ecologisti, biologi evolutivisti e molecolari, i quali cercano di far luce sulle dinamiche evolutive che sottendono tale interazione e che hanno profondamente condizionato la biodiversità sulla Terra.

Ad oggi gli scienziati condividono l'ipotesi che ogni specie sia coinvolta, o lo è stata nella sua storia evolutiva, in una delle tante forme di mutualismo (Bronstein *et al.*, 2006). Basti pensare che l'80% delle specie vegetali e la maggior parte delle piante coltivate possono formare simbiosi micorriziche tanto che: *“è più facile elencare le famiglie di piante in cui non si conosce siano presenti piuttosto che compilare una lista di famiglie in cui esse sono state trovate”* (Gerdemann, 1968). E se quello tra piante e funghi è uno dei rapporti mutualistici più conosciuti, proprio perché la maggior parte delle specie vegetali di interesse agrario (per fare qualche esempio: cereali, leguminose, alberi da frutto, specie orticole, girasole, tabacco, cotone, canna da zucchero) formano micorrize arbuscolari (Gosling *et al.*, 2006), quello tra piante e insetti è uno dei più affascinanti e ancora oggi oggetto di numerose ricerche.

L'impollinazione, la dispersione dei semi e la difesa sono per le piante dinamiche maggiormente legate alla collaborazione con gli insetti. La stretta dipendenza che si viene a creare tra i due organismi comporta l'insorgenza di numerosi caratteri adattativi, affinando così le interazioni mutualistiche, rendendole specifiche se non a volte specie specifiche. Uno degli esempi più significativi dell'interazione tra pianta e insetto riguarda la difesa che alcune formiche attuano nei confronti di alcune piante. Si stima che le interazioni tra pianta e formica abbiano avuto origine nel Mesozoico, quando comparvero le prime linee omnivore di formiche che iniziarono ad orientare la propria dieta verso risorse di origine vegetale (Nelsen *et al.*, 2018). La transizione si rafforzò soprattutto nel Cenozoico, era in cui la dominanza ecologica delle Gimnosperme venne convertita nella dominanza delle Angiosperme. Le caratteristiche riproduttive delle piante da fiore favorirono infatti la nascita di nuove nicchie ecologiche che furono ben presto colonizzate da alcune specie di

animali tra le quali, appunto, determinati taxa di formiche (Nelsen *et al.*, 2018). Dagli studi di Delpino, influente botanico italiano della seconda metà dell'Ottocento, sappiamo che le Angiosperme svilupparono successivamente strutture che potessero attrarre le formiche e ricompensarle per la difesa che offrivano alla pianta. Le prime furono i nettari extrafloriali (EFNs), organi ghiandolari in grado di produrre e secernere un liquido viscoso e ricco di zuccheri, appetibile per le formiche. In seguito, si sviluppò un secondo adattamento mutualistico: il *domatium*, una piccola camera cava prodotta dalla pianta stessa per ospitare e offrire protezione agli insetti, acari e funghi. Quali sono, dunque, i vantaggi che gli organismi traggono da tale mutualismo? La presenza delle formiche sulla pianta garantisce una difesa indiretta contro altre specie di animali predatorie, ricompensata con la produzione di nettare extraflorale (Heil, 2008). L'efficacia della difesa delle formiche è stata ampiamente documentata nel corso del tempo. De la Fuente e Marquis (1999) dimostrarono come le piante di *Stryphnodendron microstachyum*, che ricevevano la visita delle formiche, presentavano meno danni alle foglie causati dalle larve di *Euclystis* sp. e un maggior sviluppo in altezza rispetto alle piante che non beneficiavano della visita delle formiche. Le specie *Macaranga triloba* e *Macaranga hosei* possono perdere fino al 70-80% dell'area fogliare totale se sono private della loro simbiosi mutualistica obbligatoria con le formiche del genere *Crematogaster* per un anno (Heil *et al.*, 2001). Anche le piante di *Hirtella physophora*, se private della loro simbiosi con le formiche *Allomerus decemarticulatus*, subiscono danni significativi alle loro foglie (Grangier *et al.*, 2008). L'effetto difensivo delle formiche è così evidente che esiste una lunga storia di utilizzo di questi insetti come agenti di biocontrollo. In Cina, nidi artificiali di formiche sono stati utilizzati per secoli nelle piantagioni di agrumi, e i coltivatori in vari paesi tropicali tradizionalmente portano i nidi di formiche nelle piantagioni di cacao e in altre piantagioni (Philpott & Foster, 2005; Rico-Gray & Oliveira, 2007) per ridurre gli attacchi di patogeni ed erbivori.

Le associazioni mutualistiche pianta-formica sono estremamente abbondanti in natura, coinvolgendo fino ad un terzo di tutte le specie legnose presenti in un determinato habitat, e determinanti nella strutturazione dell'ecosistema (Schupp e Feener, 1991). E di fatto, l'importanza del nettario extraflorale come organo secretorio e interfaccia nel mutualismo pianta-formica è stata dimostrata in vari ecosistemi, tra cui foreste tropicali secche (Camara *et al.*, 2018) e foreste pluviali (Fiala *et al.*, 1195), foreste temperate (Pemberton *et al.*; 1998), savane (Lange *et al.*, 2014), praterie secche (Ohm *et al.*, 2014) ed ecosistemi desertici (Aranda-Rickert *et al.*, 2014). Come ad esempio Blüthgen *et al.* (2000) riportano nei loro studi, i nettari extrafloriali insieme alla melata degli afidi hanno un ruolo chiave nel modellare la struttura delle comunità di formiche che vivono negli

ecosistemi della foresta pluviale. Hanno riscontrato che sulle piante che hanno i EFNs il numero di formiche operaie presenti su di esse è notevolmente più alto rispetto alle piante che non offrono questa risorsa nutritiva. I nettari extraflorali sono stati visitati da uno spettro molto più ampio di specie e generi di formiche e la co-presenza di specie di formiche è significativamente più elevata rispetto agli alberi senza EFNs. È evidente, dunque, come tale simbiosi mutualistica sia così incisiva nella strutturazione degli ecosistemi.

Se da una parte il mutualismo con le formiche rappresenta una variabile strutturale importante per gli ecosistemi, dall'altra rappresenta un'importante forma di difesa indiretta sviluppata dalle piante. La "difesa indiretta" viene generalmente osservata quando le piante attraggono, nutrono o ospitano altri organismi, insetti specialmente, per ridurre la pressione nemica (Kessler e Heil, 2008). Per fare questo, le piante hanno sviluppato diversi tratti adattativi: organi secretori come i nettari extraflorali e i corpi alimentari, strutture di riparo come il *domatium*, composti organici volatili (VOCs) e molti altri. I VOCs hanno un ruolo chiave nella comunicazione chimica tra piante e animali e tra piante e piante. Ma quali sono i costi energetici per questi tratti adattativi che le piante devono sostenere? Le difese indirette consentono di ottimizzare gli investimenti energetici in base alla pressione degli erbivori. Come gli studi di Heil *et al.* (2000) documentano, nella specie *Macaranga tanarius* la secrezione di nettare extraflorale raggiunge il picco massimo quando l'attività degli erbivori è massima, mentre i VOCs rilasciati durante il giorno e la notte possono differire nella loro composizione chimica al fine di ottenere risposte specifiche da parte di alcuni artropodi, come testimoniamo le osservazioni di Kunert *et al.* (2002) e di Turlings e Wäckers (2004). Infatti, le strategie di difesa indiretta possono essere classificate come inducibili, ovvero che vengono messe in atto solo quando necessario, limitando in questo modo le risorse energetiche della pianta (Arimura *et al.*, 2005). È noto, inoltre, che la produzione di nettare extraflorale e dei VOC di per sé richiede bassi costi fisiologici per le piante (O'Dowd, 1979; Fritzsche Hoballah & Turlings, 2001b), a differenza ad esempio del consumo energetico richiesto per la produzione del nettare floreale.

## 1.2 Nettari e nettare extraflorale

Il nettario extraflorale è una particolarissima struttura che a differenza dei nettari floreali si sono sviluppati in parti distali rispetto alle strutture riproduttive del fiore e su parti diverse della

pianta, come ad esempio sul picciolo della foglia o sulla stipula. Sono organi che presentano una grande variabilità anche nell'ontogenesi e nella struttura (Elias, 1983), e molto probabilmente anche nelle modalità di secrezione (Heil, 2011). Morfologicamente, i EFNs possono variare da semplici tricomi ghiandolari e tessuto secretorio a ghiandole vascolarizzate più complesse in cui si possono riconoscere almeno tre diversi tipi di tessuti: l'epidermide, il parenchima nettario e il parenchima sub-nettario (compresi i fasci vascolari che si diramano dal sistema vascolare fogliare).

Sebbene i nettari extrafloralizzati abbiano un'elevata diversità strutturale, la composizione chimica del nettare extraflorale è più simile tra i diversi taxa vegetali rispetto alla composizione altamente variabile del nettare floreale (Marazzi *et al.*, 2013). Nonostante esistano più di 3900 specie di piante che possiedono EFNs, in almeno 108 famiglie di piante (Heil, 2015), la composizione chimica del nettare extraflorale che queste strutture producono è abbastanza standardizzata e può essere definita come una soluzione acquosa, composta principalmente da saccarosio, glucosio e fruttosio, che di conseguenza costituisce una preziosa e ambita fonte di energia e di azoto per gli insetti (Bentley, 1977). Anche gli aminoacidi in esso contenuti rappresentano un importante fonte nutritiva per gli insetti, ma in proporzione sono normalmente inferiori a un decimo della concentrazione rispetto ai carboidrati (Staab *et al.*, 2017). Nel nettare extraflorale è stata inoltre evidenziata la presenza di metaboliti secondari (alcaloidi, terpenoidi e fenoli) la cui funzione deve essere ancora approfondita (Roy *et al.*, 2017). Tra questi ritroviamo i composti organici volatili (VOCs), utili nella comunicazione di natura chimica tra piante e tra piante e animali. Come suggeriscono gli studi di Rose *et al.* (2006) i VOCs presenti nel nettare extraflorale potrebbero agire come sostanze attrattive per gli insetti mutualistici. Tracce dell'alcaloide armina sono state riportate nel nettare extraflorale di *Passiflora edulis* (Cardoso-Gustavson *et al.*, 2013). Questo alcaloide viene trattenuto nel nettario extraflorale ad alte concentrazioni e riversato nel nettare a basse concentrazioni. La pianta può così modulare le concentrazioni dei metaboliti secondari per relazionarsi in modo specifico con gli erbivori o con i consumatori mutualistici. Il rilascio di alte concentrazioni di metaboliti secondari nelle secrezioni protegge l'organo extraflorale dagli erbivori mentre basse concentrazioni (tracce) nel nettare non hanno apparentemente alcun effetto apparente sulle formiche (Cardoso-Gustavson *et al.*, 2013).

La composizione della frazione zuccherina del nettare, tuttavia, può presentare una discreta variabilità in base alle specie con cui la pianta stabilisce il mutualismo. Molte specie di formiche sono particolarmente attratte dal nettare extraflorale ricco di saccarosio (Heil *et al.*, 2011), altre come le formiche del genere *Pseudomyrmex* preferiscono un nettare privo di saccarosio come quello

prodotto dall' *Acacia cornigera* poiché l'attività dell'enzima invertasi (che scinde il saccarosio in glucosio e fruttosio) nel loro tratto digestivo è pressoché assente (Heil *et al.*, 2005).

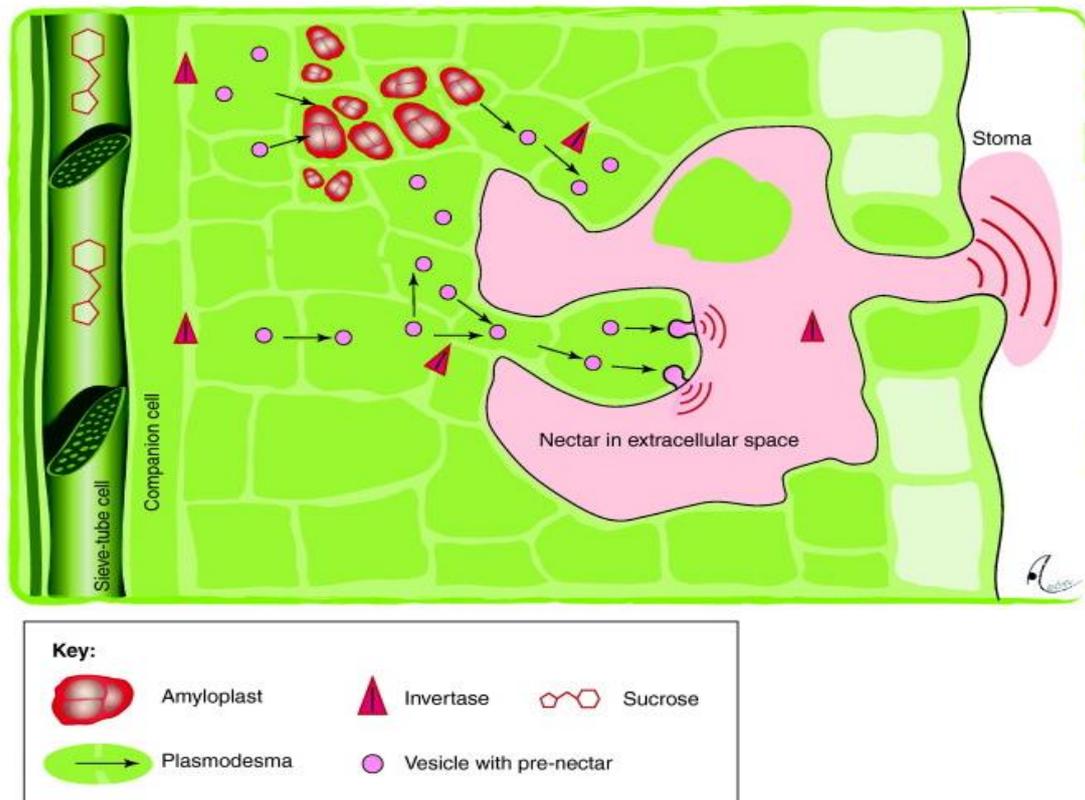
### 1.2.1 Produzione e secrezione del nettare extrafioreale

La produzione di EFN è una delle difese indirette inducibili delle piante contro gli erbivori (Aljibory *et al.*, 2018). La risposta indotta può comportare un cambiamento nella produzione di nettare nei nettari EFN esistenti o un aumento del numero di nettari sulle foglie che si sviluppano dopo un danno fogliare (Yamawo *et al.*, 2018). Il volume di nettare prodotto può essere aumentato o ridotto in foglie danneggiate (Mathur, 2013; Escalante-Pérez *et al.*, 2012); il nettare può anche diventare più concentrato (Ness *et al.*, 2003), oppure la proporzione di aminoacidi rispetto ai carboidrati può variare in seguito a un danno subito da parte di erbivori (Smith *et al.*, 1990).

I meccanismi di produzione e secrezione del nettare extrafioreale non sono però ancora ben chiari. A differenza del nettare fioreale, la secrezione di nettare extrafioreale è soggetta ad una plasticità fenotipica maggiore e pertanto richiede ulteriori meccanismi di regolazione. L'ipotesi più accreditata è che venga prodotto un "pre-nettare", la cui composizione può essere modificata, e trasportato tramite vescicole nelle regioni di secrezione delle cellule. Qui viene secreto tramite esocitosi (Kram *et al.*, 2007). Come mostra la figura 1, a monte potrebbe esserci un immagazzinamento dei carboidrati e l'azione dell'enzima invertasi, che permette la mobilitazione delle riserve zuccherine durante una secrezione attiva e il prelievo del "pre-nettare" dal floema. Diversi aspetti supportano questo modello. La secrezione del nettare tramite i tricomi esclude un trasporto apoplastico a causa delle pareti cellulari delle cellule dei tricomi, che fungono da barriera contro il movimento. L'elevata densità dei plasmodesmi, tipico di un tessuto nettario, consente alle vescicole di muoversi facilmente tra una cellula ed un'altra (Kuo *et al.*, 1985). Inoltre, il nettare è caratterizzato da un ampio intervallo di concentrazione degli zuccheri e, pertanto, esso non può essere prodotto dal solo flusso passivo dei composti o da meccanismi di trasporto guidati esclusivamente dagli enzimi che scindono il saccarosio. Lipidi e proteine sono probabilmente prodotti nei tessuti nettario e quindi devono necessariamente entrare nel "pre-nettare" prima della sua secrezione.

Per l'origine dei carboidrati, i principali costituenti del nettare extrafioreale, sono state descritte due vie che non si escludono a vicenda: il trasporto diretto dal floema e l'accumulo di

amido e la sua idrolisi durante la produzione di nettare. Radhika *et al.* (2008) nei suoi esperimenti ha utilizzato CO<sub>2</sub> marcata con C13 dimostrando che il nettare extrafioreale nel *Phaseolus lunatus* contiene zuccheri assimilati durante le ultime ore prima della secrezione.



TRENDS in Plant Science

Figura 1: ultrastruttura della secrezione di nettare extrafioreale e fiorale. Immagine tratta da Heil, M. (2011). Nectar: generation, regulation and ecological functions. Trends in plant science, 16(4), 191-200.

### 1.3 *Vicia faba*



Figura 2: *Vicia faba* L., 1753. Immagine tratta da Wikipedia.

La *Vicia faba*, o comunemente chiamata fava, è una pianta erbacea appartenente alla famiglia delle Leguminose o Fabaceae (Fig. 2). È una pianta annua di origine incerta, coltivata sin da tempi antichissimi in tutti i paesi del bacino Mediterraneo e presente a volte allo stato sub-spontaneo in quasi tutte le regioni dell'Italia peninsulare e insulare, soprattutto nell'Italia mediterranea.

Può raggiungere un'altezza di circa 140 cm, con un fusto a sezione quadrangolare, cavo e ramificato alla base. Le foglie, pennato-composte, sono spesse e glauche per via della presenza di uno strato diffuso di cera che le caratterizza. Alla base di ogni ramificazione è presente una coppia di stipule, foglie modificate, con la presenza di

vistosi nettari extraflorali di colore viola intenso. I fiori sono raccolti in brevi racemi che si sviluppano all'ascella delle foglie a partire dal 7° nodo. Ogni racemo porta 1-6 fiori pentameri, con vessillo ondulato, di colore bianco striato di nero e ali bianco o violacee con macchia nera. La fecondazione è autogama. Il frutto è un legume allungato, cilindrico o appiattito, terminante a punta, eretto o pendulo, glabro o pubescente che contiene da 2 a 10 semi con ilo evidente, inizialmente verdi e di colore più scuro (dal nocciola al bruno) a maturità. Possiede un apparato radicale fittonante, con numerose ramificazioni laterali di struttura reniforme (tubercoli radicali) nei primi 20 cm che ospitano specifici batteri azotofissatori (*Rhizobium leguminosarum*).

La fava inizia a germinare con temperature del terreno intorno a 5 °C; con queste condizioni la germinazione avviene in 15-20 giorni. La resistenza della fava al freddo è limitata: gelate di -6 °C sono fatali alla maggior parte delle varietà; solo alcune resistono fin ai -15 °C. Durante la fioritura la resistenza della fava al gelo è ancora minore. Inoltre, in questo stadio temperature medie piuttosto basse, anche se non fatali per la sopravvivenza della pianta, possono compromettere l'allegagione dei fiori sia direttamente, turbando la fisiologia dell'antesi, sia indirettamente ostacolando il volo dei pronubi. Dal punto di vista idrico, la fava è una forte consumatrice d'acqua e trova proprio nella

deficienza idrica il più importante fattore limitante delle rese, particolarmente nel caso di semine primaverili. Ecco perché nei climi che lo consentono la fava va seminata in autunno, dal momento in cui le piogge assicurano non solo la germinazione ma un buon sviluppo vegetativo.

La fava è una delle leguminose da granella più antiche coltivate nella storia dell'agricoltura, tanto che è stata aggiunta nell'elenco delle otto specie considerate fondatrici delle colture nella storia dell'essere umano (Tanno e Willcox, 2006). Nella sua lunga storia, questa specie è stata coltivata su un ampio intervallo di latitudini grazie ai suoi molteplici usi come, ad esempio, cibo per gli esseri umani e mangime per gli animali da allevamento, e come fertilizzante del suolo. I semi della fava, infatti, hanno un alto contenuto proteico (che può addirittura rappresentare quasi il 30% del peso secco del seme) e garantisce un buon approvvigionamento energetico grazie al contenuto di amido (a volte superiore al 40%). Sono presenti inoltre fibre, vitamine e minerali per cui la loro integrazione nella dieta può apportare grandi benefici per la salute come la diminuzione del colesterolo plasmatico (Champ, 2002; Ofuya e Akhidue, 2005).

La fava è una tipica coltura miglioratrice, che svolge un eccellente ruolo di pianta da rinnovo. I benefici che apporta al terreno sono molteplici, sia diretti che indiretti a causa delle lavorazioni che richiede. Rilascia abbondanti residui vegetali, che incrementano il contenuto in sostanza organica e dei nutrienti nel terreno. Particolarmente importante è l'apporto di azoto, per i riflessi che ha sulla concimazione, visto la sua capacità di fissare l'azoto atmosferico grazie alla simbiosi con il batterio *Rhizobium*. Questa sua capacità, come per tutte le leguminose, permette di far rientrare la fava tra le colture più adatte all'avvicendamento con cereali autunno-invernali, come frumento e orzo (Jensen *et al.*, 2010), e come pianta da sovescio nei programmi di inerbimento delle colture arboree. Permette inoltre di ridurre l'utilizzo di energia derivante dai combustibili fossili, spesa per il trasporto e la fornitura di fertilizzanti azotati sintetici.

Da un punto di vista ecologico la pianta di *Vicia faba* svolge dunque un ruolo importante, non soltanto perché permette l'avvicendamento di colture diverse dopo la sua coltivazione, ma attira molti insetti utili alla lotta biologica, tra cui le formiche, e insetti impollinatori (Manning, 2006). E questo grazie alla presenza dei nettari extraflorali che secernono nettare ricco di zuccheri, un forte attrattivo per molti animali. Tale offerta di foraggiamento attira purtroppo anche predatori e parassitoidi delle piante, i quali a loro volta attirano un'ampia varietà di antagonisti. Questa complessa dinamica relazionale, se ben gestita, può essere sfruttata per potenziare il controllo biologico nelle colture in cui viene coltivata la *Vicia faba* ma anche nelle colture ad essa adiacenti (Landis *et al.*, 2000).

Proprio per il suo rapporto mutualistico con le formiche la fava viene classificata come pianta mirmecofila (Heil & McKey, 2003).

### 1.3.1 Il nettario extrafiore della *Vicia faba*

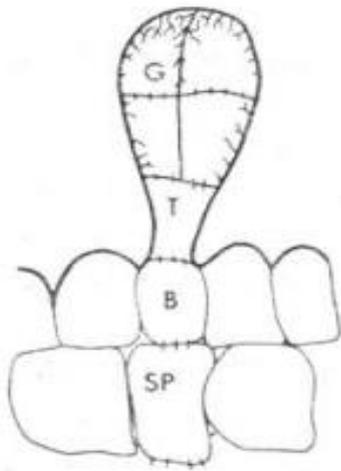


Figura 3: rappresentazione grafica della struttura di un tricoma del nettario extrafiore di *Vicia faba*. Immagine tratta da Tarkowska, J. A., Zobel, A. M., & Maciak, M. (1981).

Il nettario della *V. faba* è un insieme di ghiandole secretrici, classificate come tricomi peltati (Tarkowska *et al.*, 1981). Un singolo tricoma è costituito da una cellula basale inserita nel primo strato epidermico inferiore, da una cellula "gambo" leggermente allungata che sorregge quattro cellule, due mediane e due apicali (Fig. 3 e Fig. 4). Raramente si osservano sei/otto cellule. Queste ultime sono adibite alla secrezione di nettare e per questo sono caratterizzate da numerose protuberanze in prossimità della parete cellulare. Sono stati inoltre osservati plasmodesmi tra le cellule subepidermiche e le cellule basali dei tricomi, probabilmente a testimonianza di un intenso traffico di metaboliti primari e secondari da riversare nel nettare. Le pareti dei tricomi sono ricoperte da cuticola, particolarmente abbondante nella regione secretrice. I nettari

presentano inoltre, alternanti ai tricomi secernenti, dei peli unicellulari che sporgono oltre le teste secretrici (Stpiczyńska, 1995; Heneidak *et al.*, 2007). La loro funzione non è ancora nota.

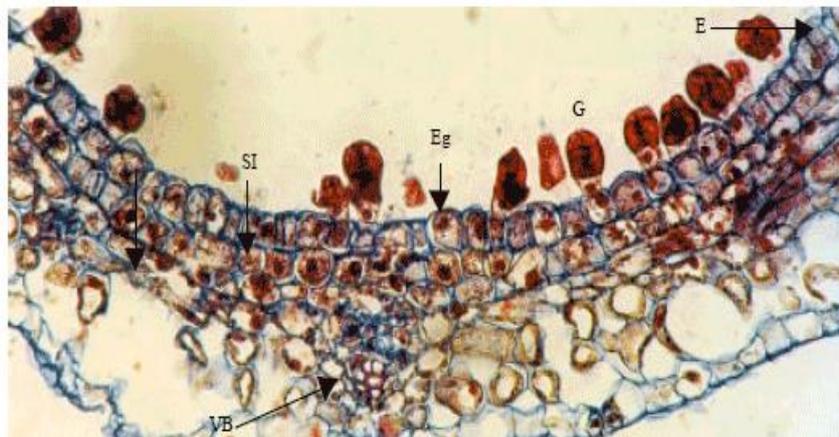


Figura 4: sezione trasversale di *Vicia faba*. Legenda: "Eg" cellule epidermiche sotto i tricomi ghiandolari, "G" tricomi ghiandolari; "E" epidermide; "SI" strato subepidermico secretorio; "VB" tessuto vascolare. Immagine tratta da Heneidak, S., & Hassan, A. E. (2007).

## 1.4 Elettrofisiologia e segnali elettrici nelle piante

I segnali elettrici nelle piante furono descritti per la prima volta più di 200 anni fa (Berthelon, 1783), contemporaneamente alla loro scoperta negli animali (Galvani, 1791). Inizialmente la maggior parte dei lavori (Burdon-Sanderson, 1873; Darwin, 1875) riguardavano piante carnivore, soprattutto la *Dionea muscipula* che, come la *Mimosa pudica*, hanno risposte molto rapide al tatto e furono per oltre un secolo le due specie modello maggiormente studiate. Fino al 1880 circa sembrava che ci fosse una generale consapevolezza dell'esistenza dei segnali elettrici come meccanismi fisiologici comuni alle piante e agli animali. Tuttavia, poco dopo il suo lavoro sui segnali elettrici, Darwin postulò l'esistenza di segnali chimici nelle piante (Darwin, 1881), pertanto si riconobbe che le piante fossero dotate sia di proprietà bioelettriche che chimiche, come accadde per gli animali qualche anno dopo.

La ricerca sui segnali elettrici andò avanti tra grandi scoperte e pesanti rallentamenti, passando dalla descrizione dei primi potenziali d'azione descritti da Pickard (1973) nelle piante vascolari, alla messa in discussione dei risultati ottenuti sugli organismi vegetali da Galston & Slayman (1979). Tra gli scienziati del regno animale si diffuse la convinzione che non vi fosse alcun reale bisogno dell'esistenza di un meccanismo di segnalazione rapida in organismi lenti come le piante. Pertanto, la ricerca sui segnali elettrici nelle piante venne ostacolata, in particolare negli Stati Uniti, dove i finanziamenti vennero interrotti per due decenni. Tuttavia, l'esplorazione di questo nuovo campo, l'elettrofisiologia vegetale, non si arrestò mai del tutto. Si diffuse la nuova idea che i segnali elettrici non esistevano solo nelle piante caratterizzate da rapidi movimenti ma in generale in tutte le piante. Questo avanzamento ideologico fu dovuto in parte al lavoro svolto da Davies e Schuster (1981), i quali riuscirono ad ottenere una prova della rapida generazione di un segnale elettrico in seguito ad un danno fogliare nella pianta di pisello. Da quel momento la ricerca sulla comunicazione elettrica delle piante ebbe una nuova spinta, fino ad arrivare al 2005 con il "First Symposium in Plant Neurobiology" e la pubblicazione di una raccolta degli articoli presentati al simposio redatta da Baluska *et al.* (2006). Come riportano gli autori:

*“La neurobiologia vegetale è un campo di ricerca sulla biologia vegetale recentemente focalizzato che mira a comprendere come le piante elaborano le informazioni che ottengono dal loro ambiente per svilupparsi, prosperare e riprodursi in modo ottimale. Il comportamento esibito dalle piante è coordinato in tutto l'organismo da una qualche forma di sistema integrato di segnalazione, comunicazione e risposta. Questo sistema include segnali elettrici a lunga distanza, trasporto di auxina mediato da vescicole in tessuti vascolari specializzati e produzione di sostanze chimiche note*

*per essere neuronali negli animali. Qui esaminiamo come la neurobiologia vegetale viene indirizzata verso la scoperta dei meccanismi di segnalazione nelle piante intere, così come tra le piante e i loro vicini."*

#### 1.4.1 Il segnale elettrico

Uno stimolo è tutto ciò che evoca una risposta all'interno della pianta (denominato "accoppiamento stimolo-risposta" nella letteratura animale), mentre un segnale è tutto ciò che viene generato e trasmesso dalla pianta in risposta a quello stimolo (Thellier, 2017). Pertanto, lo stimolo potrebbe essere applicato dall'esterno della pianta, mentre il segnale viene generato all'interno. Inoltre, il segnale stesso diventa uno stimolo quando arriva a destinazione e provoca la propria risposta. Ad esempio, quando si applica una tensione ad una pianta (stimolazione elettrica) essa può evocare la generazione di un impulso elettrico (potenziale d'azione, AP), che viene trasmesso attraverso la pianta. Questo AP comporta l'afflusso di calcio nel citoplasma seguito dall'efflusso di cloruro e potassio (Zimmermann *et al.*, 1999). Le conseguenze dell'insorgenza e propagazione del segnale AP, come per esempio l'aumento del calcio citosolico, diventano stimoli quando evocano risposte fisiologiche cellulari successive, come ad esempio l'attivazione della fosfolipasi C. La fosfolipasi C in prossimità della membrana plasmatica catalizza l'idrolisi del fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato (PIP2) in inositolo trifosfato (IP3). L'IP3 a sua volta agisce come stimolo per evocare il rilascio di più calcio dalle riserve intracellulari. Questi segnali (IP3, calcio e/o eventi di fosforilazione proteica associati) possono quindi agire come stimoli per modulare l'espressione genica (Davies e Stankovic, 2006).

Le piante raccolgono continuamente informazioni sul loro ambiente per poter garantire il mantenimento dell'omeostasi. Stimoli ambientali come cambiamenti spontanei di temperatura, luce, o umidità possono indurre segnali elettrici, fondamentali la sincronizzazione delle loro normali funzioni biologiche (Ksenzhek e Volkov, 1998). La sincronizzazione delle funzioni interne, in base ad eventi esterni, è legata dunque al fenomeno dell'eccitabilità delle cellule vegetali. Esse possiedono infatti membrane eccitabili attraverso le quali possono propagarsi le eccitazioni elettriche, sotto forma di potenziali d'azione, come accade nelle cellule animali (Volkov *et al.*, 2006). Quando ad esempio la specie epatica *Conocephalum conicum* viene ombreggiata, le sue cellule del tallo si iperpolarizzano, mentre si depolarizzano quando vengono di nuovo illuminate (Trebacz *et al.*, 2006).

Uno stimolo meccanico dannoso quale può essere la combustione di una piccola area di una foglia in *Vitis vinifera* genera le cosiddette VP, variazioni di potenziale, indotte da un'onda idraulica che viene trasmessa attraverso lo xilema. I VP sono una risposta "locale" al passaggio di un'onda idraulica (Mancuso, 1999). Uno stimolo meccanico nel genere *Chara* provoca inizialmente una depolarizzazione di membrana. Questo processo è noto come formazione del potenziale del recettore, che è una replica elettrica dello stimolo che dura per il periodo di tempo in cui dura lo stimolo applicato. Quando lo stimolo è sufficientemente forte da depolarizzare la membrana al di sotto di una certa soglia, si genera un AP (Tazawa e Kishimoto, 1968).

Queste e numerose altre ricerche dimostrano come le piante siano in grado di generare specifiche risposte elettriche a breve e lunga distanza in base a determinati stimoli ambientali (Lautner *et al.*, 2005).

## 1.4.2 Tipi di segnale elettrico

### 1.4.2.1 Potenziale d'azione (AP)

La generazione e la propagazione del potenziale d'azione (AP) sono considerate una delle risposte primarie di una pianta alle azioni di vari fattori ambientali. Un AP induce una serie di cambiamenti nei processi fisiologici come la fotosintesi, la respirazione, il trasporto del floema, l'espressione genica e tanti altri (Stanković e Davies, 1996; Bulychev *et al.*, 2004; Grams *et al.*, 2009). Gli AP sono messaggi elettrici a propagazione rapida e la loro generazione segue il principio del "tutto o niente", ovvero se la membrana è depolarizzata fino al valore soglia o oltre, si genera un potenziale d'azione che mantiene costante la sua ampiezza. Se la membrana a seguito di uno stimolo non è depolarizzata fino al valore soglia, non si genera alcun AP (Pyatygin *et al.*, 2008).

La generazione di AP è associata a flussi passivi di  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{K}^+$  (Felle & Zimmermann, 2007), ma anche l'inattivazione reversibile dell' $\text{H}^+$ -ATPasi probabilmente partecipa alla sua generazione nelle piante superiori (Vodeneev *et al.*, 2006).

Quando un potenziale d'azione si diffonde all'interno della pianta, la sua ampiezza e la sua velocità di propagazione rimangono costanti (possono viaggiare ad una velocità di mm/s fino a diversi cm/s a seconda della specie vegetale) e si adatta al diametro dei vasi conduttori (Oprittov,

1991). Ciò significa che la propagazione dell'AP è un processo attivo nelle piante superiori e il suo meccanismo è generalmente simile a quello dell'AP nelle fibre nervose e muscolari. I meccanismi di propagazione differiscono però tra le piante inferiori e le piante superiori. Nelle piante inferiori, ne sono stati descritti due in particolare. Nelle cellule lunghe (diversi centimetri) delle alghe giganti appartenenti alla famiglia delle Caracee, l'AP si diffonde elettricamente sulle file di cellule collegate tra loro tramite contatti (Beilby, 2007). Il processo somiglia molto alla conduzione del potenziale d'azione lungo una fibra nervosa. Nel tallo del muschio, la presenza di plasmodesmi tra le cellule di piccole dimensioni permette la propagazione del potenziale elettrico tramite il simplasto (Trebacz *et al.*, 2006). Questo tipo di trasmissione del segnale è simile invece ai potenziali d'azione nelle fibre di Purkinje dei ventricoli cardiaci. Nelle piante superiori il quadro è più complesso. Un AP può propagarsi per brevi distanze attraverso plasmodesmi, e per lunghe distanze attraverso le cellule dei vasi xilematici (Zhao *et al.*, 2015). I meccanismi di propagazione nelle piante vascolari sono ancora oggetto di studio.

#### 1.4.2.2 Variazione di potenziale (VP)

I VP o potenziali ad onda lenta sono segnali elettrici che consistono in una variazione transitoria del potenziale di membrana: una rapida depolarizzazione seguita da una lenta ripolarizzazione. Le differenze principali rispetto agli AP risiedono proprio nelle ripolarizzazioni più lunghe e ritardate e in un ampio intervallo di variazione d'intensità in risposta ad uno stimolo (Stahlberg *et al.*, 2006). Un VP sembra dunque essere un cambiamento locale del potenziale di membrana causato da un'onda di pressione idraulica o da sostanze chimiche trasmesse attraverso lo xilema. È caratterizzato da un'amplitudine e una velocità che diminuiscono con l'aumentare della distanza dal sito in cui è avvenuto lo stimolo. Questo perché la sua propagazione è a carico di tessuti morti dello xilema e risente della tensione xilematica. Può essere generato da ferite, escissione di organi o bruciature (Stahlberg *et al.*, 2006). La comprensione dei meccanismi di generazione e propagazione dei VP non è ancora ben chiara. Diversamente dall'AP, che si basa principalmente su flussi ionici passivi, la generazione di VP sembra essere collegata all'inattivazione transitoria dell'H<sup>+</sup>-ATPasi (Stahlberg *et al.*, 2006). Questa ipotesi è stata inizialmente supportata dalle analisi con l'applicazione di inibitori. È stato dimostrato che gli inibitori metabolici (CN<sup>-</sup> e NaN<sub>3</sub>) diminuiscono l'ampiezza VP e la velocità di depolarizzazione, o sopprimono la generazione del potenziale di

variazione nella pianta di pisello, zucca e pomodoro (Rousset *et al.*, 2002; Davies, 2006). Katicheva *et al.* (2014) hanno osservato che l'ampiezza del VP e le sue velocità di depolarizzazione e ripolarizzazione sono essenzialmente ridotti nel grano dopo il trattamento con ortovanadato di sodio, inibitore specifico dell'H<sup>+</sup>-ATPasi. Questi risultati mostrano che i cambiamenti nell'attività dell'H<sup>+</sup>-ATPasi sono un importante meccanismo di generazione di VP.

Tuttavia, altri esperimenti hanno dimostrato che l'inibizione dei canali del Ca<sup>2+</sup> e/o l'abbassamento delle concentrazioni esterne di ioni calcio diminuiscono essenzialmente l'ampiezza VP o sopprimono questa reazione elettrica nella zucca, nel grano, nell'orzo e nel pomodoro (Vodeneev *et al.*, 2011). Anche gli studi condotti da Pyatygin *et al.* (2008) hanno evidenziato come la generazione di VP è accompagnata da una diminuzione della concentrazione di ioni calcio nell'apoplasto. Questi risultati mostrano che l'afflusso di Ca<sup>2+</sup> è necessario per lo sviluppo della VP. Sukhov *et al.* (2013) con i loro esperimenti lo confermano. L'afflusso di Ca<sup>2+</sup> avvia la generazione di un VP, inducendo l'inattivazione dell'H<sup>+</sup>-ATPasi e, possibilmente, l'attivazione del canale Cl<sup>-</sup>. Il Ca<sup>2+</sup> svolge un ruolo regolatore nello sviluppo della variazione di potenziale.

Sulla propagazione di un VP sono state formulate tre ipotesi. La prima ipotesi è che il VP abbia un carattere autopropagante, similmente al potenziale d'azione (Tsaplev *et al.*, 1980), ma questo non spiega alcune sue proprietà nella trasmissione. Il VP può propagarsi attraverso zone dove la sua generazione è soppressa dalle basse e alte temperature (Roblin, 1985), dal cianuro di potassio (Stahlberg *et al.*, 1997) e altri inibitori. Secondo le altre due ipotesi, il VP è una risposta elettrica locale indotta dalla propagazione di un fattore specifico. Questo fattore può essere un'onda idraulica (Mancuso, 1999) o un agente chimico (Malone, 1996). In alcuni studi viene proposta anche una combinazione di segnali idraulici e chimici (Malone, 1994). L'ipotesi idraulica sostiene che il danno aumenta la pressione idraulica nella zona stimolata, la quale a sua volta induce un'onda idraulica che si propaga attraverso lo xilema della pianta. Numerosi dati sperimentali supportano questa ipotesi (Malone, 1992; Mancuso, 1999; Vodeneev *et al.*, 2012). L'ipotesi chimica propone che il danno induca la sintesi e/o la secrezione di una sostanza dalla ferita, che si propaga attraverso i vasi xilematici inducendo una reazione elettrica locale (Davies, 2006). Queste sostanze possono essere contenute negli omogenati cellulari in seguito a ferita e indurre una risposta elettrica come è stato osservato nella pianta di pomodoro (Cheeseman *et al.*, 1977). Anche il perossido di idrogeno induce un VP nella zona danneggiata, attivando i canali del Ca<sup>2+</sup> innescando l'onda di depolarizzazione (Demidchik *et al.*, 2003).

## 1.5 Composti organici e terpeni

Le interazioni trofiche tra piante, erbivori e carnivori possono essere alterate e/o regolate dall'influenza delle piante stesse (Price *et al.*, 1980). Questa strategia difensiva, come già sopra riportato, conta su specifici tratti adattativi come i nettari extrafloriali, altri organi secernenti classificati come "corpi alimentari", composti organici volatili, strutture utilizzate come rifugio (domatium) e siti di nidificazione. Pertanto, le piante possono fornire informazioni, cibo o alloggio per ottenere protezione (Bronstein *et al.*, 2006) da insetti mutualistici.

I VOCs sono emessi da tutti i taxa vegetali sia in modo costitutivo, sia in risposta agli stimoli biotici e abiotici (Holopainen, 2004), e sono considerati segnali che mediano la comunicazione tra piante e altri organismi, nonché composti "bioattivi" che inducono risposte nell'organismo "bersaglio". I VOCs svolgono un ruolo cruciale nelle interazioni biotiche delle piante, come ad esempio la selezione della pianta ospite da parte degli insetti (Bruce *et al.*, 2005), agendo come segnali di alimentazione, habitat e deposizione delle uova sia per gli insetti utili che per gli erbivori (Dudareva *et al.*, 2006). Sono coinvolti nella difesa indiretta, attirando i nemici naturali degli erbivori (ad esempio predatori e parassitoidi) verso i siti danneggiati (McCormick *et al.*, 2012). Inoltre, possono mediare la segnalazione all'interno della pianta (Frost *et al.*, 2007) e la comunicazione tra le piante (Kessler *et al.*, 2006), e influenzare la composizione delle radici, dei fiori e del microbiota fogliare (Junker e Tholl, 2013). Non a caso, la variabilità chimica dei VOC è notevole e possono differire in relazione alla specie vegetale che li emette, alle cultivar, varietà, genotipi e persino ai tessuti all'interno della pianta stessa, oltre ovviamente in relazione agli innumerevoli stimoli biotici e abiotici (Krisp *et al.*, 2001; Jonsson *et al.*, 2005; Kappers *et al.*, 2011). Considerando dunque la molteplicità e la complessità delle interazioni mediate dall'altrettanto molteplicità dei composti organici volatili, possiamo affermare che i VOCs sono tra i più importanti metaboliti secondari a ricoprire un ruolo chiave nella comunicazione chimica tra piante e tra piante e animali (Dicke *et al.*, 2009; Ponzio *et al.*, 2013).

Alcuni recenti studi hanno posto una particolare attenzione sulle piante che mostrano due dei tratti evolutivi coinvolti nella difesa indiretta, come appunto la produzione di VOCs e la presenza degli EFNs. In queste piante, è stato dimostrato come l'ormone vegetale jasmonato, in risposta ad un danno biotico, possa indurre sia la produzione di VOCs che di nettare extraflorale (Boland *et al.*, 1995; Heil *et al.*, 2001). Dagli studi di Heil e Bueno (2007) sappiamo che i VOCs rilasciati dalle foglie danneggiate da erbivori di *Phaseolus lunatus* innescano e inducono la secrezione di nettare

extrafioreale sia sulla pianta stessa che su quelle adiacenti, il quale a sua volta attira i predatori degli erbivori. Le piante sono in grado di attuare una potente sinergia tra le due strategie difensive, aumentando in questo modo la loro fitness e la capacità di rispondere rapidamente all'attacco di diversi gruppi di nemici. Il nettare extrafioreale indotto dai VOCs può ad esempio aumentare il tempo che i difensori carnivori trascorrono sulla pianta, attratti proprio dai composti volatili stessi (Choh *et al.*, 2006).

Nella classe dei composti organici volatili troviamo i terpeni, composti sintetizzati da unità precursori a cinque atomi di carbonio, l'isopentenil pirofosfato (IPP), e con significative implicazioni nell'ecologia vegetale (Gershenzon *et al.*, 2007). Essi sono particolarmente coinvolti nell'interazione pianta-insetto (ad esempio impollinatori, predatori, parassitoidi ed erbivori), e generalmente le interazioni sono a vantaggio delle piante. Le sostanze terpeniche sono tra i composti volatili principali emessi dalle piante in risposta agli erbivori, segnalando agli artropodi carnivori di prepararli o parassitarli (Tholl *et al.*, 2004), o possono agire direttamente come deterrente tossico per gli erbivori e patogeni (Paré *et al.*, 1997). Negli studi sul genere *Passiflora* le sostanze terpeniche vengono accumulate all'interno dei tricomi secernenti che caratterizzano i nettari extrafioreali, e riversate nel nettare. Gli autori ipotizzano che la presenza di queste sostanze agisca come attrazione per le specie consumatrici mutualistiche (Cardoso-Gustavson *et al.*, 2013).

## 1.6 Lipidi

I lipidi sono costituenti cellulari importanti e vitali per la cellula vegetale in quanto forniscono la base strutturale per le membrane cellulari e rappresentano una rilevante riserva energetica per il metabolismo. Sono inoltre coinvolti in molti meccanismi di segnalazione cellulare che influenzano lo sviluppo e le risposte a stress biotici e abiotici (Koenig *et al.*; 2020). Numerosi studi, infatti, hanno indicato i lipidi come mediatori in molti processi cellulari, tra cui la trasduzione del segnale, i riarrangiamenti citoscheletrici e il traffico di membrana. Sono tutti processi cruciali sia per la sopravvivenza, la crescita e la differenziazione cellulare e sia per la risposta delle piante a variazioni di temperatura, disponibilità di acqua, salinità e all'attacco di parassiti e patogeni (Koenig *et al.*, 2020).

L'acido fosfatidico (PA), ad esempio, è un mediatore lipidico nei processi di segnalazione dei movimenti stomatici; alti livelli di PA sono stati registrati in condizioni di stress come abbassamento

delle temperature, ferite, disidratazione, carenza di nutrienti, stress ossidativo e attacchi di patogeni (Ruelland *et al.*, 2002; Welti *et al.*, 2002; Meijer, 2003). Anche per gli acidi grassi è stato osservato un aumento in seguito all'esposizione di patogeni, in particolar modo gli acidi grassi polinsaturi 18:3 e 16:3 che fungono da precursori per la sintesi dell'acido jasmonico coinvolto nelle interazioni pianta-patogeno e pianta-insetto (Li *et al.*, 2003). L'accumulo di oligogalattolipidi e glucuronosildiacylglicerolo mitiga gli stress da congelamento e da carenza nutrizionale, rispettivamente (Moellering *et al.*, 2010; Okazaki *et al.*, 2013). Cera, cutina e suberina, che sono componenti derivati dai lipidi, contribuiscono alla riduzione dello stress da siccità e del danno tissutale (Panikashvili *et al.*, 2007; Seo *et al.*, 2011). I lipidi sono dunque coinvolti anche nei processi di mitigazione in risposta allo stress nelle cellule vegetali (Moellering *et al.*, 2010; Okazaki *et al.*, 2013).

Negli ultimi anni, i ricercatori hanno focalizzato la loro attenzione sulle potenziali implicazioni delle sostanze lipidiche come precursori delle sostanze terpeniche. Pateraki *et al.* (2014) notarono un accumulo di terpenoidi insieme ai lipidi neutri all'interno di goccioline lipidiche che caratterizzavano le cellule della regione più esterna del tessuto subero-fellodermico nella radice di *Plectranthus barbatus*, ipotizzando che queste gocce lipidiche potessero fungere da luogo per la produzione e accumulo di alcune sostanze terpeniche. La co-presenza dei lipidi e dei terpeni all'interno di questi corpi lipidici è stata l'osservazione di partenza per l'ideazione di una biotecnologia finalizzata alla produzione e stoccaggio ad alto rendimento dei terpenoidi. Sadre *et al.* (2019), nei suoi studi di bio-ingegneria, descrive e propone i corpi lipidici come "organelli ingegnerizzati per la produzione e l'accumulo di terpenoidi". A causa delle molteplici funzioni e proprietà delle sostanze terpeniche vi è un crescente interesse ad introdurre o modificare la loro produzione nelle piante mediante ingegneria metabolica per applicazioni agricole, farmaceutiche o industriali.

A tal proposito, riportiamo una breve descrizione di come il metabolismo dei terpeni e dei lipidi nelle piante sia strettamente interconnesso attraverso la via biosintetica degli isoprenoidi. Come descrive Stumpf (2014), nonostante la diversità dei terpenoidi, essi derivano tutti dagli stessi precursori: l'isopentenil difosfato (IPP) e il dimetilallil difosfato (DMAPP). La biosintesi di questi composti avviene attraverso due vie distinte: la via del mevalonato (MVA) che opera nel citosol e nei perossisomi e la via del metileritritolo-fosfato (MEP) nei plastidi. Ma l'IPP e il DMAPP sono anche precursori nella sintesi dei lipidi. Inoltre, i terpeni stessi possono essere modificati e incorporati nei lipidi, contribuendo alla diversità delle molecole lipidiche nelle membrane cellulari. In sintesi, il

metabolismo dei terpeni e dei lipidi nelle piante è collegato attraverso la via di biosintesi degli isoprenoidi, in cui i precursori comuni IPP e DMAPP sono utilizzati sia nella sintesi dei terpeni che nella sintesi di alcuni lipidi.

## 1.7 Formiche e lotta biologica

*“The use of living organisms to suppress the population density or impact of a specific pest organism, making it less abundant or less damaging than it would otherwise be”.* (Crump *et al.*, 1999)

La lotta biologica è una tecnica che sfrutta i rapporti di antagonismo, parassitismo e predazione fra gli organismi viventi per contenere una popolazione dannosa per un ecosistema naturale e/o per le colture. Alcuni aspetti biologici e comportamentali delle formiche le rendono un ottimo alleato alla lotta biologica nei sistemi agricoli di tutto il mondo. Riportiamo di seguito alcune caratteristiche:

- hanno la capacità di consumare rapidamente un gran numero di prede (Risch e Carroll, 1982);
- formano popolazioni grandi e stabili sono in grado di reagire rapidamente a un numero crescente di parassiti (Way e Khoo, 1992) attraverso l'uso della comunicazione chimica e del reclutamento (Risch e Carroll, 1982);
- durante i periodi di carenze nutritive, le formiche possono sopravvivere cannibalizzando la covata della colonia o nutrendosi di prede immagazzinate (Risch e Carroll, 1982);
- le operaie sono raccoglitrici accurate e opportuniste, individuando i parassiti anche se presenti in pochi esemplari (Symondson *et al.*, 2002);
- come predatrici generaliste, le formiche sono in grado di cambiare specie di prede quando hanno esaurito una determinata risorsa (Symondson *et al.*, 2002);
- possono anche controllare le popolazioni di parassiti attraverso l'interruzione dell'alimentazione e dell'ovideposizione (Bentley, 1977).

Uno dei primi esempi di controllo biologico riportati in letteratura riguarda i coltivatori di agrumi in Asia che prelevavano le formiche predatrici e le introducevano nei frutteti e fornivano loro strisce di bambù per favorire il movimento tra gli alberi (Huang e Yang, 1987). Nel 1991, in Nicaragua, Perfecto descrive nei suoi studi come l'utilizzo di formiche abbia significativamente ridotto il numero

di larve di vermi della specie *Spodoptera frugiperda* e il numero di larve della specie *Dalbulus maidis* (cicaline del mais) e i danni che provocavano alle piantagioni di mais. In Africa occidentale, nelle coltivazioni di mango le formiche tessitrici autoctone della specie *Oecophylla longinoda* garantiscono un'elevata qualità dei frutti riducendo i danni causati dalla mosca della frutta (Diptera: Tephritidae) (Van Mele, 2007). *Oecophylla smaragdina* è una specie predatrice di formiche, arboricola (nidifica sugli alberi), originaria dell'Australia settentrionale, e utilizzata dai coltivatori di cocco nella regione del Pacifico (Stapley, 1973) e coltivatori di anacardi in Australia (Peng *et al.*, 1995) nella lotta biologica. La caduta immatura delle noci di cocco è un grande problema che deriva dall'attacco di insetti, bruchi, punteruoli o ratti. Le piante di cocco con nidi di *O. smaragdina* non riportavano evidenti cadute di noci, facendo registrare un aumento della resa (Stapley, 1973). Sempre nei suoi esperimenti sul campo, Stapley (1973) sfruttò una caratteristica comportamentale della specie *O. smaragdina* a proprio vantaggio. Osservò che questa specie di formiche aveva una preferenza particolare nello scegliere la specie *Annona muricata* come albero su cui nidificare. Decise dunque di piantare alcuni esemplari di *A. muricata* in una piantagione di cocco in modo tale da beneficiare della presenza cospicua e costante delle formiche contro attacchi di patogeni ed erbivori. In India, nelle coltivazioni di cavolfiore i danni causati alle foglie dalle larve dei due principali lepidotteri nocivi, *Plutella xylostella* e *Agrotis ipsilon*, sono stati contrastati dall'attività predatoria delle formiche del genere *Pheidole sp.* (Agarwal *et al.*, 2007).

La lotta biologica con le formiche è una strategia d'azione che esplica i suoi massimi benefici quando c'è un'interazione positiva di questi insetti con le piante. L'albero di mango, *Mangifera indica*, secerne nettare extrafiorente alla base del picciolo del frutto, il quale attira un ampio spettro di artropodi, tra cui le formiche che svolgono un'azione di protezione contro gli erbivori (Reddy e Sreedevi, 2016). La specie *Annona muricata* offre siti di nidificazione per la specie *O. smaragdina*, che ancora una volta garantisce alla pianta protezione. Il cavolo appartiene alla famiglia delle Brassicacee, una delle 108 famiglie di piante ad avere i nettari extrafiorenti (Heil, 2015), nella quale gli effetti benefici del mutualismo con le formiche è ampiamente documentato in letteratura. Per avere il massimo dalla difesa offerta dalle formiche, bisogna che la pianta instauri un rapporto di mutuo scambio con loro, offrendo a sua volta nutrimento e/o siti di nidificazione. Si potrebbe sfruttare l'unicità del rapporto e utilizzare le piante in simbiosi mutualistica come veicolo di trasporto delle formiche ed estendere la loro azione a tutta la coltivazione di interesse. Questo dovrebbe essere accompagnato e supportato da una costante ricerca e approfondimento delle dinamiche relazionali che caratterizzano il mutualismo, per cercare di comprendere i complessi meccanismi ecologici,

biologici, fisiologici e molecolari che li regolano e sfruttarli a nostro vantaggio per un'agricoltura sostenibile.

## 1.8 Scopo del progetto

Il progetto si inserisce all'interno del PRIN "Partner manipulation in plant-insect relationship", il cui scopo è quello di indagare l'ipotesi che i composti neuroattivi prodotti dalle piante si siano evoluti non soltanto come deterrente per gli erbivori ma anche come strumento di manipolazione del comportamento animale da parte degli organismi vegetali. La relazione mutualistica pianta-formica offre un modello di studi adatto a testare tale ipotesi.

All'interno di tale progetto, la presente tesi ha cercato di (i) investigare la natura dei nettari extraflorali e (ii) e le modalità di percezione e risposta della pianta alla visita delle formiche, attraverso l'identificazione di probabili cambiamenti fisiologici, elettrofisiologici, anatomici e biochimici.

Nel dettaglio, per l'analisi della natura dei nettari, la sperimentazione ha previsto:

- l'acquisizione di segnali elettrici extracellulari a singolo e a doppio elettrodo. Questo permette di osservare se il nettario extraflorale percepisce e risponde prontamente alla stimolazione meccanica da parte delle formiche con un segnale di natura elettrica, e se la probabile insorgenza di un segnale elettrico possa propagarsi nelle regioni circostanti;
- l'acquisizione di segnali elettrici extracellulari a singolo elettrodo con l'utilizzo di inibitori per canali ionici. I canali ionici sono tipicamente coinvolti nella generazione di una risposta di natura elettrica, per cui con questa metodologia è possibile identificare i principali ioni potenzialmente coinvolti nella risposta elettrica da parte del nettario extraflorale;
- l'acquisizione di segnali extracellulari spontanei al MEA (Multi-Electrode Array Technology) del nettario extraflorale, in comparazione con l'attività elettrica spontanea della foglia di *Vicia faba* come tesi controllo. Con l'utilizzo del MEA è possibile registrare l'attività elettrica extracellulare spontanea che caratterizza un tessuto vegetale, come appunto il nettario extraflorale, senza la stimolazione meccanica dello stesso. Questo ci permette di caratterizzare meglio la natura elettrogenica del nettario, di metterla a confronto con l'attività elettrica spontanea di un altro tessuto come quello fogliare e di evidenziarne l'unicità;

- la captazione di segnali elettrici spontanei al MEA del nettario extrafiore con l'applicazione di inibitori per canali ionici. Anche questa prova è finalizzata nella comprensione delle specie ioniche responsabili dell'insorgenza di un segnale elettrico spontaneo.

A fine di osservare possibili cambiamenti di diversa natura nei nettari extrafioreali come conseguenze della simbiosi mutualistica, è stato allestito un setup in cui le piante potevano entrare in contatto con un formicaio completo (regina e operaie), in una camera di crescita, attraverso il quale confrontare le piante visitate con le piante non visitate dalle formiche. È stata eseguita un'analisi ultrastrutturale delle cellule dei tricomi secernenti che caratterizzano i nettari visitati e non attraverso il microscopio elettronico a trasmissione. Questo ci ha permesso di identificare nel dettaglio le risposte e gli adattamenti strutturali intracellulari che avvengono nelle cellule dei tricomi come risposta al rapporto mutualistico con le formiche.

Lo studio della percezione e risposta delle piante alla presenza delle formiche si è incentrato poi sull'analisi delle sostanze terpeniche, potenziali metaboliti secondari implicati in una comunicazione chimica pianta-insetto, attraverso le seguenti procedure sperimentali:

- osservazione al microscopio ottico di sezioni trasversali degli EFNs con applicazione del colorante NADI, seguite da una quantificazione. Il NADI è un colorante specifico per le sostanze terpeniche, ed aiuta nell'identificazione e quantificazione delle vescicole contenenti le sostanze;
- osservazione al confocale di sezioni trasversali dei nettari attraverso l'autofluorescenza delle sostanze terpeniche, seguite da analisi quantitative. Questo permette di convalidare le osservazioni e quantificazioni ottenute dall'applicazione del NADI;
- estrazioni delle sostanze terpeniche e quantificazione dell'assorbanza.

A queste si sono aggiunte indagini sulle sostanze lipidiche, elementi importanti per il metabolismo di cellule secernenti come i tricomi che caratterizzano i nettari extrafioreali. Sono state effettuate le seguenti analisi:

- osservazione al confocale dei nettari extrafioreali interi con applicazione del colorante BODIPY, specifico per i lipidi neutri. In questo modo è possibile osservare se esiste una differenza nell'accumulo e di distribuzione delle riserve lipidiche tra il nettario extrafioreale e le zone ad esso circostanti;
- osservazioni al confocale di sezioni trasversali dei nettari extrafioreali con applicazione del colorante Rosso Nilo, seguite da quantificazioni delle sostanze. Anche il Rosso Nilo è specifico

per lipidi neutri, ma la sezione trasversale in questo caso ci mostra come tali sostanze possano essere distribuite nei tessuti che caratterizzano il nettario extraflorale;

- quantificazione dei lipidi al confocale tramite autofluorescenza, per convalidare i risultati sopra ottenuti;
- quantificazione dei corpi lipidici tramite microscopia elettronica a trasmissione (TEM). L'analisi ultrastrutturale dei tricomi dei EFNs ci permette di approfondire l'indagine sulle modalità di risposta di queste strutture secernenti alla presenza e stimolazione da parte delle formiche.

L'allestimento delle due tesi sperimentali ha permesso inoltre di approfondire gli studi elettrofisiologici con altre due metodologie di indagine: la comparazione al confocale delle sezioni dei nettari extraflorali con l'applicazione del colorante DiBAC4, utilizzato nella rilevazione di attività bioelettrica nelle cellule animali e vegetali, e il monitoraggio a lungo termine di segnali elettrici intracellulari (resistenza) per monitorare l'eventuale alterazione dello stato fisiologico delle piante nel tempo.

Per completare lo studio sugli effetti del mutualismo sulle piante di *V. faba* sono stati esaminati i principali parametri morfologici, come peso secco e peso fresco dell'apparato radicale, fogliare e del fusto, area fogliare, dimensioni dei nettari extraflorali e scambi gassosi.

L'utilizzo della *Vicia faba* è stato dettato dalla necessità di lavorare con una pianta erbacea mirmecofila il cui ciclo colturale fosse adatto alle tempestiche del programma di sperimentazione. Inoltre la fava, come si riporta nel paragrafo 1.3, è una delle principali leguminose che hanno caratterizzato la storia dell'agricoltura grazie alle proprietà nutritive dei semi, alle condizioni di crescita che la rendono adatta alla coltivazione su un ampio intervallo di latitudini e ai suoi molteplici usi e benefici. Queste caratteristiche hanno guidato il team di ricerca nella sua selezione come specie modello.

## 2. Materiali e metodi

### 2.1 Materiale vegetale e condizioni di crescita

I semi di *Vicia faba* (varietà *maior*) utilizzati nei tre anni di sperimentazione sono stati reperiti dal Consorzio Agrario di Firenze. Per favorire la germinazione sincrona e dimezzarne il tempo, i semi sono stati precedentemente sottoposti a vernalizzazione, poi idratati e fatti germinare su carta costantemente imbevuta di acqua in verticale per garantire la costante idratazione. La germinazione è stata effettuata in camera di crescita, al buio, con una temperatura media controllata di 23°C e una umidità pari al 50%. Alla comparsa della radice primaria, i germogli delle stesse dimensioni in parte aerea e radice sono stati trasferiti all'interno di vasi contenenti ciascuno circa 150 gr di terriccio universale (Vigorplant, concime minerale composto da N, P, K e microelementi; pH: 5,8-6,8; CE 0,30 – 0,50 dS/m), precedentemente sterilizzato in autoclave per 40 minuti. Le piante sono state irrigate una volta a settimana con 120 mL di acqua per vaso. Le piante sono state cresciute con un ciclo giorno/notte corrispondente a 16 ore di luce e 8 ore di buio (long day conditions), con una temperatura compresa tra i 22 e i 25° C e una umidità media del 50%.

### 2.2 Indagini elettrofisiologiche del nettario extrafiore

In letteratura sono riportati due principali metodologie di indagine elettrofisiologica delle piante: la prima prevede la captazione dei segnali elettrici extracellulari, mentre la seconda si basa sulla captazione dei segnali elettrici intracellulari (Fromm *et al.*, 2007). Entrambe le metodologie richiedono l'utilizzo di micro-elettrodi ed entrambe permettono di studiare sia l'attività elettrica spontanea e sia la sua alterazione in risposta ad uno stimolo.

### 2.2.1 Acquisizione a singolo elettrodo dei segnali elettrici extracellulari indotti da uno stimolo meccanico

L'elettrodo è un conduttore che fa passare una corrente elettrica da un mezzo all'altro, solitamente da una fonte di alimentazione a un dispositivo o materiale, che nel nostro caso è rappresentato dal tessuto vegetale. Il trasporto della corrente è deputato al moto degli ioni. Infatti, i micro-elettrodi utilizzati nella sperimentazione, preparati in laboratorio partendo da micro-capillari di vetro dal diametro di 0,2 mm, sono stati riempiti con una soluzione salina di cloruro di potassio (KCl) a 10 mM e con agar al 0,5%.

Lo stimolo meccanico che il nettario extrafiorente ha ricevuto è uno stimolo semi-naturale, ed è stato realizzato immobilizzando una formica all'apice di un bastoncino di legno con della plastilina, lasciando la testa libera di muoversi e dunque di mordere il tessuto nettario (Fig. 5b).

Una piccola goccia di gel specifico per la trasmissione elettrica dei segnali è stata posizionata su di una piccola area del nettario extrafiorente (Fig. 5a), e al suo interno è stata inserita la punta dell'elettrodo che capta le variazioni del potenziale elettrico extracellulare. Un secondo elettrodo funge da reference, il quale, immerso in una soluzione Basic Salt Medium (BSM, 1 mM di KCl e 0,1 mM di  $\text{CaCl}_2$ ), chiude il circuito elettrico. Dalla figura 5b è possibile osservare il set-up completo allestito in laboratorio e lo stimolo meccanico del nettario. La porzione di stelo della pianta con stipula e nettario extrafiorente è stata immersa nella soluzione BSM insieme al reference all'interno della cuvetta; con l'aiuto di un apposito nastro adesivo i margini della stipula sono stati fissati alla cuvetta in modo tale da rendere la superficie del nettario ben ferma per il posizionamento della goccia di gel e successivamente dell'elettrodo al suo interno.

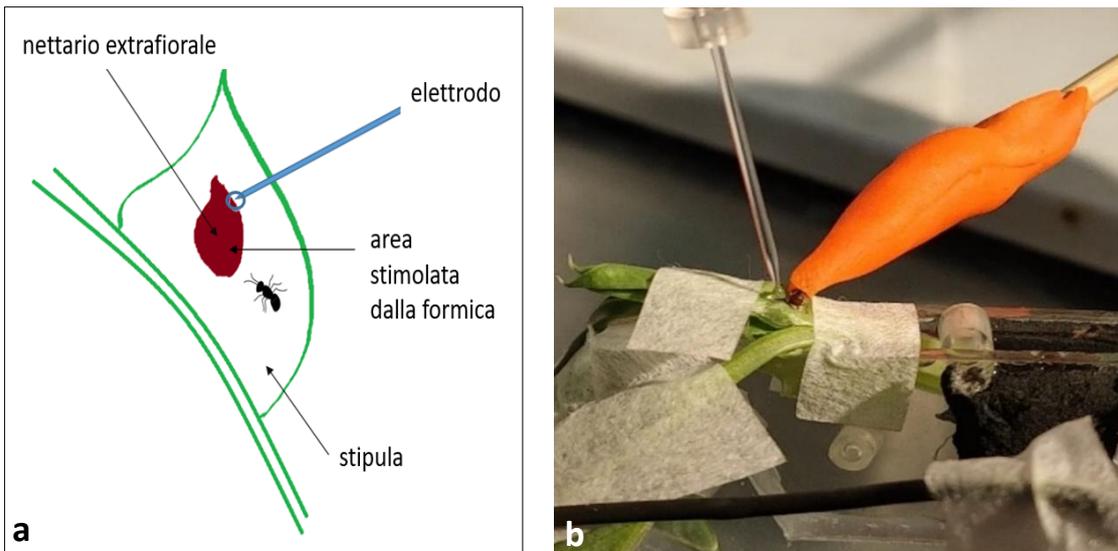


Figura 5: set-up sperimentale per l'acquisizione dei segnali elettrici extracellulari a singolo elettrodo indotti da uno stimolo meccanico. 5a) rappresentazione grafica del disegno sperimentale. 5b) allestimento dell'esperimento in laboratorio con l'applicazione dello stimolo meccanico al nettario extrafioreale.

L'attività elettrica extracellulare del nettario e la sua alterazione vengono visualizzate graficamente in tempo reale con il tempo sull'asse delle ascisse e il potenziale espresso in mV sull'asse delle ordinate, a tal fine ho utilizzato il software LabScribe2 che è stato impostato per acquisire 50 dati al secondo. Sono state effettuate 50 acquisizioni del segnale extracellulare a singolo elettrodo. Ogni prova ha avuto una durata di 5 minuti: i primi 2 minuti sono stati necessari per la stabilizzazione del segnale; a partire dal terzo minuto il EFN è stato stimolato con un morso della formica e l'acquisizione è proseguita fino allo scadere del quinto minuto. Tale approccio permette di acquisire e discriminare anche eventuali segnali di depolarizzazione spontanei.

## 2.2.2 Acquisizione a singolo elettrodo dei segnali elettrici extracellulari: prove supplementari

Per meglio caratterizzare la natura elettrogenica del nettario extrafioreale sono state programmate quattro prove supplementari che mirano ad indagare sia la possibilità che la stimolazione di una regione diversa dal EFN generi la stessa risposta elettrica registrata sullo stesso (I e II test supplementare (Fig. 6 e 7)) ma anche la possibilità che ci sia una propagazione del segnale

dal nettario alla stipula fino al fusto (III e IV test supplementare (Fig. 8 e 9)). Le quattro prove supplementari sono state le seguenti:

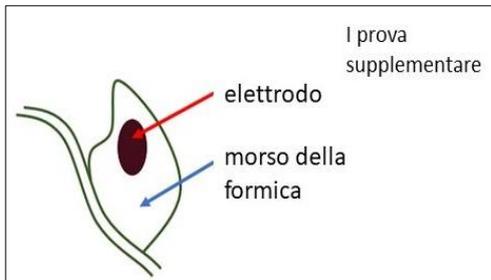


Figura 6: set-up della prima prova supplementare

1) nella prima prova supplementare l'elettrodo per l'acquisizione del segnale elettrico è stato mantenuto nella posizione originale, ovvero sul nettario extrafiore, ma lo stimolo semi-naturale della formica è stato applicato in un punto nell'area della stipula;

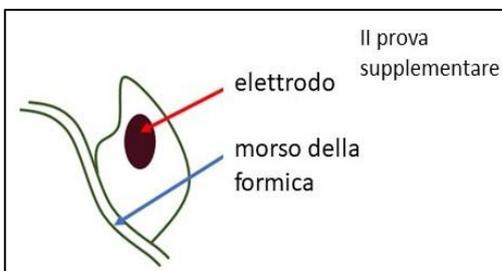


Figura 7: set-up della seconda prova supplementare

2) nella seconda prova l'acquisizione del segnale avviene sempre sul nettario ma lo stimolo viene applicato alla porzione di fusto adiacente la stipula;

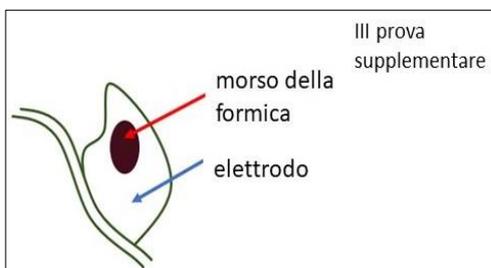


Figura 8: set-up della terza prova supplementare

3) nella terza prova supplementare il set-up è stato invertito rispetto alle prime due prove controllo. L'elettrodo per l'acquisizione del segnale viene posizionato sulla stipula a 0.5 cm di distanza dal nettario e lo stimolo viene applicato sul nettario extrafiore;

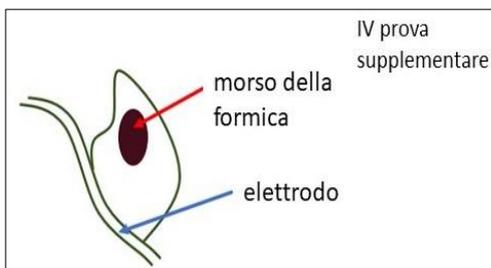


Figura 9: set-up della quarta prova supplementare.

4) nella quarta prova supplementare l'elettrodo per l'acquisizione del segnale viene posizionato sul fusto adiacente la porzione di stipula e lo stimolo applicato al nettario.

Per ogni prova controllo sono state effettuate 10 registrazioni dalla durata di 5 minuti. Come per il set-up originale, anche qui sono stati lasciati i primi due minuti privi di stimolo in modo tale da avere una buona stabilizzazione del segnale, all'inizio del terzo minuto è stato applicato lo stimolo per poi lasciare gli ultimi minuti di registrazione per eventuali segnali spontanei.

### 2.2.3 Acquisizione a doppio elettrodo dei segnali elettrici extracellulari indotti da uno stimolo meccanico

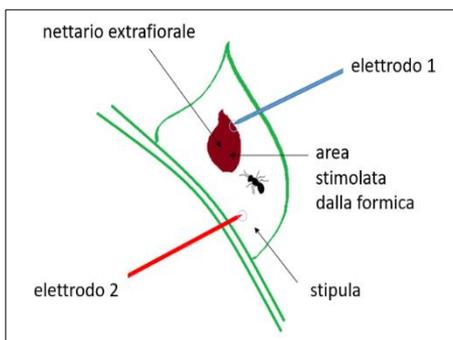


Figura 10: set-up sperimentale per la captazione dei segnali elettrici extracellulari a doppio elettrodo.

Con l'utilizzo di due micro-elettrodi deputati alla acquisizione del segnale è stato possibile approfondire ulteriormente aspetti legati alla sua propagazione. Come si osserva in figura 10, al set-up originale è stato aggiunto un secondo elettrodo a 0,5 cm di distanza dal nettario extrafioreale. La procedura è rimasta invariata: ogni prova ha avuto una durata di cinque minuti, dove al terzo minuto è stato applicato lo stimolo. Anche qui sono state effettuate dieci

misurazioni.

### 2.2.4 Acquisizione dei segnali elettrici extracellulari spontanei tramite Multielectrode Array Methodology

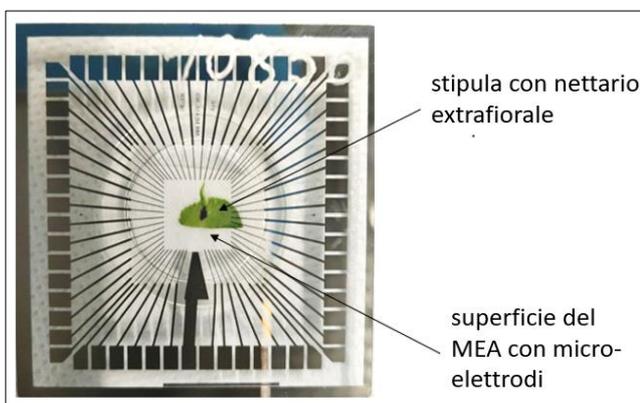


Figura 11: sistema di micro-elettrodi del MEA con campione di stipula e nettario extrafioreale posizionati su di essi per la captazione dei segnali elettrici spontanei.

L'impiego della Multielectrode-Array-Technology (MEA) permette di registrare l'attività elettrica extracellulare, indotta o spontanea, di una cellula o di una popolazione di cellule grazie al contatto con un sistema di micro-elettrodi (Masi *et al.*, 2012). Come mostra la figura 11, la stipula contenente il nettario extrafioreale è stata recisa e appoggiata

sulla superficie di vetro sulla quale sono posizionati i micro-elettrodi. Affinché i tessuti vegetali rimangano integri e vitali i campioni vengono immersi in circa 2 ml di soluzione BSM che coprono interamente la stipula. Lo scopo è stato quello di registrare l'eventuale attività elettrica spontanea delle cellule che caratterizzano il nettario extrafiore non visitato con l'allestimento di 20 prove, e la successiva comparazione dell'attività elettrica spontanea registrata su 20 nettari extrafioreali visitati dalle formiche per comprendere se la simbiosi possa causare un cambiamento elettrofisiologico di adattamento allo stimolo meccanico. Ulteriore obiettivo è stato osservare se l'attività elettrica spontanea è una caratteristica specifica del nettario extrafioreale oppure se fosse una proprietà intrinseca simile a quella di altri tessuti vegetali della pianta. Per questo, con le medesime modalità appena descritte, sono state allestite 20 prove per la misurazione dell'attività elettrica spontanea della pagina superiore della foglia.

Ogni prova ha avuto una durata di 10 minuti, durante i quali l'attività elettrica è stata registrata e monitorata grazie al software MC Rack (Multichannel Systems), che mostra simultaneamente i potenziali elettrici captati dai 60 elettrodi (sampling rate di 5000 segnali al secondo). L'attività elettrica spontanea si manifesta come picchi di depolarizzazione o iperpolarizzazione del segnale. I picchi e loro caratteristiche spaziotemporali sono stati estratti con MC Rack ed analizzati con il programma NeuroExplorer, che ha permesso di quantificare il numero di depolarizzazioni al secondo.

Con un t test non parametrico è stato effettuato un confronto sul numero medio di depolarizzazioni spontanee al secondo registrate per ciascuna tesi con l'utilizzo del programma GraphPad (P value < 0,05).

## 2.2.5 Applicazione degli inibitori nell'acquisizione a singolo elettrodo dei segnali elettrici extracellulari

Come numerosi studi riportano, la generazione e la propagazione del segnale elettrico sono strettamente legate all'attivazione o all'inibizione dei principali canali ionici presenti nella membrana citoplasmatica delle cellule vegetali (Farmer *et al.*, 2020). Per cui, per individuare la tipologia di canali coinvolti nella generazione del segnale nel nettario extrafioreale le acquisizioni extracellulari a singolo elettrodo precedenti sono state ripetute con l'applicazione di cinque specifici inibitori dei canali

ionici coinvolti nella comunicazione elettrica mediata da sodio, potassio, calcio e ATP. Gli inibitori sono i seguenti:

- cloruro di cesio (CsCl, PM: 168,36 g/mol): inibitore dei canali del Na e del K;
- dinitrofenolo (DNP, PM: 184,11 g/mol): inibitore della sintesi di ATP;
- trietanolamina (TEA, PM: 149,2 g/mol): inibitore dei canali del Na;
- gadolinio (GAD, PM: 157,25 g/mol): inibitore dei canali del Ca;
- acido etilglicole-bis (2-amminoetiletere) (EGTA, PM: 380,35 g/mol): chelante degli ioni bivalenti.

Ciascun inibitore è stato preparato utilizzando acqua milliQ come solvente fino a concentrazione 5 mM e 100 mM. Data la mancanza in letteratura di esempi di applicazione degli inibitori ai nettari extraflorali, sono state sperimentate quattro tecniche:

- 1) applicazione di una goccia di inibitore direttamente sul nettario extraflorale con due tempi di attesa, 1 ora e 3 ore, prima di effettuare le misure;
- 2) annaffiatura delle piante con inibitore diluito in 500 ml di acqua;
- 3) immersione dello stelo apicale reciso con palchi e nettari extraflorali in soluzione con l'inibitore per 1 ora e per 3 ore;
- 4) infiltrazione della stipula: con la punta di un puntale di plastica si applica una piccola scalfittura superficiale sulla parte abaxiale della stipula. In questa zona attraverso l'utilizzo di una siringa da 1 ml senza ago si fa pressione per permettere alla soluzione di entrare e diffondere nei tessuti vegetali (Fig. 12). Dopo due ore dall'applicazione vengono eseguite le misure come descritto nel paragrafo 2.2.1.



*Figura 12: tecnica dell'infiltrazione. Una volta eseguita la scalfittura della stipula, si procede con l'iniezione della soluzione con inibitore.*

## 2.2.6 Applicazione degli inibitori nell'acquisizione dei segnali elettrici extracellulari spontanei

Per approfondire ed ampliare la comprensione dell'attività elettrica spontanea del nettario extrafiore, e per meglio comprendere le dinamiche che sottendono la generazione di tali segnali elettrici, sono state eseguite delle prove al MEA con previa applicazione di specifici inibitori. 20 stipule sono state infiltrate con GAD (0,1 M) e altre 20 con EGTA (0,1 M). Trascorse le due ore di attesa la singola stipula con nettario extrafiore è stata recisa, posizionata sulla superficie di micro-elettrodi del MEA, fissata e coperta con soluzione BSM. I segnali di ciascun campione sono stati acquisiti per 10 minuti. Quindi è stato confrontato il numero medio di depolarizzazioni spontanee al secondo con un t test con il programma GraphPad (P value < 0,05).

## 2.2.7 Monitoraggio della resistenza intracellulare

Lo studio dei segnali elettrici intracellulari permette di osservare la presenza di eventuali alterazioni elettrofisiologiche a lungo termine dovute alla presenza e all'interazione delle formiche con i nettari extrafiore della pianta. Per questa prova sono state messe a confronto piante visitate dalle formiche e piante non visitate.

Come riporta lo studio di Comparini *et al.* (2020) la strumentazione utilizzata per questa tipologia di indagine consiste in un multimetro digitale, modello PXI-1033 (National Instruments Corporation), che consente di misurare parametri elettrofisiologici come la resistenza (ohm,  $\Omega$ ). Il dispositivo è dotato di 10 coppie di micro-elettrodi in acciaio inossidabile ultrasottili; in ogni coppia i due elettrodi sono ad una distanza fissa di 9 mm l'uno dall'altro.



Figura 13: disposizione degli elettrodi per la captazione dei segnali elettrici intracellulari.

Una volta che le piante hanno raggiunto il pieno sviluppo del secondo palco di foglie con la rispettiva coppia di stipule e nettari extraflorali, una coppia di elettrodi è stata inserita nel fusto della pianta a metà tra il primo e il secondo palco. Affinché gli elettrodi rimangano inseriti correttamente durante l'intero svolgimento della prova, essi sono stati precedentemente fissati su di un supporto di legno, il quale a sua volta viene inserito nel terreno accanto al fusto della pianta (Fig. 13). Le 10 coppie di elettrodi sono state suddivise tra le due tesi, per cui sono state analizzate 5 piante visitate dalle formiche e 5 piante non visitate.

La prova è durata 14 giorni, programmati nel seguente modo: nei primi tre giorni si è attesa la cicatrizzazione delle ferite causate dall'inserimento dei micro-elettrodi. In questo intervallo le piante sono state tenute insieme all'interno di un unico contenitore. Dal quarto giorno in poi è iniziata la registrazione dei parametri elettrofisiologici (resistenza,  $\Omega$ ) con una presa dati impostata ogni tre secondi. Al settimo giorno, 5 delle 10 piante di fava sono state trasferite a all'interno del contenitore con la colonia di formiche per permettere l'instaurarsi della simbiosi mutualistica. L'acquisizione della resistenza elettrica è proseguita per gli ultimi sette giorni.

Per ogni tesi è stata calcolata la resistenza media delle piante durante il giorno e durante la notte e confrontato le medie delle resistenze notturne con il t-test ( $P$  value < 0,05).

## 2.3 Indagini di microscopia

### 2.3.1 Analisi istochimica

L'analisi istochimica del nettario extraflorale di *Vicia faba* è stata eseguita per poter meglio comprendere la natura morfologica e chimica nei tricomi ghiandolari secernenti e per poter osservare se e quali sono le conseguenze metaboliche della costante stimolazione dei nettari stessi da parte delle formiche, come ad esempio variazioni in quantità e qualità di metaboliti primari e

secondari prodotti. Per tale scopo EFNs di piante visitate da formiche sono stati messi a confronto con EFNs di piante non visitate.

La stipula con nettario extrafioreale è stata recisa dal fusto e sezionata a fresco con l'ausilio del Oscillating Tissue Slicer OTS 500 (FHC for Electron Microscopy Sciences). Sono state eseguite 20 sezioni da 100  $\mu\text{m}$  per ciascuna tesi. Le sezioni sono poi state sottoposte ad una colorazione con NADI, per la rilevazione delle sostanze terpeniche (David & Carde, 1964). Il colorante è una soluzione di  $\alpha$ -Naftolo 1% in alcool 40% (0,5 ml), dimetil-parafenilendiamina cloridrato 1% in acqua (0,5 ml) e tampone fosfato 0,05 M pH 7,2 (49 ml). Le sezioni sono state incubate in questa soluzione al buio per circa 40 minuti, e dopo trasferite in acqua distillata per un lavaggio e montate sul vetrino portaoggetti. Le osservazioni sono state eseguite al microscopio ZEISS Axio Observer.

Le sostanze terpeniche, che in base alla loro natura chimica hanno una colorazione che va dal blu intenso al violetto, sono state quantificate con il programma Image-J. Nello specifico è stato calcolato il rapporto tra l'area occupata dalle vescicole contenenti le sostanze terpeniche ( $\mu\text{m}^2$ ) e l'area del tricoma ( $\mu\text{m}^2$ ), in modo tale da ottenere un dato quantitativo delle sostanze oggetto di analisi, seguita da una comparazione statistica tra le due tesi sperimentali con un t-test (P value < 0,0001). Sono stati analizzati 20 tricomi provenienti dal campionamento di 5 piante per ciascuna tesi.

### 2.3.2 Analisi ultrastrutturale

La morfologia dei tricomi secernenti del nettario extrafioreale è stata analizzata utilizzando un microscopio a trasmissione elettronica T.E.M. (JOEL JEM 1010 80 kV per indagare l'effetto della stimolazione meccanica del nettario da parte delle formiche a livello ultrastrutturale.

I passaggi per la preparazione e fissazione del campione sono stati i seguenti. Recisa la stipula, è stata ritagliata l'area intorno al nettario extrafioreale in modo tale da isolarlo il più possibile dai tessuti vegetali circostanti. Il materiale fresco è stato così prefissato in aldeide glutarica 2,5% in tampone fosfato 0,1 M a pH 6,8 per 24 ore e poi fissato in tetrossido d'osmio al 2% nello stesso tampone per 48 ore. Dopo un lavaggio in tampone il campione è stato disidratato attraverso passaggi seriali in una soluzione di acqua distillata ed etanolo a titolo crescente, partendo dal 30% fino ad arrivare all'alcool assoluto. L'ultima disidratazione del campione avviene con l'immersione in ossido di propilene. Terminata la procedura, inizia il processo di inclusione del campione in resina epossidica Spurr (Spurr, 1969) mediante passaggi successivi in miscele propilene/resina nel rapporto 1:1 e 1:2.

Per terminare, sono stati eseguiti due passaggi di un'ora in resina pura a temperatura ambiente e in termostato a 45°C. La polimerizzazione avviene in stufa a 70°C per una durata di nove ore (Renna *et al.*; 2018).



Figura 14: inclusione in resina del nettario extrafloriale.

Il campione di nettario extrafloriale incluso in resina (Fig. 14) è stato poi sezionato con l'ultramicrotomo Ultracut E Reichert-Jung a lama di diamante. Le sezioni ultrafini, dallo spessore di 0,5 µm, sono state posizionate su retini ricoperti da una pellicola di Formvar (paravinilformaldeide) e sottoposte a diretta osservazione al microscopio elettronico a trasmissione Philips EM 300. Dieci nettari extrafloriali per tesi sono stati inclusi in resina e analizzati.

La caratterizzazione ultrastrutturale dei tricomi secernenti ha previsto la quantificazione di strutture cellulari con l'ausilio del software ImageJ-win64 Fiji e la successiva analisi statistica dei dati tra le due tesi sperimentali con il programma GraphPad. Le strutture cellulari analizzate sono le seguenti:

- corpi elettron-densi. Per ciascuna tesi è stato calcolato il rapporto % tra l'area dei corpi elettron-densi sull'area della cellula del tricoma e le aree dei singoli corpi. I valori medi dei due parametri registrati sono stati analizzati con un t-test ( $P < 0,05$ );
- spessore della parete cellulare. È stata eseguita una comparazione delle medie dei valori ottenuti dalle due tesi con un t-test ( $P < 0,0001$ );
- vescicole secernenti. Anche qui è stato calcolato il rapporto % tra l'area delle vescicole secernenti su un'area di 70 µm<sup>2</sup> (unità arbitraria). È stato eseguito un t-test ( $P < 0,0001$ ) per la comparazione delle medie.

### 2.3.3 Acquisizioni al microscopio confocale

#### 2.3.3.1 Analisi delle proprietà bioelettriche del nettario extrafloriale

Attraverso l'utilizzo della microscopia confocale è stato possibile qualificare ulteriormente la natura elettrogenica del nettario extrafloriale di *Vicia faba*. Per questa particolare analisi abbiamo utilizzato il colorante DiBAC4, Bis-(1,3-Dibutylbarbituric Acid) Trimethine Oxonol (PM = 516,64

gr/mol). Il DiBAC4 è classificato come “reporter di bioelettricità fluorescente” (FBR), ed è applicato a casi studio dove il fenomeno della bioelettricità è dato da un insieme di processi cellulari che coinvolgono ioni o flussi ionici (Adams *et al.*, 2012). Viene anche definito come colorante del potenziale di membrana traslazionale, in quanto risponde ad un cambiamento di potenziale ridistribuendosi all’interno della cellula stessa (Epps *et al.*, 1994). L’intensità della fluorescenza è direttamente proporzionale al numero di molecole del colorante nella membrana cellulare (Adams *et al.*, 2012). Quando la membrana cellulare si depolarizza il DiBAC4 entra nella cellula legandosi alle proteine intracellulari o alla membrana stessa, esibendo così una maggiore fluorescenza nello spettro del rosso (Epps *et al.*, 1994).

Il campione di EFN, visitati e non visitati, sono stati fissati con paraffina e sezionati trasversalmente con uno spessore di 100 µm. Le sezioni così ottenute sono state immerse nel colorante DiBAC4 (1 µl dalla soluzione stock 5 mM diluito in 1 ml di ½ LS) per cinque minuti al buio. Le sezioni così trattate sono state successivamente risciacquate con LS e posizionate sul vetrino portaoggetti.

Per la quantificazione della fluorescenza corrispondente all’attività bioelettrica del tessuto sono state selezionate aree di 30 µm<sup>2</sup> (unità arbitraria) posizionate lungo la pagina superiore della sezione, che contiene il nettario extrafiore, e lungo la pagina inferiore. Il software utilizzato è ImageJ-win64 Fiji. In tal modo è stato possibile paragonare statisticamente l’attività bioelettrica circoscritta al tessuto nettario sia con le aree circostanti che con la pagina inferiore della sezione stessa per ciascuna tesi sperimentale. È stato infine possibile paragonare l’attività elettrogenica del nettario visitato dalle formiche con il nettario non visitato.

Per l’analisi statistica è stato utilizzato il t-test per il confronto dell’attività bioelettrica media (P value < 0,0001).

### 2.3.3.2 Analisi dei lipidi

Per approfondire la caratterizzazione dei tricomi secernenti e le possibili alterazioni delle vie metaboliche a seguito dell’interazione mutualistica con le formiche sono state condotte delle osservazioni al confocale con l’applicazione di due coloranti: BODIPY 505/515 e Rosso Nilo. Tali reagenti sono coloranti lipofili utilizzati appunto per la rilevazione di sostanze lipidiche mediante microscopia a fluorescenza. L’analisi ha previsto due tipologie di osservazione: nettari extrafiore

non visitati interi e nettari extraflorali visitati e non visitati sezionati. La stipula con EFN non visitato è stata completamente recisa e immersa in una soluzione preparata sciogliendo il BODIPY in dimetilsolfossido (DMSO) per ottenere una soluzione 50µg/ml. Lasciata al buio per cinque minuti, la stipula è stata direttamente posizionata sul vetrino portaoggetti e osservata al confocale utilizzando parametri di eccitazione/emissione rispettivamente pari a 502/510 nm. Le sezioni da 100 µm degli EFNs visitati e non visitati sono state immerse in una soluzione preparata aggiungendo 2 µl di colorante Rosso Nilo in 1 ml di LS. Lasciate al buio per cinque minuti, le sezioni sono state direttamente posizionate sul vetrino portaoggetti e osservate al confocale utilizzando parametri di eccitazione/emissione rispettivamente pari a 552/636 nm. Anche in questo caso, per la quantificazione abbiamo selezionato aree da 70 µm<sup>2</sup> (unità arbitraria). Sono state analizzate complessivamente 40 immagini per ciascuna tesi, ottenute dal campionamento di otto piante visitate e otto piante non visitate. La fluorescenza è stata quantificata con ImageJ-win64 Fiji, seguita da un t-test (P value < 0,0001).

### 2.3.3.3 Analisi dei terpeni

L'autofluorescenza emessa alla lunghezza d'onda di 670 nm delle sostanze terpeniche ne ha permesso la loro quantificazione all'interno dei tessuti di EFN visitati e non. Le immagini ottenute dalle due tesi sperimentali sono state analizzate e comparate selezionando aree da 70 µm<sup>2</sup> (unità arbitraria) all'interno dell'area dei tricomi, per il calcolo della fluorescenza abbiamo adoperato il programma NIS-Elements AR (Nikon). In totale sono state analizzate 20 immagini dei nettari extraflorali per ciascuna tesi, ottenute dal campionamento di dieci piante visitate e dieci piante non visitate. La autofluorescenza è stata quantificata con ImageJ-win64 Fiji, seguita da un t-test (P value < 0,0001).

## 2.4 Quantificazione dei terpeni per via spettrofotometrica

La quantificazione dei terpeni a livello dei tricomi secernenti condotta attraverso indagini istochimiche (vedi paragrafo 2.3.1) è stata affiancata dall'estrazione dei terpeni da tessuti freschi

utilizzando il protocollo messo a punto da Ghorai *et al.* (2012). Tale metodologia consente di stimare la concentrazione totale di terpenoidi utilizzando un monoterpene, il Linalool, come standard.

Gli EFN vengono isolati dai restanti tessuti vegetali della stipula collezionati in tubi da 2 ml e immediatamente congelati in azoto liquido. Successivamente i tessuti vengono omogenati con l'inserimento di tre biglie di ceramica e metanolo al 95% al Tissuelyser II per 5 minuti a 30 Hz. Rimosse le biglie i campioni vengono incubati per 48 ore a temperatura ambiente. Si procede poi con la centrifugazione per 15 minuti a 4.000 rpm con lo scopo di collezionare 200 µl supernatante in nuovi tubi da 2 ml. A quest'ultimo vengono aggiunti 1,5 ml di cloroformio, mescolati con l'ausilio dell'agitatore vortex e fatti riposare per 3 minuti. A questo punto vengono aggiunti 100 µl di acido solforico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), i campioni vengono successivamente incubati al buio per circa 2 ore. Alla fine dell'incubazione si preleva lo strato di colore viola formatosi in superficie e lo si mescola con 1,5 ml di metanolo al 95% con l'agitatore vortex. Si prelevano in fine 200 µl di soluzione per trasferirli nella piastra multi-pozzetto per la lettura dell'assorbanza a 538 nm allo spettrofotometro TECAN infinite M200. 200 µl di metanolo al 95% vengono utilizzati come bianco. Per la curva standard si procede con una serie di diluizioni del Linalool (97%, PM: 154,25 g/mol, d: 0,87 g/ml) da 100 mg/200 µl a 1 mg/200 µl (12,965 µM – 1,296 µM). La soluzione viene portata a volume finale di 200 µl con il metanolo al 95%.

La raccolta dei nettari extraflorali da entrambe le tesi sperimentali è avvenuta con due tempistiche differenti per monitorare nel tempo l'effetto sull'accumulo dei terpeni in presenza delle formiche e non: il primo campionamento è avvenuto dopo otto giorni di crescita per le piante controllo e di simbiosi mutualistica per le piante visitate; il secondo dopo quindici giorni. La prova è stata ripetuta sette volte.

Per l'analisi statistica è stato eseguito il t-test (P value < 0,0001) per la comparazione delle medie delle due tesi sperimentali.

## 2.5 Indagini morfologiche e fisiologiche

### 2.5.1 Disegno sperimentale

Per valutare gli effetti del mutualismo sulla morfologia delle piante di *Vicia faba* è stata confrontata la crescita delle piante visitate con la crescita delle piante non visitate dalle formiche all'interno di una camera di crescita con parametri di luce e temperatura controllati. Raggiunta la maturazione del secondo palco di foglie con la coppia di EFN ben sviluppati e maturi, 24 piante sono state divise nei due gruppi sperimentali. 12 di queste piante, sono state messe a contatto con la colonia di formiche allevata in laboratorio, mentre le altre 12 sono state cresciute senza le formiche (Fig. 15). La prova ha avuto una durata di quattro settimane. Per i primi 14 giorni ogni pianta è stata irrigata con 120 ml di acqua una volta a settimana, fino ad arrivare a 150 ml di acqua nelle ultime due settimane di sperimentazione. La prova è stata ripetuta tre volte.

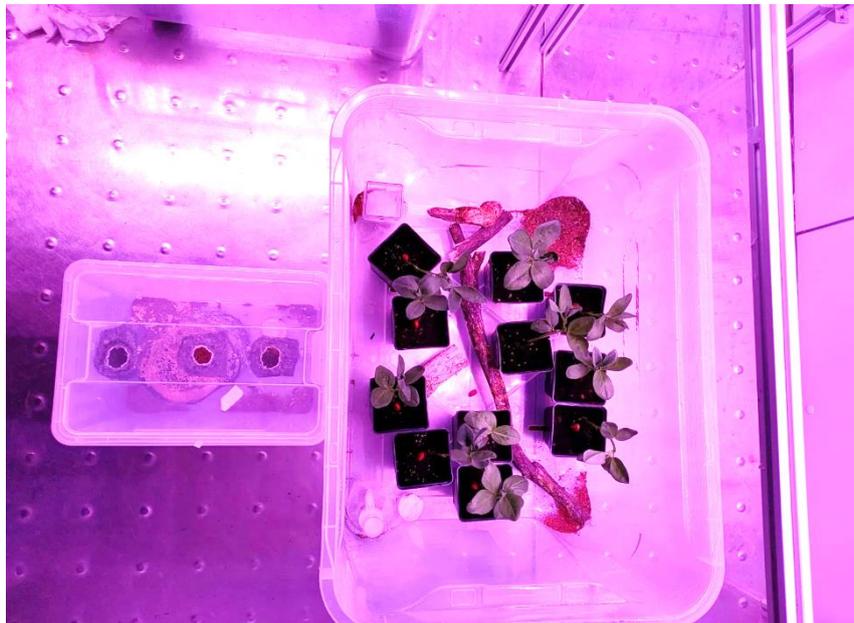


Figura 15: posizionamento delle piante di *Vicia faba* all'interno della colonia di *Crematogaster scutellaris*.

## 2.5.2 Campionamento e determinazione dei dati morfologici e fisiologici

All'inizio della prova sperimentale ( $t_0$ ), è stato effettuato un campionamento randomico di 4 piante di *Vicia faba* sulle 28 totali germinate al fine di rilevarne il peso fresco (FW) e il peso secco (DW). Il secondo campionamento ( $t_1$ ) è avvenuto a distanza di 14 giorni, prelevando 6 piante da ciascuna delle due tesi per effettuare le analisi morfologiche sia sulla parte aerea che radicale. Dopo 28 giorni, per le stesse finalità, sono state campionate le restanti 6 piante da ciascuna tesi.

Nei tre campionamenti ogni pianta è stata suddivisa in apparato radicale, con un taglio appena sopra il colletto, fusto con stipule e piccioli e apparato fogliare. Sono stati così analizzati il DW e il FW delle rispettive parti. Per ottenere il peso secco il materiale vegetale è stato posto in stufa a 50° C per una settimana fino al raggiungimento di un peso costante. A queste misurazioni si sono aggiunti parametri come l'altezza della pianta (cm), l'area fogliare (cm<sup>2</sup>) e l'area dei nettari extraflorali (mm<sup>2</sup>). Per queste ultime due le superfici delle varie sezioni vegetali sono rilevate tramite scanner 2D con apposito riferimento di misura, e le aree calcolate tramite image-J.

Prima del termine della prova sono state effettuate le misurazioni degli scambi gassosi delle foglie utilizzando il LiCor-6400 (LiCor Inc., Lincoln, NE, USA). Nel dettaglio sono stati misurati il tasso netto di fotosintesi (valori espressi in  $\mu\text{mol di CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), la conduttanza stomatica (valori espressi in  $\text{mmol di H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) e la concentrazione intercellulare della CO<sub>2</sub> (valori espressi in  $\mu\text{mol di CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) della foglia ben sviluppata del palco più giovane di ogni singola pianta di 6 piante di *V. faba*. Per l'analisi statistica dei dati è stato eseguito il t-test ( $P \text{ value} < 0,05$ ) per la comparazione delle medie dei parametri misurati.

## 2.6 Contributo della candidata alle attività

Gli esperimenti di natura elettrofisiologica sono stati allestiti all'interno del Laboratorio Internazionale di Neurobiologia Vegetale del dipartimento di Scienze e Tecnologie Agrarie, Alimentari, Ambientali e Forestali (DAGRI, Università degli studi di Firenze), e progettati dal team composto dai ricercatori del DAGRI, come la Prof.ssa Elisa Masi e la Dott.ssa Luciana Renna, e del Dipartimento di Biologia (Università degli studi di Firenze) con il Prof. Giovanni Stefano e la Prof.ssa Nadia Bazihizina.

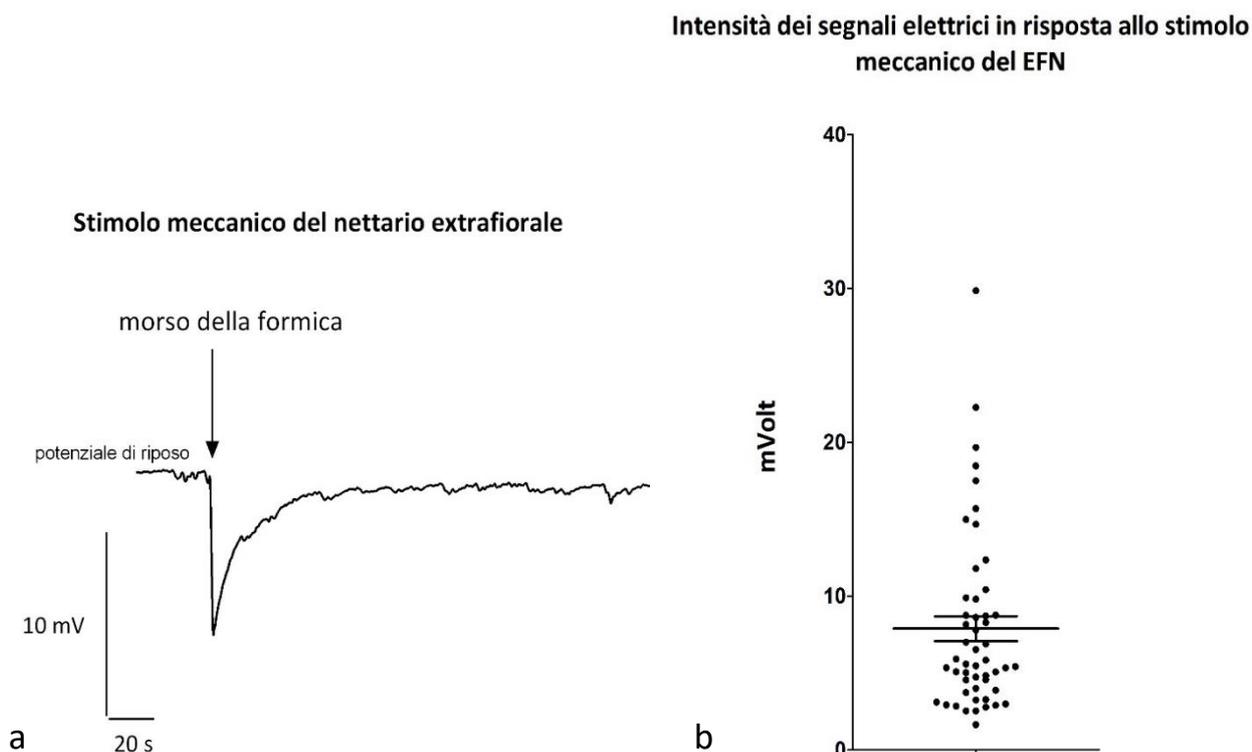
La captazione dei segnali elettrici in risposta al morso della formica e quelli di natura spontanea al MEA sono stati supervisionati dalla Prof.ssa Elisa Masi. Le indagini di microscopia e biochimica del nettario extraflorale sono state condotte con la supervisione della Dott.ssa Luciana Renna e del Prof. Giovanni Stefano. Le indagini al T.E.M. hanno previsto inoltre la collaborazione del Prof. Alessio Papini (Dipartimento di Biologia, Università degli studi di Firenze) e dei ricercatori Agnieszka Zienkiewicz e Krzysztof Zienkiewicz (Centro per le moderne tecnologie interdisciplinari, Università Niccolò Copernico, Polonia). Le prove morfo-fisiologiche sono state realizzate dalla candidata e supervisionate dal Dott. Diego Comparini e dalla Prof.ssa Nadia Bazihizina (DAGRI, Università degli studi di Firenze). L'analisi statistica dei dati è stata eseguita con la supervisione della Dott.ssa Luciana Renna e del Prof. Giovanni Stefano. I risultati sperimentali verranno presentati con la pubblicazione dell'articolo scientifico "Extrafloral nectaries cellular adaptation in *Vicia faba* during the interaction with *Crematogaster scutellaris*" sottomesso alla rivista Cell Discovery.

### 3. Risultati

#### 3.1 Indagini elettrofisiologiche

##### 3.1.1 Acquisizione a singolo elettrodo dei segnali elettrici extracellulari indotti da uno stimolo meccanico

La stimolazione del nettario extrafiore della *Vicia faba* indotta dal morso della formica ha generato una risposta elettrica che è risultata specifica e che è stata registrata come variazione di potenziale (VP) (Fig. 16a). Questo segnale consiste in una rapida depolarizzazione del potenziale di riposo di membrana seguito da una lenta e a volte irregolare ripolarizzazione (Fromm *et al.*, 2007). Il segnale di depolarizzazione registrato in seguito al morso della formica ha un'intensità media di  $7,875 \pm 5,80$  mV. Come descrivono Stahlberg *et al.* (2006) nei loro studi di elettrofisiologia, il VP varia in intensità in base all'intensità dello stimolo. Nel nostro caso la formica ha stimolato il nettario extrafiore con morsi più o meno intensi, che a loro volta hanno generato depolarizzazioni più o meno marcate. L'ampiezza del segnale più bassa registrata è stata di 1,63 mV mentre la più alta di 29,85 mV (Fig. 16b).



*Figura 16: risultati della stimolazione del nettario extrafiore con il morso della formica. a) segnale di depolarizzazione del potenziale di riposo di membrana registrato sul nettario extrafiore in seguito al morso; b) distribuzione dell'intensità dei segnali di depolarizzazione (mVolt) registrati (n = 50).*

### 3.1.2 Acquisizione a singolo elettrodo dei segnali elettrici extracellulari: prove supplementari

Dalle prove supplementari di acquisizione del segnale elettrico extracellulare, eseguite su dieci repliche, sono stati ottenuti i seguenti risultati:

- I prova supplementare: la stimolazione dell'area circostante il nettario extrafiore con il morso della formica non ha provocato alcun segnale di depolarizzazione, come avviene invece stimolando direttamente il nettario;
- II prova supplementare: la stimolazione della porzione di fusto adiacente la stipula con nettario extrafiore non ha portato ad alcun risultato; l'elettrodo di acquisizione posizionato sul nettario non ha registrato depolarizzazioni;
- III prova supplementare: l'elettrodo di acquisizione posizionato sulla stipula a 0,5 cm dal nettario extrafiore non ha registrato nessun segnale elettrico come risposta al morso della formica;
- IV prova supplementare: l'elettrodo di captazione posizionato sulla porzione di fusto adiacente alla stipula non ha registrato alcun segnale in seguito alla stimolazione del EFN.

### 3.1.3 Acquisizione a doppio elettrodo dei segnali elettrici extracellulari indotti da uno stimolo meccanico

I risultati ottenuti con le prove di controllo a singolo elettrodo, in particolar modo con la III prova, sono stati confermati da quelli ottenuti dagli esperimenti a doppio elettrodo. Nelle 10 prove effettuate, il morso della formica del nettario extrafiore ha generato una risposta di depolarizzazione registrata sul nettario stesso (Fig. 17b), mentre contemporaneamente, non è stata registrata alcuna risposta dal secondo elettrodo posizionato sulla stipula (Fig. 17a).

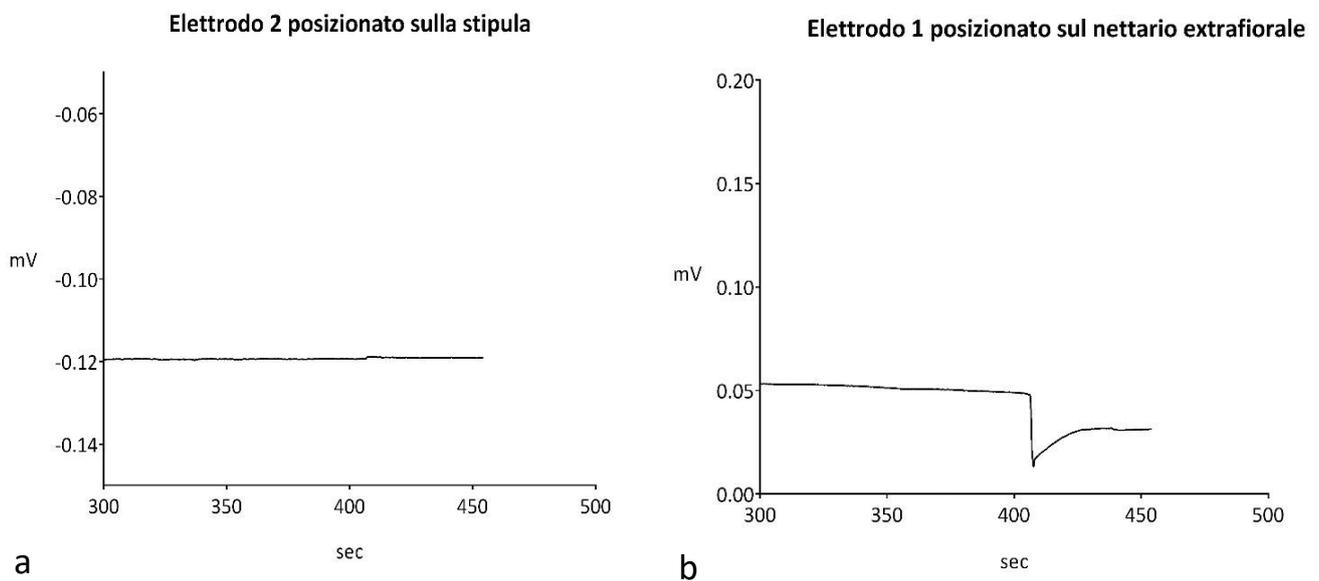
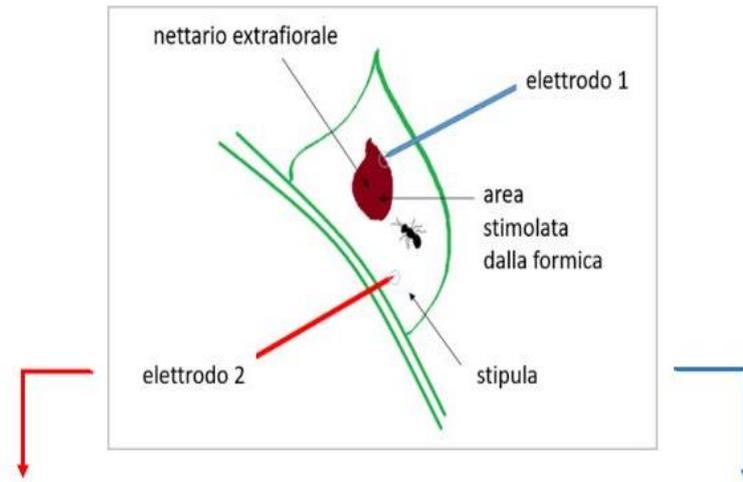


Figura 17: acquisizione dei segnali elettrici a doppio elettrodo in risposta allo stimolo del nettario extrafiore. a) la stimolazione del nettario extrafiore non ha provocato alcuna variazione del potenziale di membrana a riposo registrato dall'elettrodo 2 posizionato sulla stipula; b) l'elettrodo 1, posizionato sul nettario, ha registrato il segnale di depolarizzazione in seguito al morso della formica.

### 3.1.4 Acquisizione dei segnali elettrici extracellulari spontanei tramite Multielectrode Array Methodology

Come mostra il grafico nella figura 18a, il numero di depolarizzazioni al secondo tra il nettario extrafiore non visitato dalle formiche e la foglia sono statisticamente differenti. Sul nettario si ha

una media di  $0,040 \pm 0,008$  depolarizzazioni al secondo, mentre sulla pagina superiore della foglia  $0,020 \pm 0,004$  depolarizzazioni al secondo.

Anche dalla comparazione tra il nettario extrafiore visitato e non visitato abbiamo ottenuto una differenza statisticamente significativa. Come si osserva dal grafico in figura 18b, il numero medio di depolarizzazioni spontanee al secondo registrate sul nettario visitato è pari a  $0,025 \pm 0,004$ .

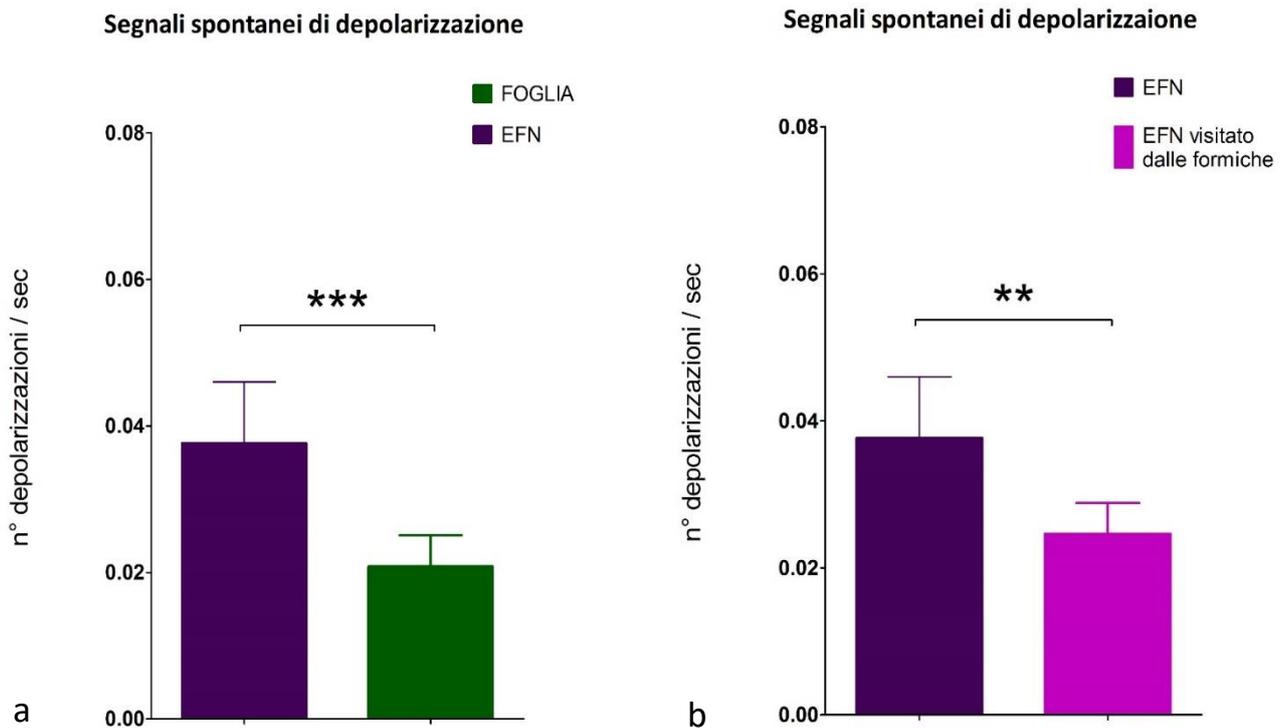


Figura 18: analisi statistica dei segnali spontanei di depolarizzazione registrati al MEA. a) numero dei segnali spontanei di depolarizzazione al secondo registrati sul nettario extrafioreale (EFN) e sulla foglia. Le barre ( $\pm$  errore standard, t test) indicano il numero medio di depolarizzazioni. Gli asterischi indicano il livello di significatività ( $n = 10$ ; \*\*\*,  $P$  value  $< 0,05$ ;  $t = 1,80$  e  $df=26$ ). b) numero dei segnali spontanei di depolarizzazione al secondo registrati sul nettario extrafioreale (EFN) e sul nettario extrafioreale visitato dalle formiche. Le barre ( $\pm$  errore standard, t test) indicano il numero medio di depolarizzazioni. Gli asterischi indicano il livello di significatività ( $n = 10$ ; \*\*,  $P$  value  $< 0,05$ ;  $t=1,39$  e  $df=26$ ).

### 3.1.5 Applicazione degli inibitori nell'acquisizione a singolo elettrodo dei segnali elettrici extracellulari

Negli esperimenti di acquisizione del segnale elettrico in seguito all'applicazione di inibitori, le diverse tecniche descritte (paragrafo 2.2.5, cap. Materiali e metodi) sono risultate inefficaci, ad eccezione dell'infiltrazione. Con questa tecnica è stato possibile iniettare gli inibitori selezionati direttamente nei tessuti vegetali senza danneggiarli.

Il trattamento con CsCl, DNP e TEA non ha avuto alcun effetto sul nettario extrafiore: la sua stimolazione da parte della formica ha sempre generato un segnale di risposta simile in intensità a quello registrato senza inibitori (controllo). Il GAD, specifico inibitore per i canali calcio, ha causato una evidente riduzione di intensità del segnale di depolarizzazione (Fig. 19), registrando una media di  $0,014 \pm 0,012$  mV su 10 prove eseguite.

### Stimolo del nettario extrafioreale con infiltrazione del GAD (0.1 M)

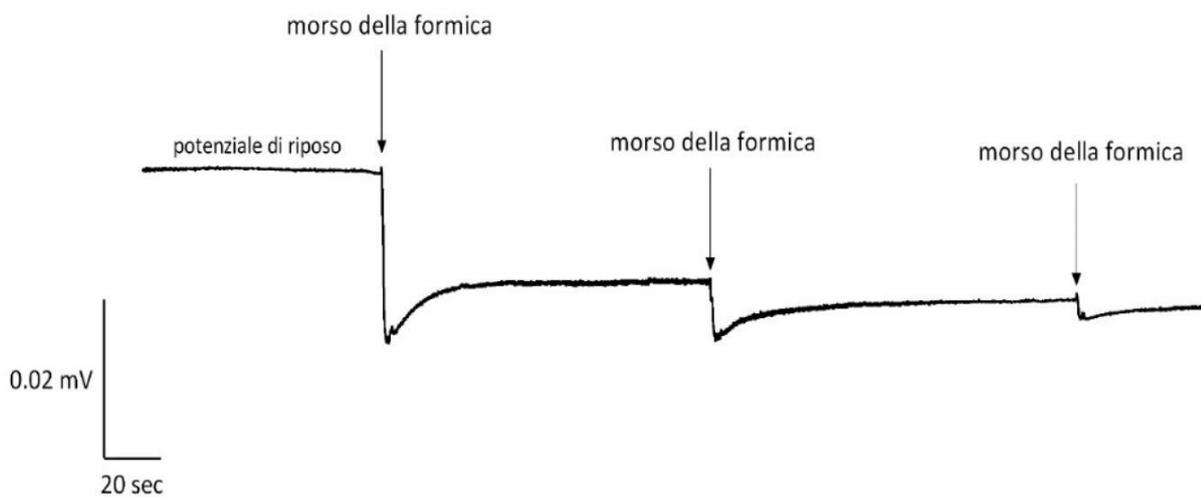


Figura 19: segnali di depolarizzazioni registrati sul nettario extrafioreale in seguito all'infiltrazione del GAD 0.1M e stimolo della formica.

L'EGTA, invece, ha bloccato la generazione di una risposta elettrica allo stimolo applicato (Fig. 20). Il segnale risulta appiattito, senza alcun segno di depolarizzazione del potenziale di membrana, in tutte e dieci le prove eseguite.

### Stimolo del nettario extrafiorente con infiltrazione di EGTA (0.1M)



Figura 20: segnale elettrico extracellulare registrato in seguito all'infiltrazione di EGTA 0.1M e stimolo da parte della formica.

### 3.1.6 Applicazione degli inibitori nell'acquisizione dei segnali elettrici extracellulari spontanei

L'analisi comparativa tra i due trattamenti, GAD ed EGTA, ha evidenziato una differenza statistica significativa anche nel numero di depolarizzazioni spontanee (Fig. 21a). Come nelle indagini elettrofisiologiche a singolo elettrodo, l'applicazione del GAD sembra attenuare l'attività elettrica spontanea con una media di depolarizzazioni al secondo pari a  $0,030 \pm 0,003$ . Mentre l'infiltrazione dell'EGTA fa scendere il numero di depolarizzazioni spontanee al secondo ad una media di  $0,015 \pm 0,002$ . Mettendo a confronto l'attività elettrica spontanea del EFN non visitato con i nettari infiltrati con gli inibitori e la pagina superiore della foglia (Fig. 21b, one-way ANOVA) emerge una notevole differenza statistica in seguito al trattamento con EGTA.

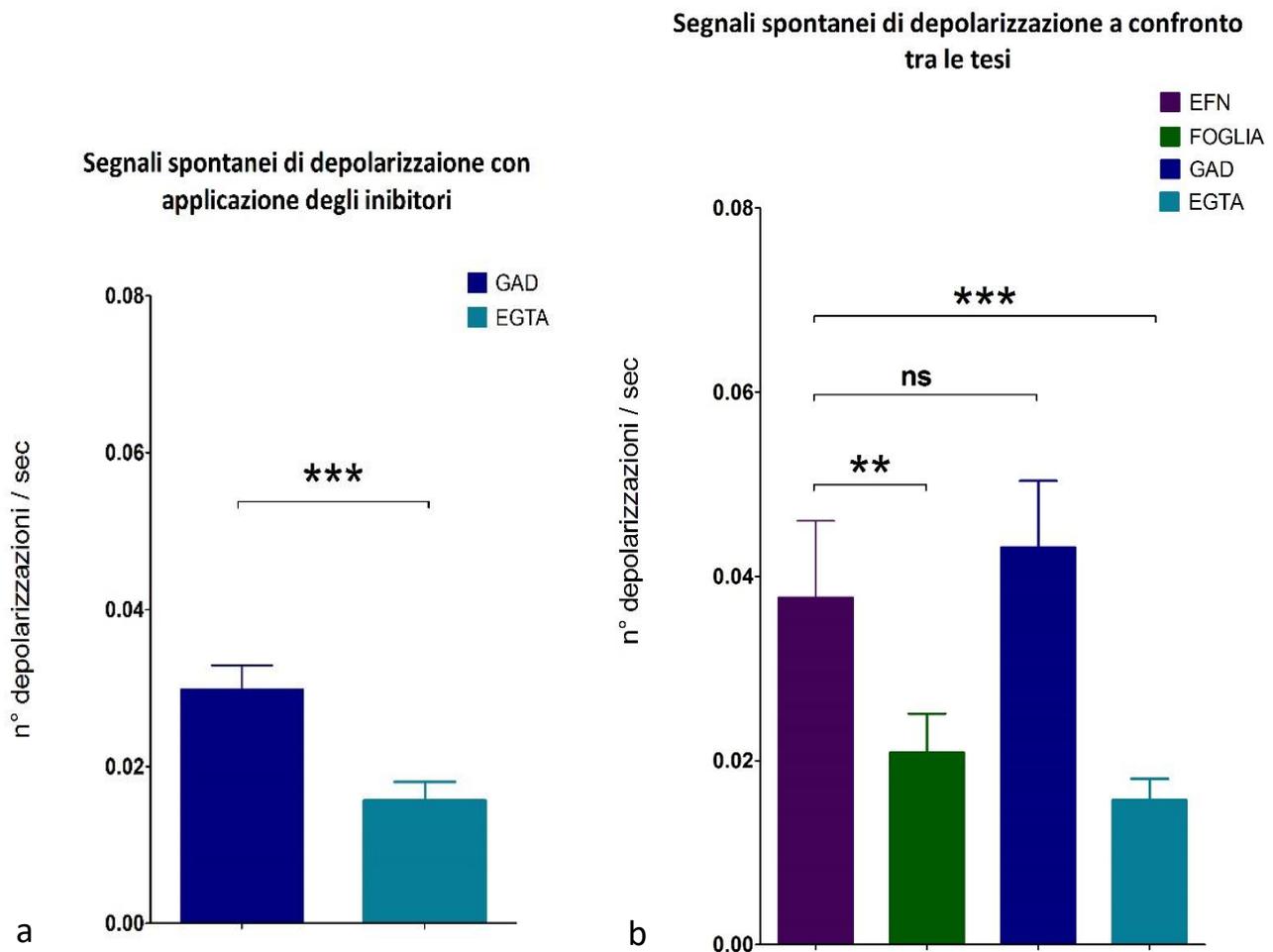


Figura 21: analisi statistica dei segnali spontanei di depolarizzazione registrati al MEA. a) numero di depolarizzazioni spontanee al secondo registrate sul nettario extrafiore infiltrato con GAD 0,1M e con EGTA 0,1M. Le barre ( $\pm$  errore standard, t test) indicano il numero medio di depolarizzazioni. Gli asterischi indicano il livello di significatività ( $N = 20$ ; \*\*\*,  $P \text{ value} < 0,05$ ;  $t=3,66$  e  $df=46$ ). b) numero di depolarizzazioni spontanee al secondo registrate messe a confronto tra le varie tesi (EFN, nettario extrafiore; FOGLIA; EGTA, nettario extrafiore infiltrato con 0,1M di EGTA; GAD, nettario extrafiore infiltrato con 0,1M di GAD). Le barre ( $\pm$  errore standard, one-way ANOVA) indicano il numero medio di depolarizzazioni. Gli asterischi indicano il livello di significatività ( $N = 20$ ; \*\* e \*\*\*,  $P < 0,05$ ).

### 3.1.7 Monitoraggio della resistenza intracellulare

L'attività elettrofisiologica interna delle piante non risulta particolarmente alterata dalla presenza costante delle formiche su di esse né dall'interazione con i nettari extrafioreali. L'alternarsi del giorno e della notte è scandito dall'andamento dei valori di resistenza, legati a loro volta ai cambiamenti naturali fisiologici della pianta come, ad esempio, l'apertura e la chiusura degli stomi. Nel dettaglio abbiamo analizzato l'andamento della resistenza durante il giorno (Fig. 22a) e durante la notte (Fig. 22b) tra le due tesi sperimentali, plottando il suo valore medio nel tempo.

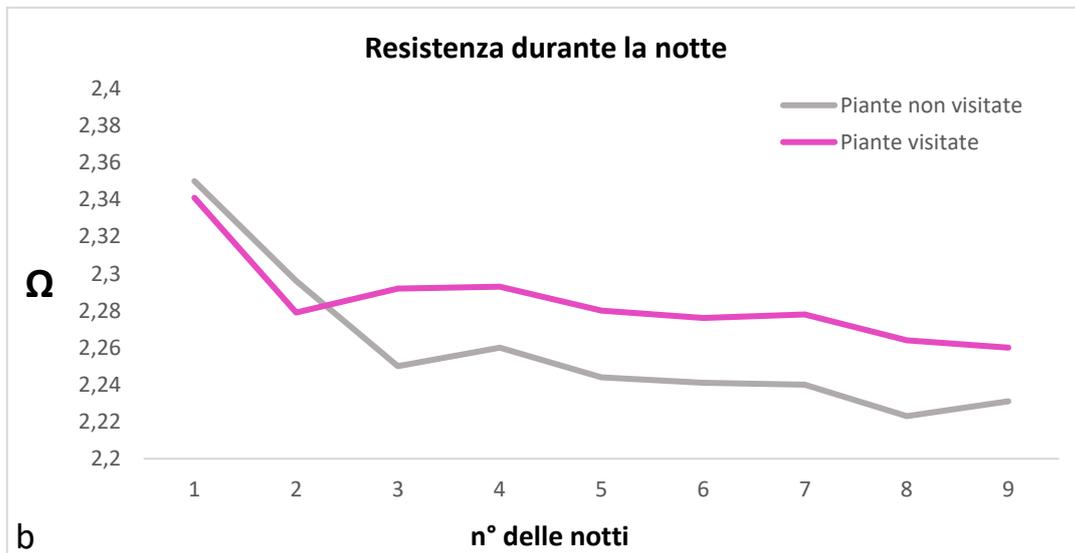
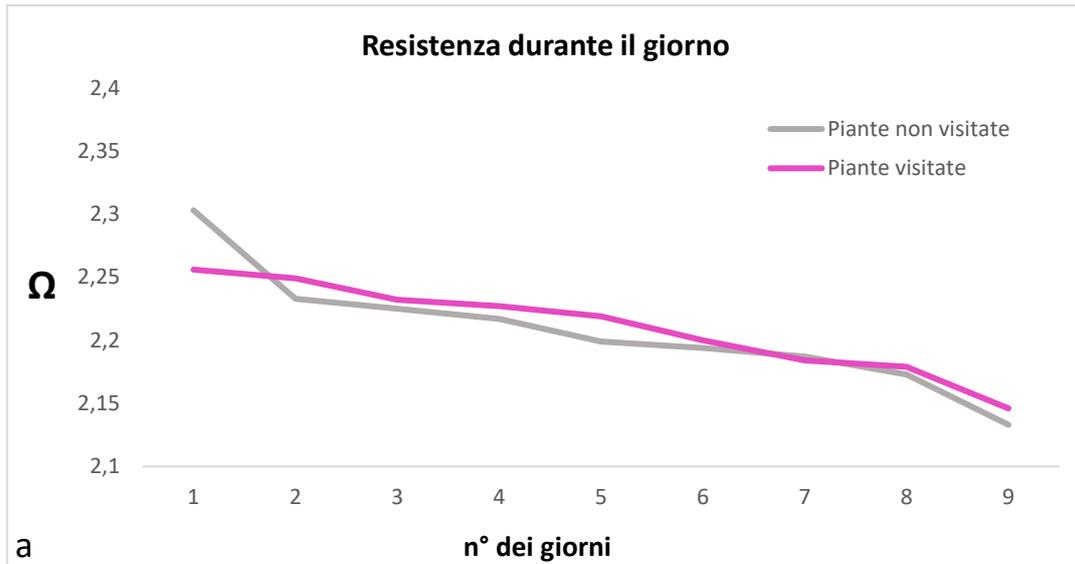
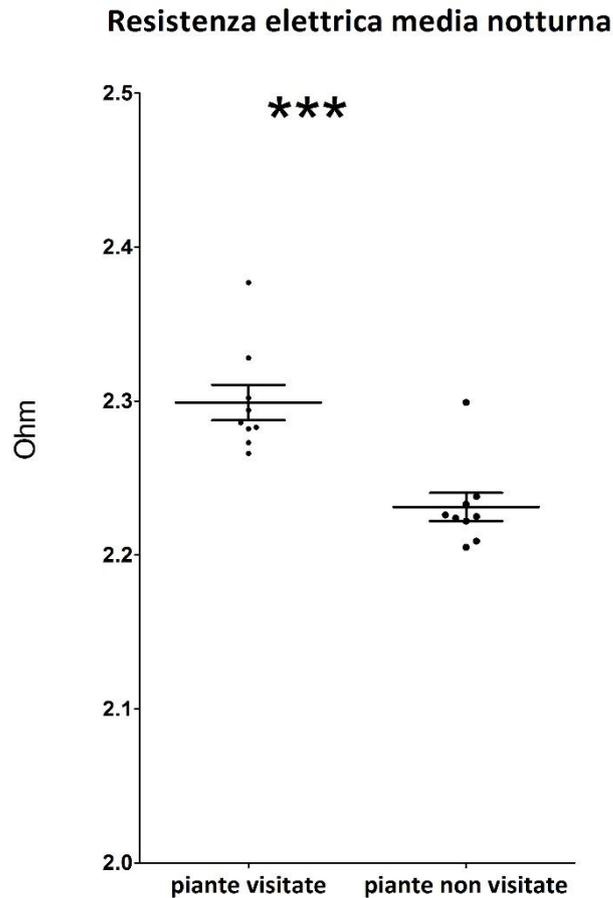


Figura 22: andamento medio della resistenza elettrica ( $\Omega$ ) registrata in 10 giorni messa a confronto tra le due tesi sperimentali, piante visitate e non visitate. a) valori medi della resistenza elettrica registrati durante il giorno; b) valori medi della resistenza elettrica registrati durante la notte.

Tuttavia, i valori di resistenza media notturna delle piante visitate dalle formiche risultano superiori a quelli delle piante non visitate (Fig. 22b). Questo è reso più evidente calcolando e confrontando la media di tutti i valori di resistenza notturna tra le due tesi. Nelle piante non visitate dalle formiche la resistenza media durante il giorno è di  $2,207 \pm 0,04 \Omega$  e nelle piante visitate la media durante il giorno è di  $2,210 \pm 0,04 \Omega$  (Fig. 23).



*Figura 23: analisi statistica della resistenza elettrica media notturna delle piante visitate e non visitate dalle formiche. Le barre ( $\pm$  errore standard, t test) indicano il valore medio di resistenza notturna. Gli asterischi indicano il livello di significatività (N piante = 5; N notti = 9; \*\*\*, P value < 0,05; t=4,62 e df=15).*

### 3.1.8 Indagine sulle proprietà bioelettriche dei tessuti del nettario extrafioreale al confocale

Alla base dei tricomi secernenti degli EFN non visitati dalle formiche un'intensa area di depolarizzazione (Fig. 24), corrispondente al colore rosso, contrasta con l'attenuarsi dell'attività bioelettrica verso le regioni circostanti del nettario e nella regione inferiore della sezione corrispondente allo strato di cellule epidermiche. Una accurata quantificazione ha portato al rilevamento di una differenza statisticamente significativa tra l'area centrale del nettario extrafioreale, con un'intensità di fluorescenza media pari a  $184 \pm 3,46$ , e il rispettivo strato di cellule dell'epidermide inferiore con un'intensità di fluorescenza media pari a  $40,56 \pm 1,74$  (Fig. 24, grafico

e immagine b). Stesse importanti differenze sono state osservate nelle immagini adiacenti. Nella sezione a (Fig. 24, grafico a), il lato superiore caratterizzato dalla presenza di alcuni tricomi ha un'intensità di fluorescenza media di  $137,60 \pm 5,86$ , mentre sul lato inferiore scende a  $56,25 \pm 3,02$ . Anche nell'ultima sezione c (Fig. 24, grafico c), l'intensità di fluorescenza media della pagina superiore con tricomi è pari a  $99,55 \pm 5,77$ , e scende nella pagina inferiore a  $42,20 \pm 1,65$ .

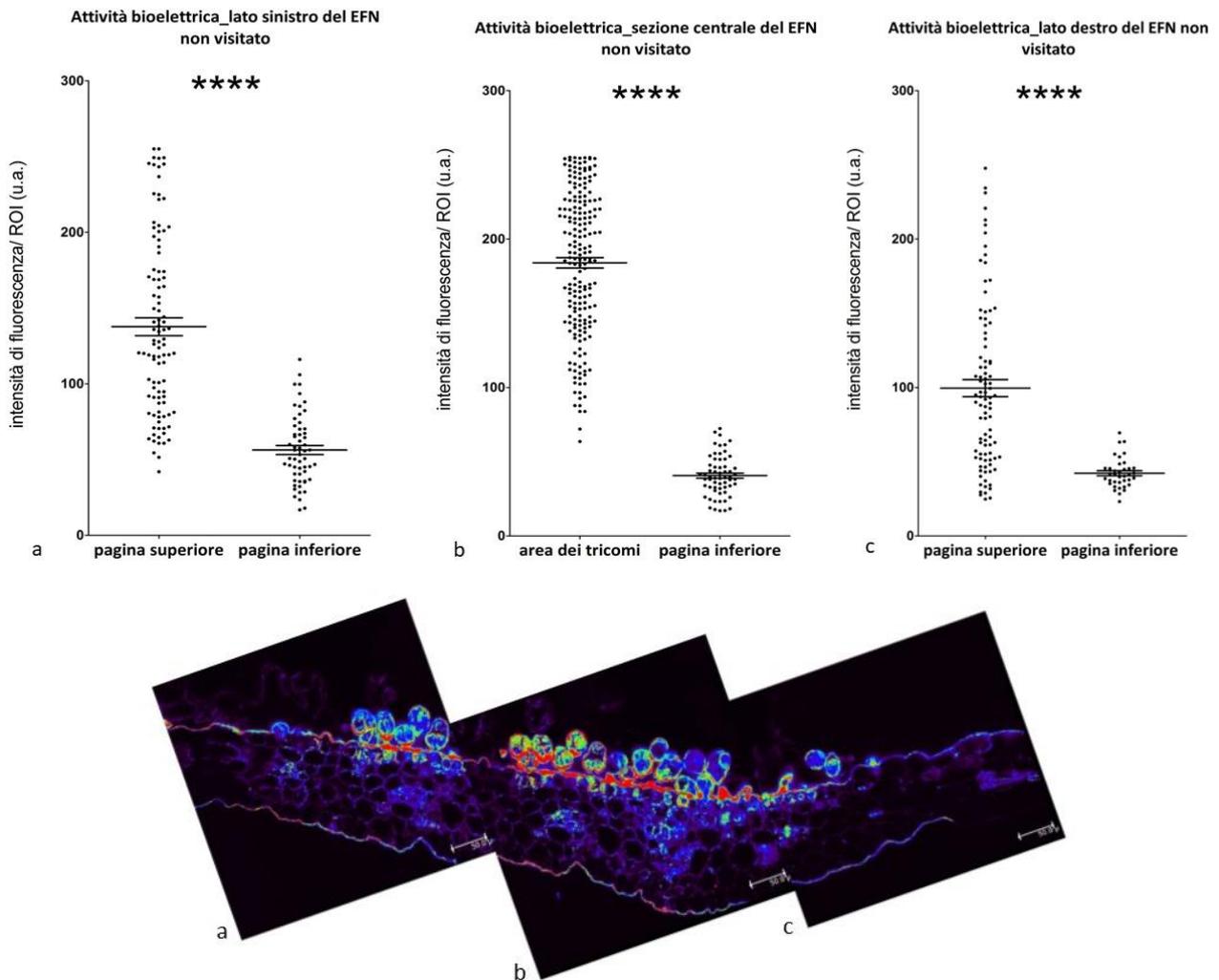


Figura 24: attività bioelettrica evidenziata dal DiBAC della sezione del nettario extraflorale non visitato dalle formiche osservata al confocale. Ad ogni immagine della sezione è associata l'analisi statistica sulla quantificazione dell'attività bioelettrica, espressa in intensità media di fluorescenza per area (ROI=30  $\mu\text{m}^2$ , unità arbitraria), misurata sulla pagina superiore e inferiore. a) lato sinistro della sezione trasversale del EFN. Le barre ( $\pm$  errore standard, t test) indicano l'intensità di fluorescenza media. Gli asterischi indicano il livello di significatività (\*\*\*\*; P value < 0,0001; t=12,33 e df=141). b) centro della sezione trasversale del EFN. Le barre ( $\pm$  errore standard, t test) indicano l'intensità di fluorescenza media. Gli asterischi indicano il livello di significatività (\*\*\*\*; P value < 0,0001; t=36,98 e df=254) c) lato destro della sezione trasversale del EFN. Le barre ( $\pm$  errore standard, t test) indicano l'intensità di fluorescenza media. Gli asterischi indicano il livello di significatività (\*\*\*\*; P value < 0,0001; t=9,55 e df=105).

Osservando la sezione del nettario extraflorale visitato dalle formiche abbiamo la stessa distribuzione dell'attività bioelettrica. L'intensità media di fluorescenza di  $128,40 \pm 4,20$  e di  $133,60 \pm 4,05$  dell'area del nettario (Fig. 25, grafici b e c) è in contrasto con l'intensità media di fluorescenza di  $16,23 \pm 0,72$  e  $25,46 \pm 1,71$  della pagina inferiore. Nella sezione a (Fig. 25, grafico a) l'intensità media di fluorescenza della pagina superiore è di  $68,54 \pm 5,63$  mentre quella della pagina inferiore di  $18,60 \pm 0,76$ . Nella sezione d (Fig. 25, grafico d) sulla pagina superiore si è registrata una intensità media di fluorescenza di  $130,8 \pm 7,20$  e una intensità media di fluorescenza di  $38,10 \pm 2,12$  sulla pagina inferiore.

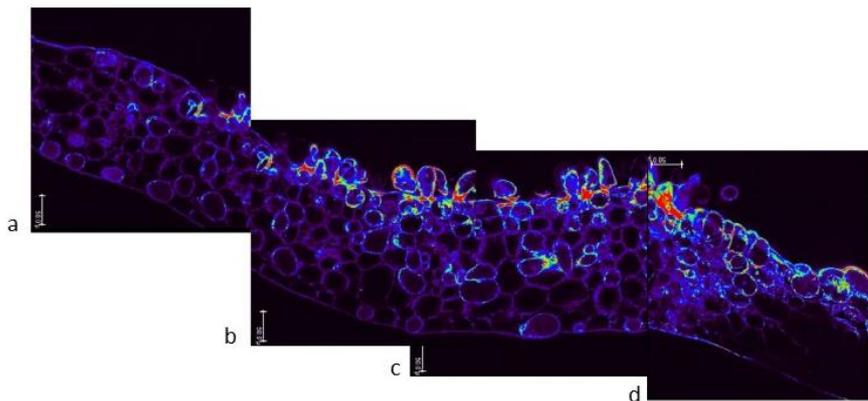
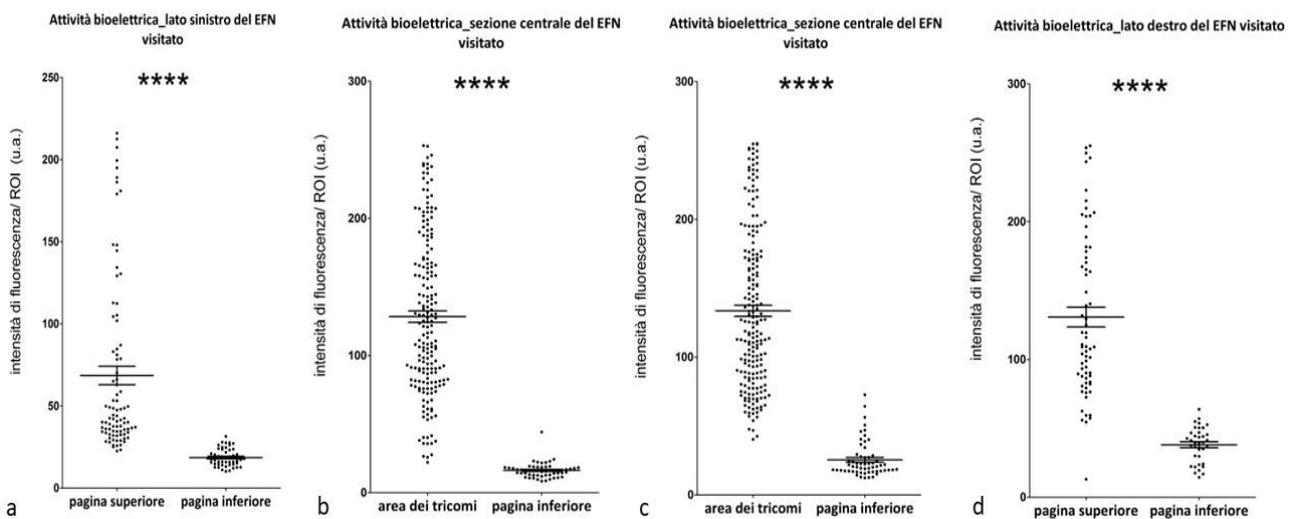


Figura 25: attività bioelettrica evidenziata dal DiBAC della sezione del nettario extraflorale visitato dalle formiche osservata al confocale. Ad ogni immagine della sezione è associata l'analisi statistica sulla quantificazione dell'attività bioelettrica, espressa in intensità media di fluorescenza per area (ROI=30  $\mu\text{m}^2$ , unità arbitraria), misurata sulla pagina superiore e inferiore. a) lato sinistro della sezione trasversale del EFN. Le barre ( $\pm$  errore standard, t test) indicano l'intensità di fluorescenza media. Gli asterischi indicano il livello di significatività (\*\*\*\*; P value < 0,0001; t=8,78 e df=91). b) centro della sezione trasversale del EFN. Le barre ( $\pm$  errore standard, t test) indicano l'intensità di fluorescenza media. Gli asterischi indicano il livello di significatività (\*\*\*\*; P value < 0,0001; t=26,27 e df=197) c) centro della sezione trasversale del EFN. Le barre ( $\pm$  errore standard, t test) indicano l'intensità di fluorescenza media. Gli asterischi indicano il livello di significatività (\*\*\*\*; P value < 0,0001; t=24,54 e df=250). d) lato destro della sezione trasversale del EFN. Le barre ( $\pm$  errore standard, t test) indicano l'intensità di fluorescenza media. Gli asterischi indicano il livello di significatività (\*\*\*\*; P value < 0,0001; t=12,34 e df=76).

Come ultima indagine abbiamo messo a confronto l'attività bioelettrica dell'area del nettario extrafiore non visitato con quella del nettario visitato (Fig. 26d). Il grafico d riassume la differenza statisticamente significativa registrata tra le due aree: la sezione centrale del nettario extrafiore non visitato ha un'intensità media di fluorescenza di 184, mentre quella del nettario extrafiore visitato di 128,4.

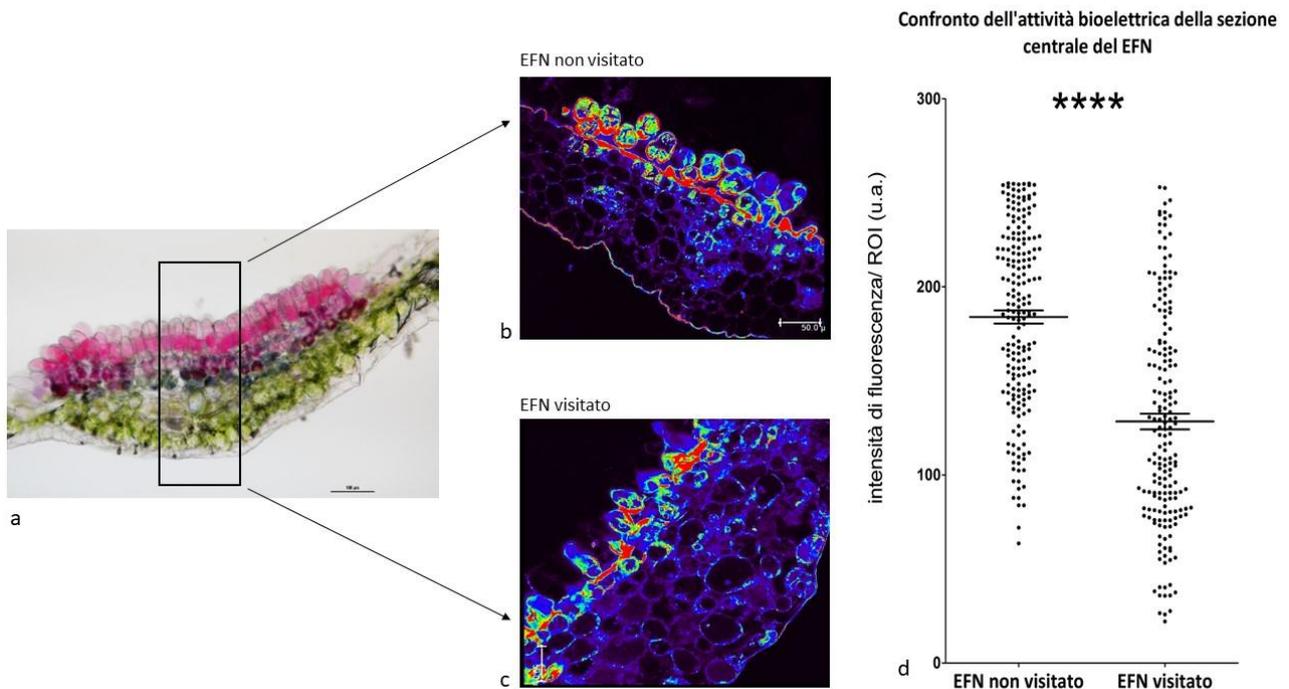


Figura 26: confronto dell'attività bioelettrica evidenziata dal DiBAC della sezione centrale del nettario extrafiore tra le piante non visitate e piante visitate. a) immagine di una sezione di nettario extrafiore osservato al microscopio ottico. b) immagine centrale del nettario extrafiore non visitato dalle formiche trattato con il DiBAC. c) immagine centrale del nettario extrafiore visitato dalle formiche trattato con il DiBAC. d) confronto statistico dell'attività bioelettrica dei nettari extrafioreli visitati e non visitati. Le barre ( $\pm$  errore standard, t test) indicano l'intensità di fluorescenza media. Gli asterischi indicano il livello di significatività (\*\*\*\*;  $P$  value < 0,0001;  $t=10,21$  e  $df=366$ ).

## 3.2 Analisi dei terpeni

### 3.2.1 Indagine istochimica

Le indagini istochimiche condotte attraverso l'utilizzo di un microscopio ottico hanno evidenziato un'importante alterazione metabolica nei tricomi dei nettari extrafioreli come probabile risposta adattativa delle piante al rapporto mutualistico con le formiche: una differenza

statisticamente significativa nel contenuto di sostanze terpeniche all'interno dei tricomi secernenti (Fig. 27a). La quantificazione viene espressa come rapporto percentuale dell'area occupata dalle vescicole terpeniche sull'area totale del tricoma. Nei nettari extrafloral non visitati dalle formiche le vescicole terpeniche occupano circa l'11,83% dell'area (Fig. 27c), mentre nei tricomi visitati dalle formiche l'area occupata dalle vescicole sale all' 84,94% (Fig. 27b).

#### Quantificazione dei terpeni nei tricomi dei EFNs

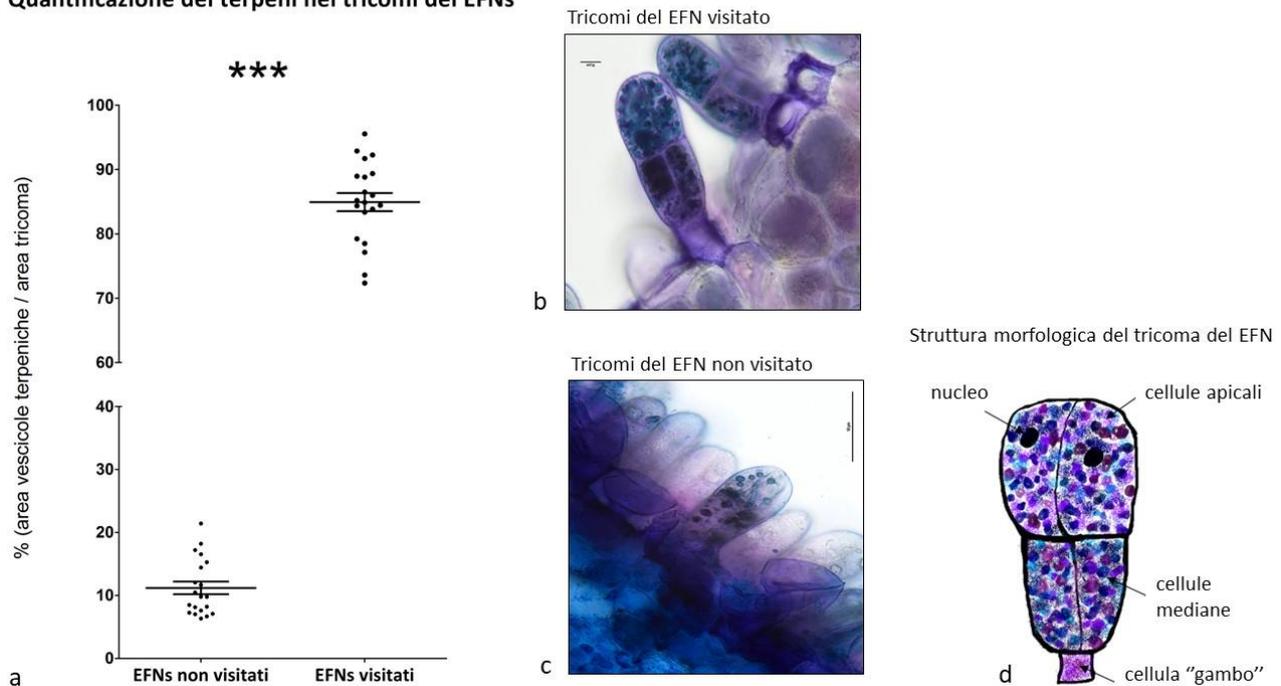


Figura 27: analisi istochimica dei tricomi dei nettari extrafloral con colorazione NADI. a) analisi statistica della quantificazione delle sostanze terpeniche nei nettari extrafloral visitati e non visitati. La quantificazione è espressa come rapporto percentuale tra l'area delle vescicole terpeniche e l'area totale del tricoma. Le barre ( $\pm$  errore standard, t test) indicano la percentuale media. Gli asterischi indicano il livello di significatività ( $N = 20$ ; \*\*\*,  $P$  value  $< 0,0001$ ;  $t=42,61$  e  $df=34$ ). b) immagine al microscopio ottico del tricoma del EFN visitato dalle formiche trattato con il NADI. c) immagine al microscopio ottico dei tricomi del EFN non visitato dalle formiche trattato con il NADI. d) rappresentazione della struttura morfologica di un tricoma secernente tipico dei nettari extrafloral della *Vicia faba*.

### 3.2.2 Quantificazione dei terpeni con microscopia confocale

Anche dalle analisi al confocale di quantificazione delle sostanze terpeniche accumulate nelle cellule dei tricomi è apparsa una chiara differenza statisticamente significativa tra le due tesi sperimentali (Fig. 28). Nelle cellule dei tricomi non visitati dalle formiche l'intensità media di fluorescenza delle sostanze terpeniche (espressa in unità arbitraria) è di  $3,28 \times 10^{14} \pm 1,43 \times 10^{13}$ , mentre nelle cellule dei tricomi visitati dalle formiche l'intensità media di fluorescenza è di  $4,20 \times 10^{14} \pm 1,41 \times 10^{13}$ .

### Quantificazione dei terpeni con microscopia confocale

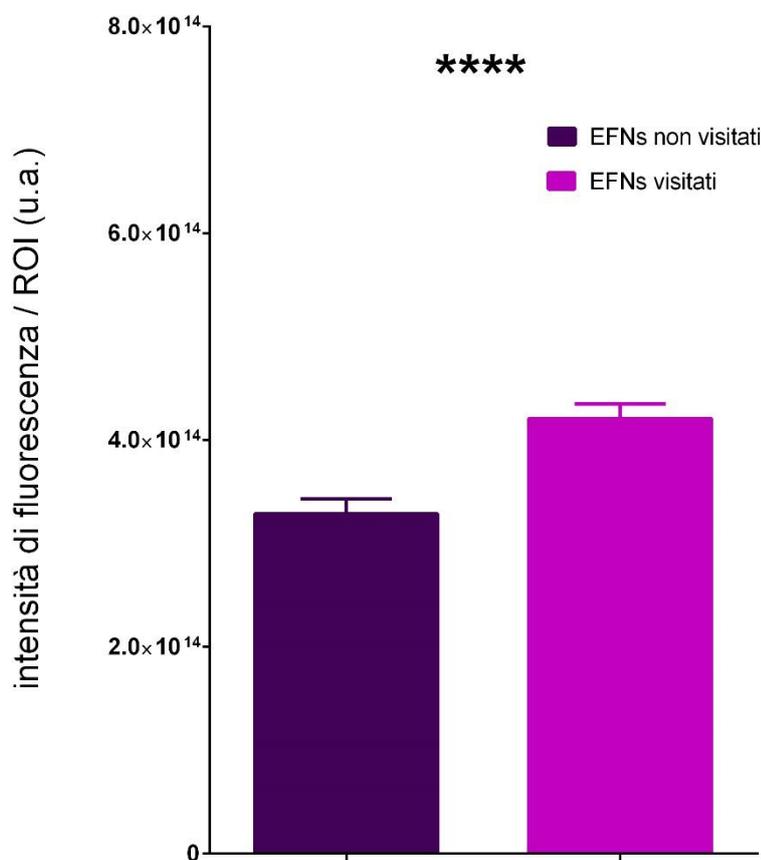


Figura 28: quantificazione dei terpeni al confocale. La quantità dei terpeni contenuti nei tricomi secernenti è misurata come l'intensità media di fluorescenza per area (ROI=70  $\mu\text{m}^2$ ). Le barre ( $\pm$  errore standard, t test) indicano la fluorescenza media delle sostanze terpeniche nei tricomi secernenti delle due tesi sperimentali. Gli asterischi indicano il livello di significatività (\*\*\*\*;  $P < 0,0001$ ).

### 3.2.3 Quantificazione dei terpeni con estrazione chimica

La differenza di accumulo di terpeni osservata tramite microscopia confocale è stata confermata anche tramite indagine biochimica. La quantificazione spettrofotometrica ha evidenziato una differenza statisticamente significativa tra le due tesi nei due tempi di campionamento (Fig. 29). Dopo otto giorni di crescita e simbiosi mutualistica, nei nettari visitati dalle formiche la quantità media delle sostanze terpeniche è di  $48,02 \pm 0,70$  mg/200  $\mu\text{l}$ , mentre nei nettari

non visitati di  $31,50 \pm 1,60$  mg/200  $\mu$ l (Fig. 29a). Il rapporto tra le due medie è di 0,65. Dal secondo campionamento, avvenuto dopo quindici giorni di crescita e simbiosi, l'abbondanza delle sostanze terpeniche nei nettari extrafloriali visitati è salita a  $86,31 \pm 2,18$  mg/200  $\mu$ l mentre quella dei nettari extrafloriali non visitati a  $48,07 \pm 0,89$  mg/200  $\mu$ l (Fig. 29b). Il rapporto tra le due medie è di 0,55.

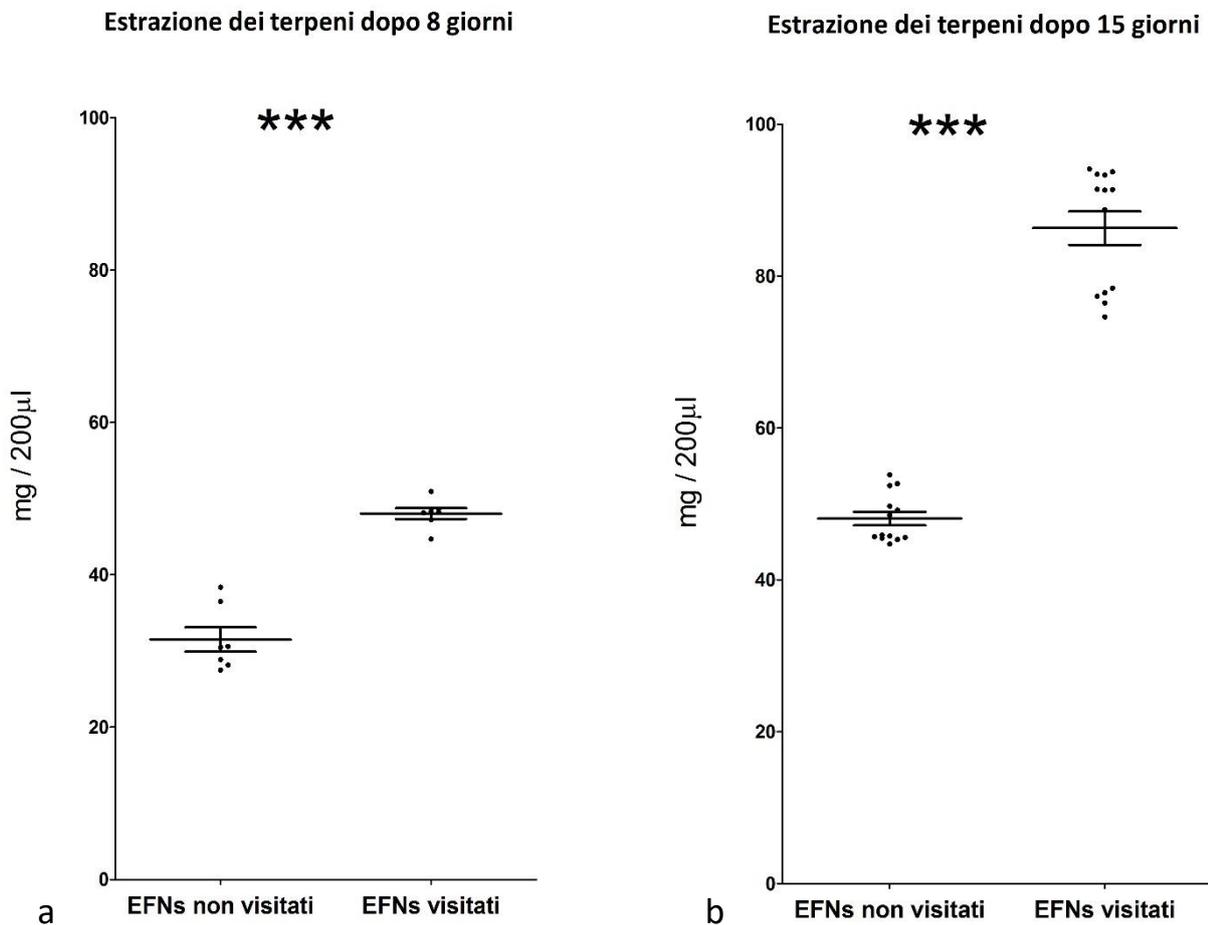


Figura 29: estrazione dei terpeni dai nettari extrafloriali. a) analisi statistica delle sostanze terpeniche contenute nei nettari extrafloriali delle piante visitate e delle piante non visitate dopo otto giorni dall'inizio dell'esperimento. Le barre ( $\pm$  errore standard, t test) indicano il valore medio della quantità di terpeni (mg/200  $\mu$ l) contenuti nei tricomi secernenti. Gli asterischi indicano il livello di significatività (\*\*\*, P value < 0,0001; t=9,43 e df=8). b) analisi statistica delle sostanze terpeniche contenute nei nettari extrafloriali delle piante visitate e delle piante non visitate dopo quindici giorni dall'inizio dell'esperimento. Le barre ( $\pm$  errore standard, t test) indicano il valore medio della quantità di terpeni (mg/200  $\mu$ l) contenuti nei tricomi secernenti. Gli asterischi indicano il livello di significatività (\*\*\*, P < 0,0001; t=16,18 e df=15).



Tra le diverse strutture che mostrano un'alterazione dal punto di vista morfo-anatomico, sempre a livello di tricomi visitati e non, c'è la parete cellulare (Fig. 31). Nei tricomi visitati lo spessore di parete è di  $0,43 \pm 0,01 \mu\text{m}$ , molto inferiore rispetto a quello nelle cellule dei tricomi non visitati che invece risulta essere di  $0,79 \pm 0,02 \mu\text{m}$  (Fig. 31a).

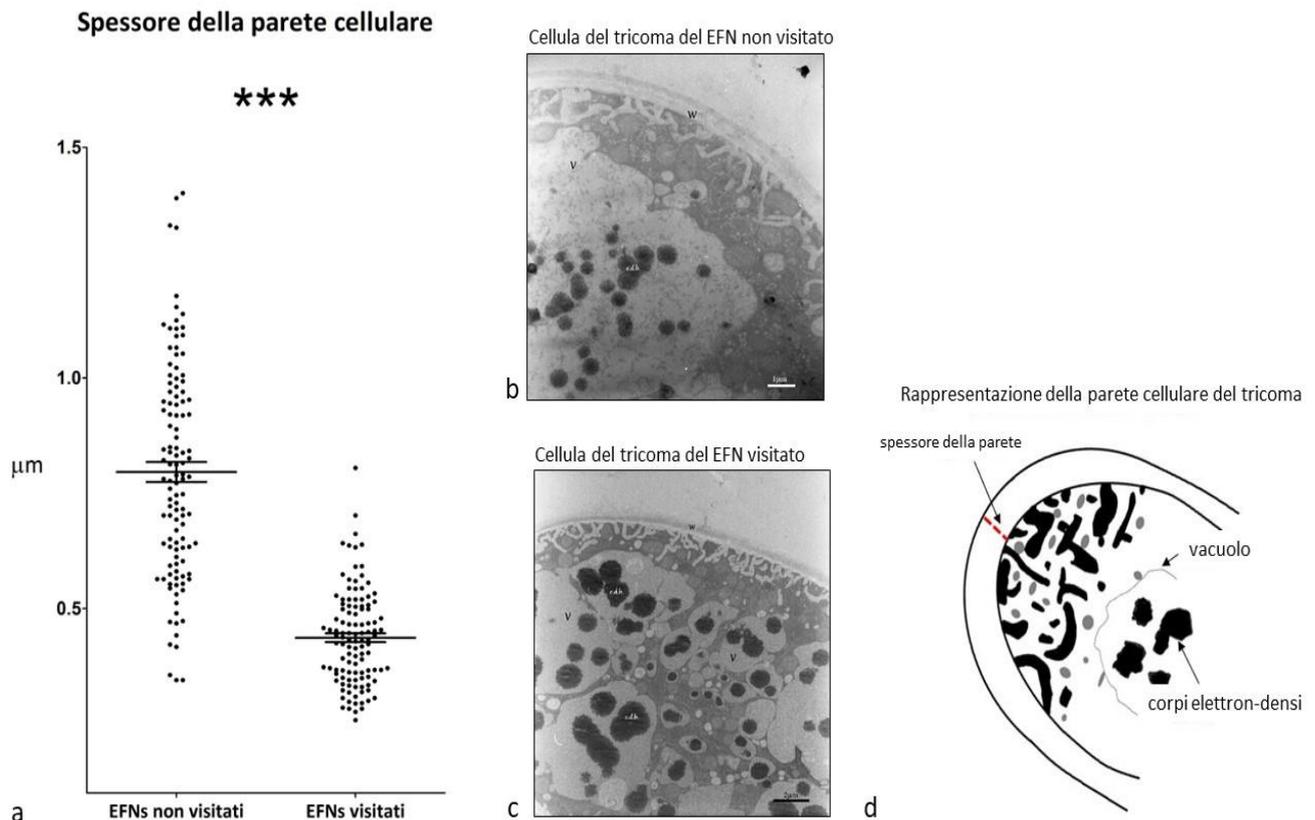


Figura 31: analisi ultrastrutturale al T.E.M. della parete cellulare dei tricomi secernenti dei nettari extrafloriali. a) analisi statistica sullo spessore della parete cellulare espressa in  $\mu\text{m}$  delle cellule dei tricomi secernenti. Le barre ( $\pm$  errore standard, t test) indicano lo spessore medio. Gli asterischi indicano il livello di significatività (\*\*\*)  $P < 0,0001$ ;  $t=15,13$  e  $df=155$ . b) immagine al T.E.M. di una cellula apicale del tricoma del nettario extrafloriale non visitato dalle formiche. c) immagine al T.E.M. di una cellula apicale del tricoma del nettario extrafloriale visitato dalle formiche. d) rappresentazione grafica di una cellula apicale del tricoma secernente del nettario extrafloriale. Legenda: W, "wall", parete cellulare; V, "vacuole", vacuolo; e.d.b., "electron-dense body", corpo elettron-denso.

Altro tratto ultrastrutturale a mostrare una differenza statisticamente significativa tra tricomi secernenti di EFN visitati e non sono delle strutture a forma di protuberanze posizionate a ridosso della parete cellulare. Nelle cellule apicali dei tricomi dei nettari extrafloriali visitati tali strutture risultano estremamente espanse arrivando ad occupare il  $37,7 \pm 2,8 \%$  dell'area selezionata ( $\text{ROI}=70 \mu\text{m}^2$ ), mentre nelle cellule apicali dei tricomi di nettari non visitati solo il  $9,1 \pm 0,6 \%$  (Fig. 32).

### Quantificazione delle vescicole secernenti delle cellule apicali dei tricomi

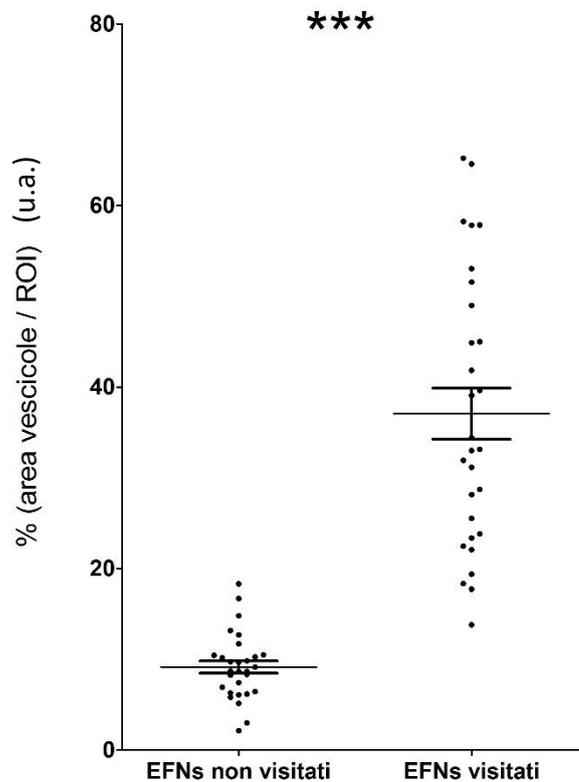


Figura 32: analisi statistica sulla quantificazione delle vescicole secernenti delle cellule apicali dei tricomi dei EFN. L'area occupata dalle vescicole secernenti è stata calcolata come rapporto percentuale tra l'area delle vescicole e il ROI di  $70 \mu\text{m}^2$  (unità arbitraria). Le barre ( $\pm$  errore standard, t test) indicano l'area media in percentuale occupata dalle vescicole secernenti. Gli asterischi indicano il livello di significatività (\*\*\*,  $P \text{ value} < 0,0001$ ;  $t=15,13$  e  $df=155$ ).

Immagini di EFN di *Vicia faba* non visitati acquisite al microscopio elettronico evidenziano specifiche componenti ultrastrutturali dei tricomi che li costituiscono (Fig. 33). Le cellule che compongono i tricomi sono dunque caratterizzate da strutture di natura lipidica situate nel citosol (corpi elettron-densi) e nei vacuoli (punte di freccia), pareti cellulari, in particolare pareti apicali, che si estendono localmente verso il citoplasma formando delle protuberanze (Fig. 33a e 33c, frecce), numerose vescicole ed elementi del reticolo endoplasmatico presenti nei pressi o in contatto con le protuberanze, insieme ad una sostanziale presenza di mitocondri. I nuclei attivi con cromatina decondensata e nucleoli distinguibili sono indicatori di una elevata attività metabolica delle cellule. È inoltre possibile apprezzare la deposizione di materiale secretorio che avviene immediatamente a ridosso della parete cellulare (Fig. 33b, le zone di deposizione sono indicate con asterischi).

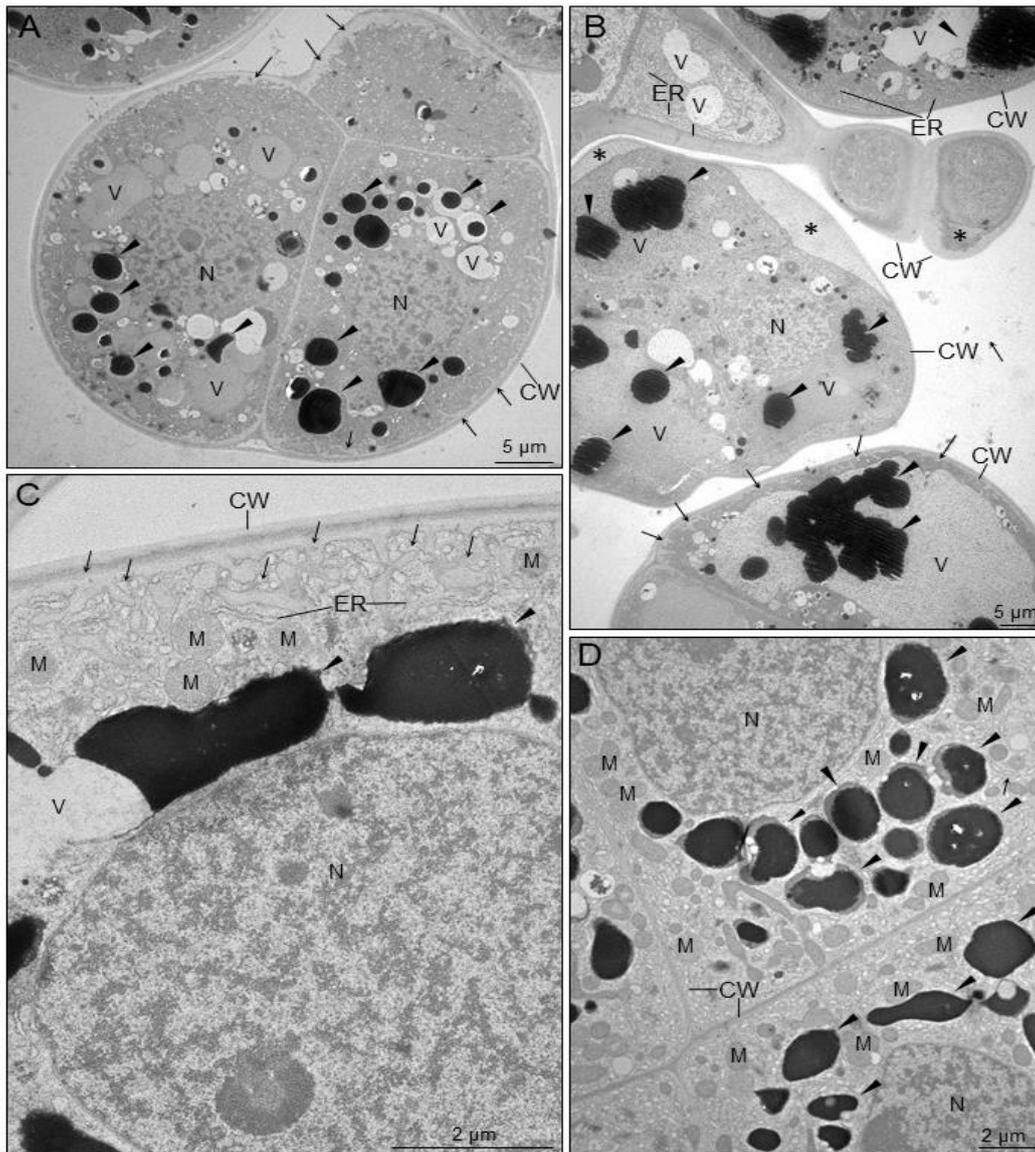


Figura 33: immagini al TEM dei tricomi dei nettari extraflorali non visitati. Legenda: CW, "cell wall", parete cellulare; V, "vacuole", vacuolo; N, "nucleus", nucleo; ER, "endoplasmic reticulum", reticolo endoplasmatico; M, "mitochondrion", mitocondrio; "\*" riversamento del nettare; "punta freccia" corpi lipidici; "freccia" vescicole secernenti.

Nelle cellule dei tricomi visitati (Fig. 34), oltre le differenze sopra riportate, è possibile osservare una sostanziale vacuolizzazione avvenuta in concomitanza con la degradazione delle strutture lipidiche all'interno dei vacuoli (Fig. 34, punte di freccia), una riduzione del sistema del reticolo endoplasmatico e la presenza di mitocondri ingranditi (Fig. 34a). Questi dettagli, puramente descrittivi, vanno supportati con maggiori acquisizioni delle immagini al T.E.M. seguita da un'analisi statistica.

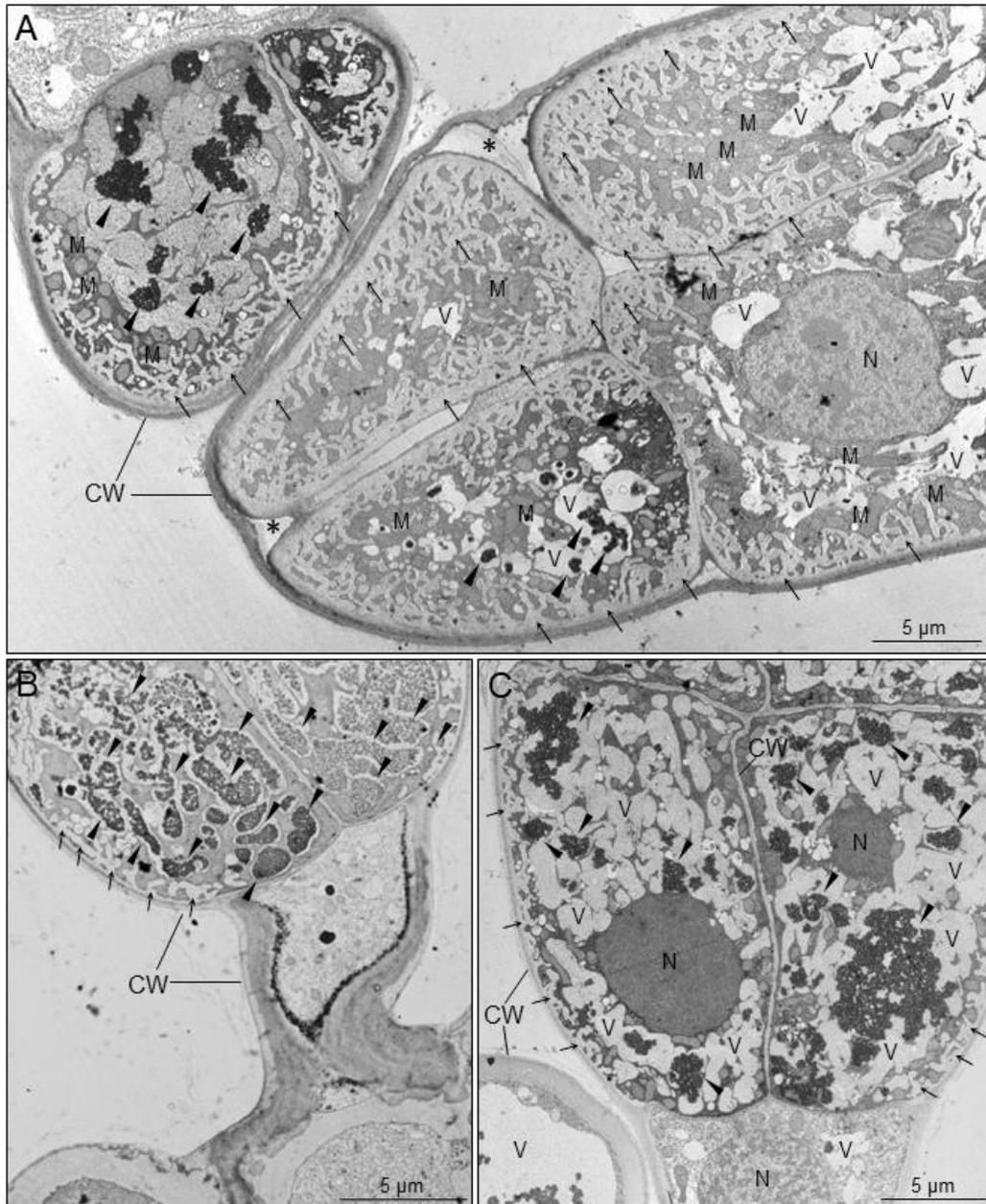


Figura 34: immagini al TEM dei tricomi dei nettari extrafloriali visitati. Legenda: CW, "cell wall", parete cellulare; V, "vacuole", vacuolo; N, "nucleus", nucleo; ER, "endoplasmic reticulum", reticolo endoplasmatico; M, "mitochondrion", mitocondrio; "\*" riversamento del nettare; "punta freccia" corpi lipidici; "freccia" vescicole secernenti.

### 3.4 Analisi dei lipidi

#### 3.4.1 Quantificazione dei lipidi con microscopia confocale

La quantificazione dei lipidi in EFN visitate e non, effettuata tramite microscopia confocale, ha evidenziato una differenza statisticamente significativa (Fig. 35). Nelle sezioni dei EFN non visitati

è stata acquisita un'intensità media della fluorescenza pari a  $82,31 \pm 2,27$ , mentre nelle sezioni dei nettari extrafloriali visitati dalle formiche l'intensità media della fluorescenza è di  $297,9 \pm 7,40$ .

### Quantificazione dei lipidi al confocale

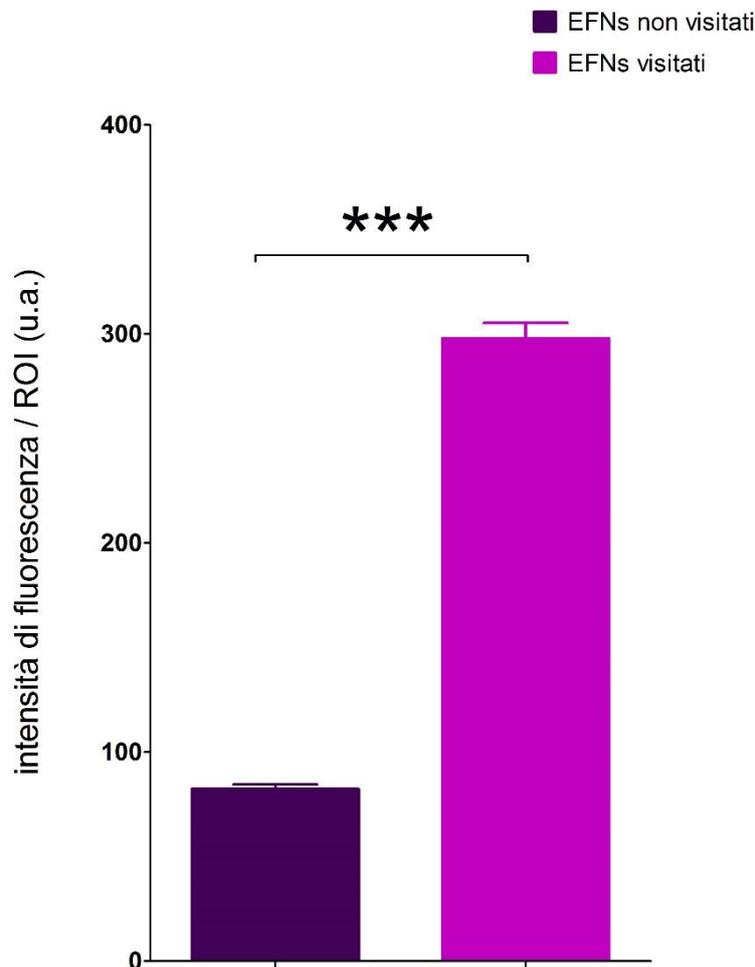


Figura 35: quantificazione dei lipidi al confocale. La quantità dei lipidi contenuti nei tricomi secernenti delle due tesi sperimentali, piante visitate e piante non visitate, è misurata in intensità di fluorescenza per area (ROI =  $70 \mu\text{m}^2$ ; unità arbitraria). Le barre ( $\pm$  errore standard, t test) indicano l'intensità di fluorescenza media. Gli asterischi indicano il livello di significatività (\*\*\*) ( $P < 0,0001$ ;  $t=27,84$  e  $df=3744$ ).

L'intera stipula con nettario extrafloriale non visitato è stata osservata sempre tramite microscopia confocale in seguito ad incubazione con un marker che lega i lipidi neutri, il BODIPY (Fig. 36). La zona evidenziata in verde (Fig. 36c) evidenzia come l'abbondante distribuzione delle sostanze lipidiche neutre sia chiaramente circoscritta all'area del nettario.

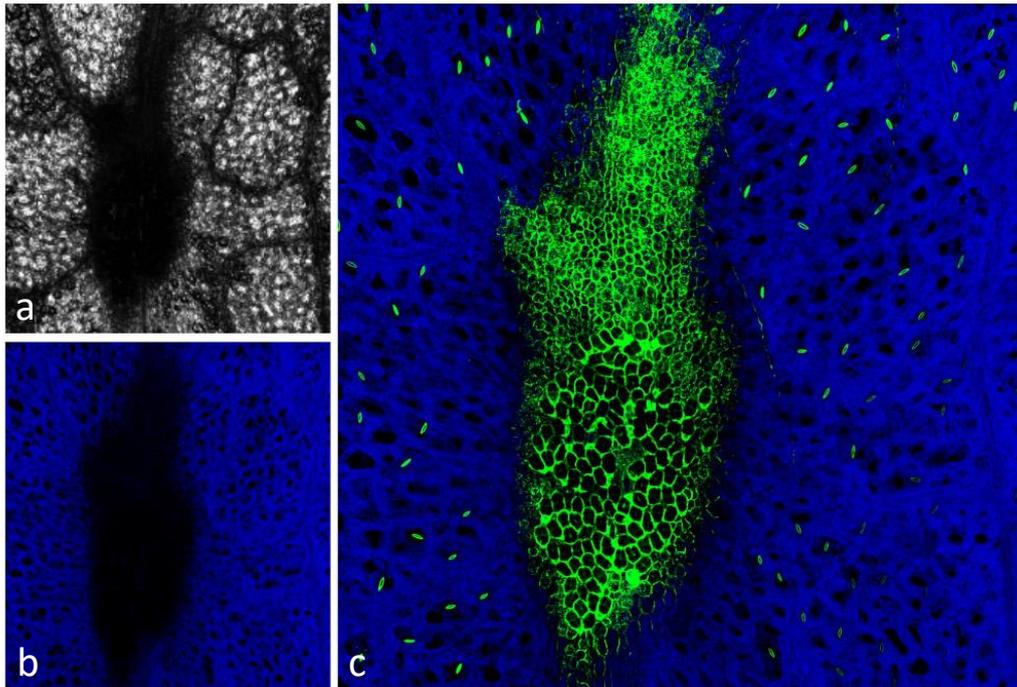


Figura 36: osservazione del nettario extrafloriale non visitato intero trattato con il BODIPY al confocale. a) osservazione con luce bianca del campione. b) stipula con nettario extrafloriale non trattata con il colorante BODIPY osservata al confocale con parametri di eccitazione/emissione rispettivamente pari a 502/510 nm. d) stipula con nettario extrafloriale trattata con il colorante BODIPY osservata al confocale con parametri di eccitazione/emissione rispettivamente pari a 502/510 nm. In verde i lipidi neutri evidenziati dal colorante.

È inoltre possibile apprezzare il dettaglio della presenza di gocce lipidiche all'interno delle cellule che compongono i nettari extrafloriali (Fig. 37b, punta della freccia), e il loro accumulo nella cuticola che circonda i tricomi secernenti (Fig. 37b, freccia).

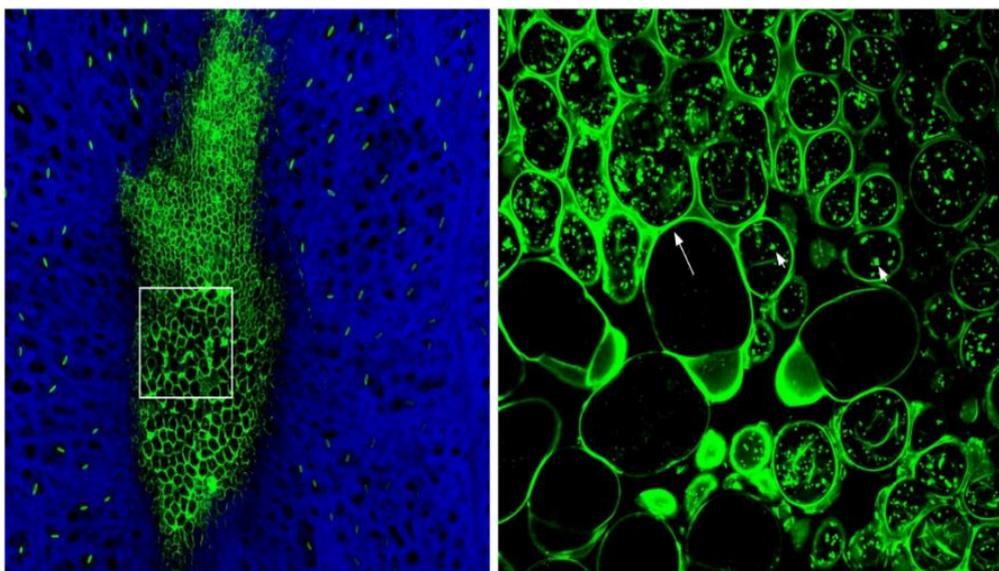
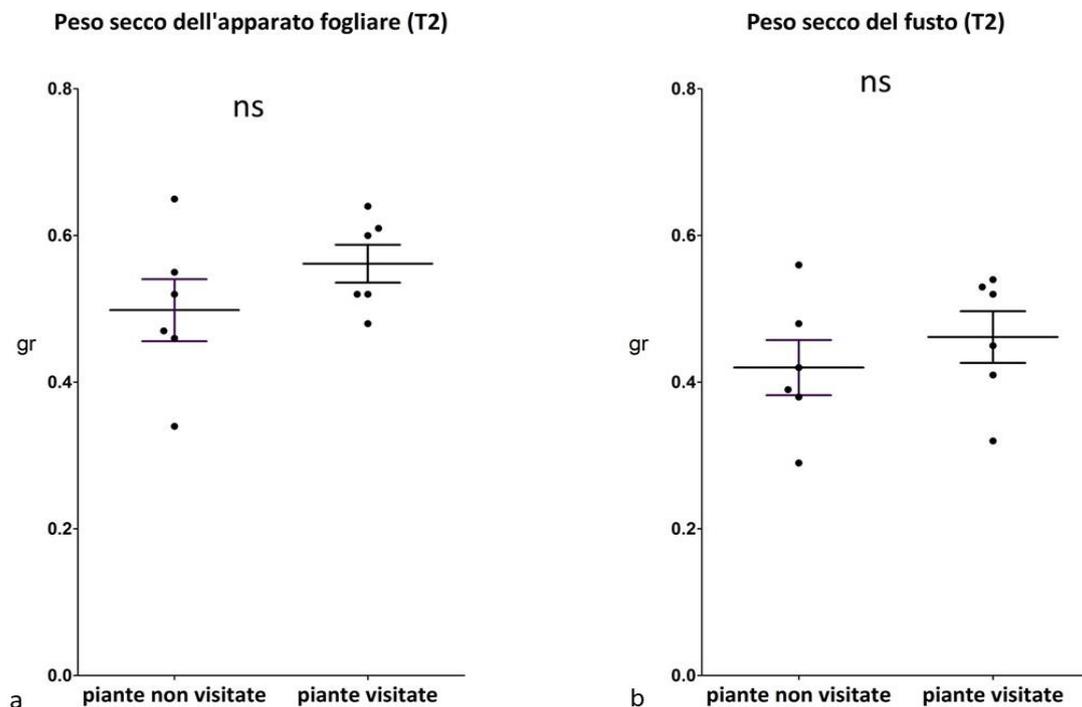


Figura 37: stipula con nettario extrafloriale non visitato trattato con il BODIPY. a) stipula osservata al confocale con parametri di eccitazione/emissione rispettivamente pari a 502/510 nm. In verde i lipidi neutri evidenziati dal colorante. b) ingrandimento del nettario extrafloriale. Legenda: "punta freccia" corpi lipidici; "freccia" cuticola dei tricomi.

### 3.5 Indagini morfo-fisiologiche delle piante

L'analisi statistica non ha evidenziato alcuna differenza significativa tra i parametri morfologici delle piante analizzati. Il peso secco medio delle foglie nelle piante non visitate è di  $0,49 \pm 0,04$  gr e nelle piante in simbiosi con le formiche è di  $0,56 \pm 0,02$  gr (Fig. 38a). Il peso secco medio dei fusti delle piante non visitate è di  $0,42 \pm 0,03$  gr, simile al peso secco medio dei fusti delle piante visitate pari a  $0,46 \pm 0,03$  gr (Fig. 38b). Per quanto riguarda l'apparato radicale, i valori registrati per le piante non visitate e le piante visitate sono rispettivamente di  $0,96 \pm 0,6$  gr e  $1,07 \pm 0,4$  gr (Fig. 38c). Anche l'area fogliare non ha mostrato differenze statisticamente significative: nelle piante non visitate la media è di  $378 \pm 61,87$  e nelle piante visitate dalle formiche è di  $405 \pm 67,87$  cm<sup>2</sup> (Fig. 38d). L'unico tratto morfologico che ha registrato una differenza statisticamente significativa è l'area dei nettari extrafloriali. Nelle piante non visitate l'area media misura  $0,30 \pm 0,01$  mm<sup>2</sup>, la quale raddoppia nelle piante visitate con una media di  $0,65 \pm 0,32$  mm<sup>2</sup> (Fig. 39).



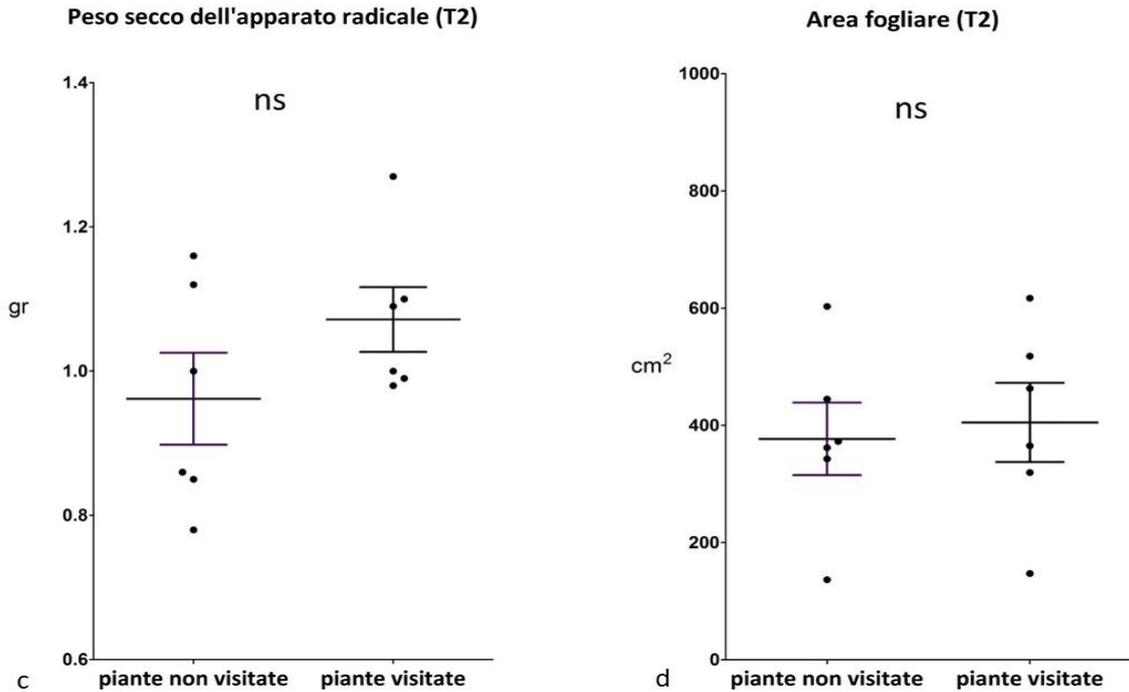


Figura 38: analisi e comparazione dei tratti morfologici delle piante visitate dalle formiche e delle piante non visitate dalle formiche. N=6. a) analisi statistica del peso secco dell'apparato fogliare, espresso in gr. Le barre ( $\pm$  errore standard, t test) indicano il valore medio dei parametri morfologici misurati (P value < 0,05; t=1,27 e df=8). b) analisi statistica del peso secco del fusto, espresso in gr. Le barre ( $\pm$  errore standard, t test) indicano il valore medio dei parametri morfologici misurati (P value < 0,05; t=0,80 e df=9). c) analisi statistica del peso secco dell'apparato radicale, espresso in gr. Le barre ( $\pm$  errore standard, t test) indicano il valore medio dei parametri morfologici misurati (P value < 0,05; t=1,41 e df=8). d) analisi statistica dell'area fogliare, espressa in cm<sup>2</sup>. Le barre ( $\pm$  errore standard, t test) indicano il valore medio dei parametri morfologici misurati (P value < 0,05; t=0,30 e df=9).

### Ampiezza aree nettari extrafloriali

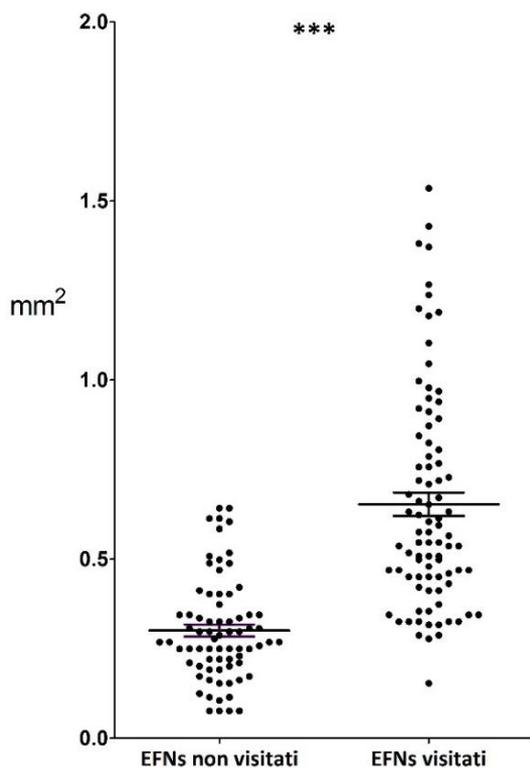


Figura 39: analisi statistica dell'ampiezza dell'area dei nettari extrafloriali espressa in mm<sup>2</sup>. Le barre ( $\pm$  errore standard, t test) indicano il valore medio dell'area. Gli asterischi indicano il livello di significatività (\*\*\*; P value < 0,0001; t=9,57 e df=126).

Anche dai dati ottenuti dalle misurazioni degli scambi gassosi fogliari non è stata registrata alcuna differenza statisticamente significativa. Il tasso netto fotosintetico nelle piante non visitate è di  $6,64 \pm 1,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e nelle piante visitate di  $7,60 \pm 2,1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Fig. 40a). La conduttanza stomatica nelle piante non in simbiosi con le formiche è di  $0,09 \pm 0,01 \text{mmol di H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , per quelle in simbiosi mutualistica è di  $0,08 \pm 0,03 \text{mmol di H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Fig. 40b). La concentrazione intercellulare di  $\text{CO}_2$  è pari a  $227,1 \pm 20,54 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  nelle piante non visitate, e pari a  $275,6 \pm 15,49 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Fig. 40c).

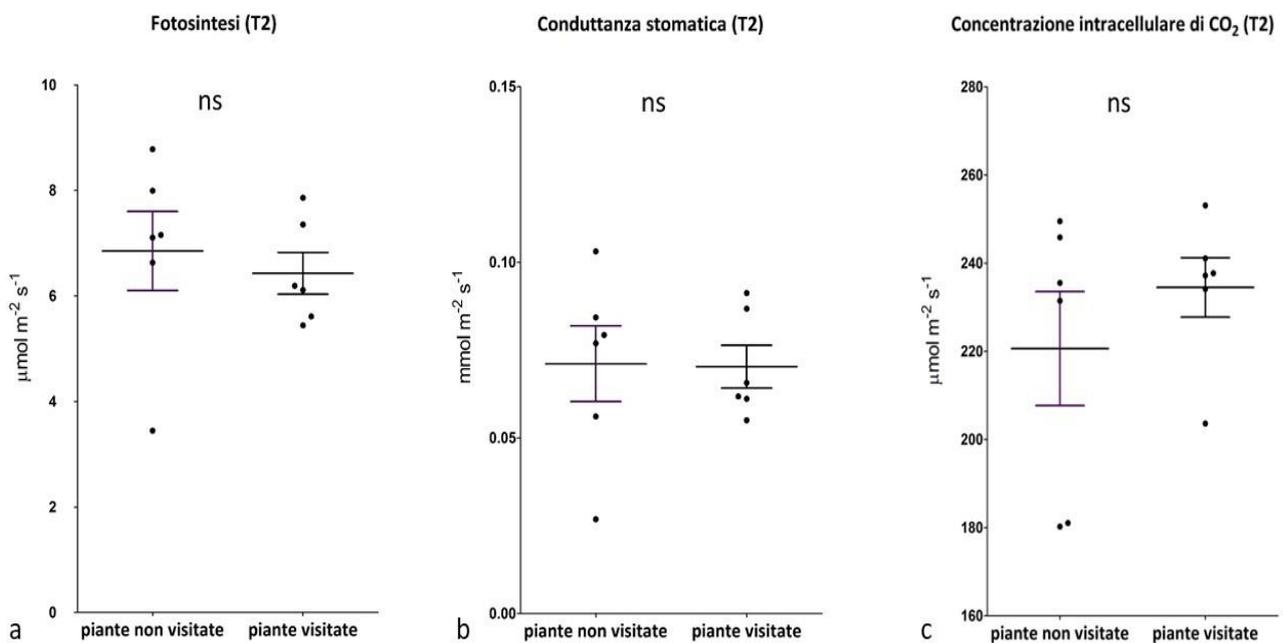


Figura 40: analisi e comparazione dei dati fisiologici delle piante visitate dalle formiche e delle piante non visitate dalle formiche. a) analisi statistica del tasso fotosintetico, espresso in  $\mu\text{mol di CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Le barre ( $\pm$  errore standard, t test) indicano il valore medio del tasso fotosintetico. ( $P$  value  $< 0,0001$ ;  $t=0,50$  e  $df=7$ ). b) analisi statistica della conduttanza stomatica, espresso  $\text{mmol di H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Le barre ( $\pm$  errore standard, t test) indicano il valore medio della conduttanza. ( $P$  value  $< 0,0001$ ;  $t=0,06$  e  $df=7$ ). c) analisi statistica della concentrazione intracellulare di  $\text{CO}_2$ , espresso in  $\mu\text{mol di CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Le barre ( $\pm$  errore standard, t test) indicano il valore medio della concentrazione intracellulare ( $P$  value  $< 0,05$ ).

## 4. Discussione

### 4.1 La natura elettrica dei nettari extraflorali

I risultati ottenuti dagli esperimenti di elettrofisiologia extracellulare confermano l'ipotesi che il nettario extraflorale sia una struttura altamente specializzata nel mediare l'interazione tra pianta e formica. La sua stimolazione meccanica da parte della formica genera una risposta elettrica precisa: una depolarizzazione seguita da una lenta ripolarizzazione. Questa viene classificata come una variazione di potenziale (VP) o potenziale a onda lenta (Fromm *et al.*, 2007). Da quanto abbiamo avuto modo di valutare durante le varie prove, l'intensità della risposta elettrica da parte del nettario extraflorale ha una variabilità legata all'intensità del morso della formica. Questa dinamica è in linea con i tratti caratteristici del VP descritti da Fromm e Lautner (2007) nella classificazione dei segnali elettrici negli organismi vegetali.

La generazione di un segnale elettrico è generalmente legata all'attivazione o inibizione di determinati canali ionici presenti sulle membrane di tutte cellule, animali e vegetali, sia di piante non vascolari che di piante vascolari. Nella specie vegetale *Concephalum conicum* la generazione del segnale elettrico coincide con l'aumento della concentrazione citoplasmatica di  $Ca^{2+}$  che a sua volta attiva i canali anionici per l'efflusso di  $Cl^-$  e dunque una conseguente depolarizzazione della membrana. La fase di ripolarizzazione è a carico dell'apertura dei canali del  $K^+$  e della sua fuoriuscita dalla cellula (Trebacz *et al.*; 2006). Nella famiglia delle Caracee, alghe verdi d'acqua dolce, la generazione di un potenziale d'azione è da ricercare nel cambiamento transitorio dell'attività dell'ATP-asi di membrana oltre che all'attivazione dei canali ionici principali ( $Ca^{2+}$ ,  $Cl^-$  e  $K^+$ ) (Vodeneev *et al.*, 2016). Studi più approfonditi sui movimenti rapidi di chiusura dei pulvini della *Mimosa pudica* hanno confermato il coinvolgimento dello ione calcio nella generazione della risposta elettrica ad uno stimolo meccanico come il tocco. Nel 2008 Yao *et al.* osservarono un notevole ritardo nel movimento di chiusura dei pulvini in seguito all'applicazione di vari inibitori per il  $Ca^{2+}$ . Nel 1977, Campbell *et al.* testarono invece l'effetto dell'EDTA, un chelante cationico bivalente. I pulvini della *Mimosa* perdevano la loro capacità di ripiegarsi e l'effetto dell'inibitore fu invertito dopo un trattamento dei pulvini stessi con il calcio.

I risultati ottenuti nella captazione del segnale elettrico in seguito all'infiltrazione di inibitori della stipula di *Vicia faba* concordano con quanto appena riportato. Il trattamento con GAD, inibitore dello ione calcio, ha provocato una drastica diminuzione dell'intensità del segnale elettrico dell'ordine di grandezza di  $-2$ , con tempi di ripolarizzazione maggiori. L'EGTA, altro chelante bivalente, ha invece annullato completamente una qualsiasi variazione del potenziale extracellulare di membrana successiva al morso della formica. Analoghi risultati sono stati ottenuti registrando l'attività elettrica spontanea con il sistema MEA. Queste osservazioni ci portano a pensare che anche nel nettario extrafiore, struttura conosciuta principalmente per la sua produzione di nettare attrattivo, ci sia una particolare attività elettrica di risposta allo stimolo meccanico e che la sua generazione dipenda probabilmente dalla modulazione di concentrazione di  $Ca^{2+}$  nelle cellule coinvolte.

In seguito all'acquisizione dell'attività elettrica del EFN in risposta allo stimolo della formica nelle prove supplementari (III e IV prova) siamo riusciti a comprendere che essa è circoscritta all'area del nettario, in quanto non c'è una propagazione nei tessuti adiacenti (sull'area della stipula e fusto adiacente alla stipula). Questi dati sono stati confermati dall'acquisizione del segnale elettrico extracellulare a doppio elettrodo, in cui contemporaneamente uno era posizionato sul nettario e uno a 0.5 cm di distanza da esso sulla stipula. In elettrofisiologia vegetale la propagazione è un tratto distintivo dei segnali elettrici classificati come potenziali di azione (AP). Gli AP sono rapide variazioni del potenziale elettrico, anch'esse legate all'alterazione dei principali canali ionici sopra descritti (Li *et al.*; 2021). Possiamo inoltre aggiungere che la stimolazione di aree circostanti al nettario extrafiore con il morso della formica non genera alcuna risposta elettrica (I e II prova). Tali osservazioni sono confermate dall'analisi dei segnali elettrici spontanei con l'approccio MEA dove, infatti, si registra una maggiore frequenza nella generazione di segnali elettrici spontanei rispetto ad altre aree fogliari.

La circoscrizione dell'attività elettrica del nettario extrafiore è supportata dalle indagini svolte al confocale con l'applicazione del colorante DiBAC4, un colorante fluorescente voltaggio-dipendente (Baxter *et al.*; 2002), adatto allo studio delle catene di trasduzione del segnale compresa l'attività bioelettrica che caratterizza alcune cellule vegetali, come le cellule di guardia degli stomi studiati in *V. faba* (Hedrich *et al.*; 2018). I cambiamenti nell'intensità della fluorescenza sono correlati ai cambiamenti dei valori del potenziale di membrana (Baxter *et al.*; 2002). Il potenziale di membrana è la differenza di potenziale tra il lato citosolico e la superficie esterna della cellula, e una sua valutazione fornisce informazioni sullo stato energetico e di trasporto degli ioni. È possibile

distinguere tre stati dominanti del potenziale: riposo, iperpolarizzato e depolarizzato (Roelfsema *et al.*; 2005). Un potenziale della membrana cellulare vegetale a riposo dipende principalmente dall'attività dei canali del  $K^+$ , lo stato di iperpolarizzazione è indotto da una maggiore attività delle pompe  $H^+$ -ATPasi (Marten *et al.*; 2007) mentre lo stato di depolarizzazione è invece legato all'attivazione dei canali anionici (Roelfsema *et al.*; 2004). Così come accade nel regno animale, anche nelle piante i principali eventi di trasduzione del segnale sono dei picchi di concentrazione transitori o a lungo termine dello ione  $Ca^{2+}$  (Berridge *et al.*; 2007). L'aumento del calcio a livello di citosol è indotto dall'attivazione dei canali nella membrana plasmatica dipendenti dal ligando o dal voltaggio, insieme all'attivazione di canali che rilasciano calcio da riserve interne alla cellula (Pandey *et al.*; 2007). Nei loro esperimenti sulle cellule di guardia degli stomi della *Vicia faba*, Grabov e Blatt (1998) notarono che l'afflusso di  $Ca^{2+}$  attraverso canali voltaggio dipendenti era accoppiato alle oscillazioni del potenziale di membrana. Nella *Dionea muscipula*, i peli sensoriali posizionati alla base delle trappole convertono la loro mecano-stimolazione in un segnale elettrico, un tipico AP accompagnato da transitorie concentrazioni di ioni calcio (Choi *et al.*; 2016). Negli ultimi anni sono stati identificati canali anionici e cationici di membrana regolati dal calcio (Gutermuth *et al.*; 2013). La loro attivazione, specialmente quella dei canali anionici, può far registrare una depolarizzazione di membrana, e per questo sono stati classificati come "fattori di eccitazione" (Hedrich *et al.*; 2018). Una variazione del potenziale di membrana, come una depolarizzazione, viene esibita dal DiBAC4 con una forte fluorescenza e uno spostamento verso il rosso delle righe spettrali. Nelle sezioni trasversali delle stipule di *V. faba* trattate con il colorante, emerge la marcata attività bioelettrica che caratterizza tutto il tessuto nettario. La fluorescenza in rosso alla base dei tricomi secernenti va ad attenuarsi nelle aree circostanti, e nei tessuti della pagina inferiore della sezione. Il nettario extrafiorente manifesta dunque una natura elettrogenica, in cui lo ione calcio potrebbe giocare un ruolo fondamentale nell'insorgenza dei picchi di depolarizzazione registrati in risposta allo stimolo meccanico e quelli spontanei registrati al MEA.

## 4.2 Fisiologia delle piante durante la simbiosi mutualistica

La resistenza elettrica è una grandezza fisica utilizzata per monitorare lo stato fisiologico delle piante e la sua alterazione in risposta a degli stimoli e stress ambientali (Oyarce *et al.*; 2010). La

resistenza elettrica nei tessuti vegetali sottoposti al passaggio di una corrente continua è formata principalmente da due componenti: la resistenza dell'apoplasto e la resistenza del simplasto. Nell'apoplasto l'acqua si muove attraverso le pareti cellulari e qualsiasi spazio extracellulare riempito d'acqua (senza attraversare la membrana). Nel simplasto invece l'acqua si muove viaggiando di cellula in cellula attraverso la membrana. Lo stato idrico della pianta è dunque un fattore che influisce notevolmente sui valori di tale parametro: una riduzione del contenuto d'acqua nei tessuti può determinare un aumento della resistenza elettrica (Barkas, 1943). Gli esperimenti di acquisizione dei segnali elettrici intracellulari eseguiti sulla *Vicia faba* sono stati mirati ad analizzare i valori di resistenza in quanto sappiamo dalla letteratura che il nettare, sia esso florale o extraflorale, è una soluzione acquosa zuccherina e che la sua produzione richiede sia energia che consumo di acqua da parte della pianta (Pyke *et al.*; 2023).

L'analisi statistica ha mostrato una differenza significativa nei valori medi di resistenza registrati durante la notte tra le piante non visitate e le piante visitate, suggerendo che la stimolazione costante dei nettari da parte delle formiche e dunque la produzione costante di nettare abbia un effetto sul bilancio idrico delle piante. Durante la notte le piante chiudono gli stomi per ridurre al minimo la perdita di acqua, e le formiche perseverano nelle loro visite (come constatato con un time-lapse realizzato in laboratorio dalla durata di 72 ore). La riserva idrica sembra essere utilizzata dalle piante proprio per la continua produzione di nettare, facendo registrare valori di resistenza elettrica più alti rispetto a quelli misurati nelle piante non visitate. Questa dinamica, tuttavia, non sembra influenzare il tasso di crescita delle piante in simbiosi mutualistica rispetto alle piante non in simbiosi. Tale risultato è supportato dall'ipotesi che la produzione di nettare extraflorale sia relativamente economica in termini energetici per le piante; si stima infatti che la sua produzione copra solo l'1% dell'energia totale investita per foglia (O'Dowd, 1979; Rudgers *et al.*; 2004).

I risultati e le conoscenze attuali sul bilancio idrico ed energetico non consentono di trarre conclusioni definitive: andrebbero approfonditi con nuove prove sperimentali finalizzate a indagini mirate allo studio del bilancio idrico delle piante nel rapporto mutualistico.

## 4.3 La natura biochimica ed ultrastrutturale dei nettari extrafloral

### 4.3.1 Sostanze terpeniche

L'indagine istochimica dei nettari extrafloral, unita alle indagini effettuate al confocale e alle estrazioni, ha messo in luce uno degli aspetti più interessanti in termini di alterazioni metaboliche legate alla simbiosi mutualistica con le formiche. I tricomi dei nettari extrafloral visitati sono particolarmente ricchi di vescicole contenenti sostanze terpeniche, distribuite abbondantemente in tutte e quattro le cellule che compongono il tricoma. I terpenoidi sono tra i principali composti volatili (VOC) emessi dalle piante in risposta alle sollecitazioni meccaniche indotte dagli erbivori durante la masticazione. Tali composti hanno funzione di attrazione nei confronti di artropodi carnivori che predano o parassitano gli erbivori (Tholl *et al.*; 2004), agendo come azione di difesa indiretta per la pianta. Nel genere *Passiflora* le sostanze terpeniche vengono accumulate all'interno delle cellule secernenti degli EFNs presenti alla base del picciolo delle foglie e, da come riportato in letteratura tali strutture potrebbero servire da repellenti per disincentivare gli erbivori al consumo di queste ghiandole (Cardoso *et al.*, 2013). È stata inoltre documentata la visita delle formiche, tra cui il genere *Crematogaster*, che come riportato sono attratte dal nettare extraflorale. Il pattugliamento delle formiche offre protezione alla passiflora contro attacchi di patogeni ed erbivori (Silva *et al.*, 2017). Ancora più interessanti sono gli studi condotti da Mannino *et al.* (2017) sul rapporto mutualistico tra la pianta *Origanum vulgare* e le formiche appartenenti al genere *Myrmica* mediato dai terpenoidi. Miscela di sostanze terpeniche volatili, come il carvacrolo e il timolo, influenzano positivamente la locomozione e l'aggressività delle operaie alterando la regolazione aminergica del loro cervello. Questa manipolazione chimica, concludono gli autori, potrebbe garantire e migliorare la fedeltà delle formiche e dunque la protezione della pianta. La differenza nell'abbondanza delle sostanze terpeniche tra i nettari extrafloral visitati e non visitati potrebbe trovare spiegazione nel ruolo fondamentale di tali sostanze nel mantenere saldo il rapporto mutualistico pianta-formica. I nostri risultati fornirebbero prove a sostegno di un coinvolgimento diretto delle sostanze volatili nell'instaurazione e consolidamento del mutualismo con insetti sociali come le formiche. Inoltre, dalla differenza riscontrata tra i due campionamenti effettuati (dopo 8 giorni e dopo 15 giorni) potremmo affermare che la differenza di accumulo delle sostanze terpeniche dipenda non soltanto dalla simbiosi ma anche del tempo trascorso delle piante in relazione con le

formiche. In altre parole, più il mutualismo si protrae nel tempo più l'adattamento metabolico dei nettari extrafloriali si fa marcato.

Il coinvolgimento delle sostanze terpeniche nella relazione pianta-formica andrebbe maggiormente approfondito con un'analisi della componente volatile del nettare e/o del nettario extrafloriale. Questo sosterrrebbe ulteriormente la comprensione dell'elaborata complessità delle dinamiche relazionali che sottendono il mutualistico tra pianta e formica.

#### 4.3.2 Caratterizzazione ultrastrutturale dei tricomi

L'osservazione delle cellule secretorie a livello ultrastrutturale è fondamentale per capire quanto il sistema secretorio caratterizzato da un complesso sistema di endomembrane, organelli e vescicole secretorie venga stimolato dalla presenza delle formiche. Un reticolo endoplasmatico ben sviluppato, un numero cospicuo di vescicole, strutture lipidiche prominenti e caratteristiche protuberanze della parete, sono indice di una attiva sintesi e trasporto dei componenti del nettare extrafloriale e di intensi processi di secrezione ghiandolare durante la simbiosi mutualistica.

La cospicua presenza dei corpi elettron-densi identificati tramite microscopia elettronica, e identificati come corpi lipidici tramite microscopia confocale, potrebbe essere l'indice di una risposta alla costante stimolazione dei nettari extrafloriali da parte delle formiche. Questi corpi lipidici, infatti, potrebbero essere delle vescicole di natura lipidica contenenti metaboliti secondari, tipo i terpeni. Kolb e Müller (2004) tramite le loro analisi istochimiche dei tricomi secernenti della *Cucurbita pepo* hanno riportato la presenza di riserve lipidiche nelle cellule apicali, suggerendo una loro possibile mobilitazione di monoterpeni. I tricomi fogliari secernenti di *Betula* sp. sono specializzati nella produzione di composti fenolici e sono caratterizzati dalla presenza di gocce lipidiche citoplasmatiche (Valkama *et al.*, 2003). Questo fa supporre agli autori che le sostanze lipidiche possano fungere da riserva per la produzione di sostanze fenoliche. L'abbondanza delle vescicole lipidiche all'interno dei tricomi secernenti di *V. faba* in simbiosi mutualistica con le formiche potrebbe spiegare l'abbondanza dei terpeni riscontrati dalle analisi. Un maggiore accumulo di sostanze terpeniche nei tricomi visitati potrebbe essere sostenuto da un importante accumulo di riserve lipidiche.

L'intensificazione della ramificazione e dell'anastomosi delle protuberanze della parete cellulare, portando alla creazione di un intricato sistema interconnesso che si estende

profondamente nella regione citoplasmatica più interna, è l'alterazione ultrastrutturale più evidente che abbiamo osservato e analizzato. Queste strutture sono state descritte in ghiandole nettariifere di diverse specie vegetali e servono ad aumentare la superficie secretiva totale del plasmalemma nelle cellule secernenti. Di conseguenza, le protuberanze della parete facilitano la rapida secrezione di grandi volumi di nettare in un breve periodo di tempo attraverso l'esocitosi (Bosabalidis, 2010). Questo tratto era già stato riportato in precedenza da Tarkowska *et al.* (1981) nella sua indagine sui tricomi dei EFN di *Vicia faba* e da Stpiczyńska (1995) nella sua caratterizzazione ultrastrutturale dei tricomi dei EFN di 10 specie di *Vicia*. Probabilmente, la diminuzione dello spessore di parete nei tricomi visitati è legata a questa intensa attività secretoria. L'ipotesi è che il pool citosolico degli zuccheri non venga mobilitato per irrobustire la parete cellulare, ma per garantire la produzione di nettare richiesta.

Tale organizzazione cellulare, insieme alla presenza di vescicole citosoliche, indica probabilmente una secrezione di tipo granulocrina degli zuccheri del nettare ed altri componenti metabolici, che si accumulano preventivamente nelle cisterne del reticolo dell'endoplasma o nei corpi del Golgi (Vassilyev, 2010).

Altro tratto tipico dei tricomi secernenti che abbiamo osservato ma non quantificato, è la presenza di un numero maggiore di mitocondri, che indicano un alto tasso metabolico delle cellule impegnate nella produzione di nettare e metaboliti secondari (Muravnik, 2021).

### 4.3.3 Sostanze lipidiche

Le immagini ottenute al confocale del nettario extrafioreale di *V. faba* non visitato dalle formiche hanno ribadito l'elevata specializzazione del tessuto nettariifero rispetto ai tessuti circostanti della stipula. Oltre alle gocce lipidiche presenti nelle cellule dei tricomi già osservate, descritte e quantificate nelle sezioni trasversali degli EFN trattati con il Rosso Nilo, risalta l'abbondanza dei lipidi nella cuticola che circonda i tricomi.

Alcuni tricomi secernenti descritti in bibliografia (Werker, 1993) sono caratterizzati dall'aver una cuticola formata principalmente da lipidi, sotto la quale si accumula temporaneamente il secreto prodotto. Questa dinamica secretoria è stata descritta nella caratterizzazione ultrastrutturale dei tricomi degli EFN. La cuticola dei tricomi ha inoltre una permeabilità maggiore rispetto alla cuticola che circonda le cellule dell'epidermide, a sostegno del carattere secretorio dei tricomi. La cuticola ha

anche la funzione di proteggere le cellule sottostanti da potenziali attacchi di patogeni, raggi UV, dalla disidratazione e da tensioni meccaniche (Berhin *et al.*; 2022).

La via metabolica per la formazione dei triacilgliceroli, l'accumulo in vescicole lipidiche e la mobilitazione per il riversamento nello spessore della cuticola è complessa. Lo riassumiamo brevemente. Dall'attività fotosintetica dei cloroplasti, l'acetil-CoA viene carbossilato a malonil-CoA, il quale a sua volta viene convertito nel complesso malonil-ACP. Quest'ultimo entra nel ciclo di reazioni di sintesi degli acidi grassi, i quali una volta formati escono dal cloroplasto e vengono indirizzati tramite il Coenzima A verso la via metabolica di sintesi dei triacilgliceroli. Questi ultimi vengono successivamente immagazzinati all'interno di gocce lipidiche che fungono da riserva per le varie funzioni metaboliche e strutturali della cellula (Fig. 41a) (Miklaszewska *et al.*, 2021). Tra queste appunto, la formazione e il costante rinnovo della cuticola (Fig. 41b).

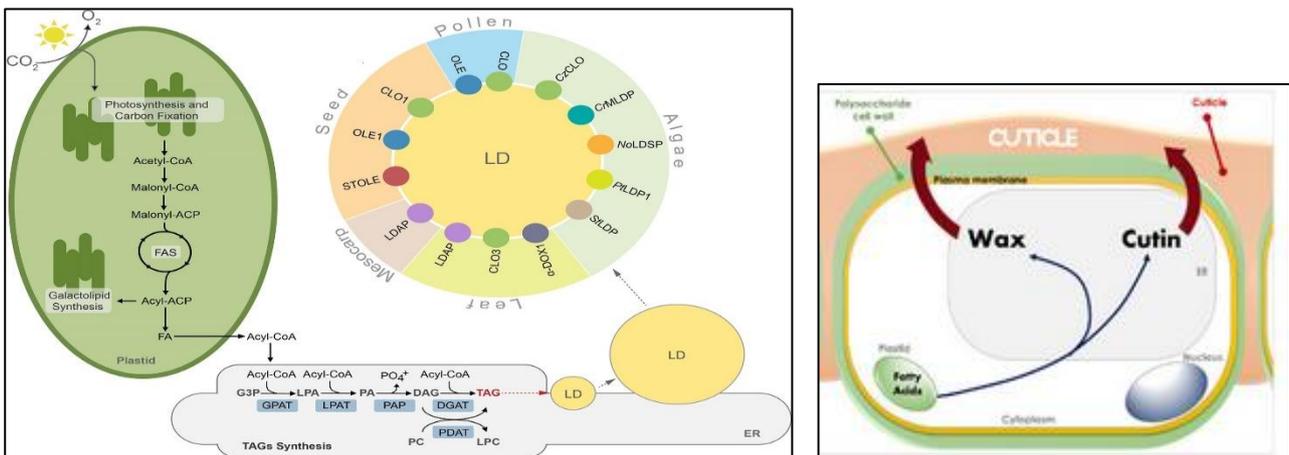


Figura 41: formazione delle gocce lipidiche di riserva e formazione di cuticola.

La presenza di cuticola insieme all'accumulo di sostanze terpeniche potrebbe spiegare la presenza costante di queste riserve lipidiche nei tricomi dei nettari.

#### 4.4 Analisi morfo-fisiologica delle piante

La simbiosi mutualistica tra piante e formiche è una dinamica relazionale che esprime a pieno i suoi vantaggi in natura tanto che, la protezione da attacchi di erbivori e patogeni che le piante ricevono è stata testimoniata in tantissime specie vegetali, e in diversi ecosistemi naturali. Nel 2009

Rosumel *et al.* esaminarono le prove sul ruolo delle formiche come difese biotiche delle piante, conducendo una metanalisi sugli effetti della rimozione sperimentale delle formiche sugli erbivori e sulla forma fisica delle piante con dati raccolti da numerosissimi studi. Le piante da cui sono state allontanate le formiche hanno subito quasi il doppio dei danni da parte degli erbivori che infatti sono risultati aumentati del 50% rispetto alle piante con formiche. Le formiche hanno anche influenzato diversi parametri della forma fisica delle piante, che hanno subito una riduzione della biomassa (-23,7%), della produzione di foglie (-51,8%) e della riproduzione (-24,3%). Gli effetti sono stati molto più forti nelle regioni tropicali rispetto a quelle temperate. Le piante tropicali hanno subito danni da erbivori quasi tre volte superiori rispetto alle piante delle regioni temperate e hanno mostrato un numero di erbivori tre volte superiore. La rimozione delle formiche nelle piante tropicali ha comportato una diminuzione della taglia delle piante di circa il 59%, mentre nelle piante temperate questa riduzione non è stata statisticamente significativa.

A confronto, gli studi sulla protezione da patogeni sono ancora pochi. Letourneau (1998) rilevò attacchi funginei notevolmente ridotti sulle infiorescenze della specie mirmecofita obbligata *Piper sagittifolium* quando su di essa erano presenti le formiche *Pheidole bicornis*. Piante in simbiosi subiscono una riduzione di oltre dieci volte delle infiorescenze infette rispetto alle piante da cui erano state allontanate le formiche. In un'altra mirmecofita obbligata, *Macaranga triloba*, Heil *et al.* (1999) riportano elevati livelli di protezione dagli agenti patogeni. Tre settimane dopo aver infettato con funghi patogeni delle ferite realizzate artificialmente sul tronco di *Macaranga*, viene riscontrata una riduzione di dieci volte delle ferite infette sugli alberi visitati dalla formica *Crematogaster sp.*, rispetto ai controlli senza formiche. I ricercatori osservarono che le formiche svolgevano un'attività di rimozione delle ife fungine dalle ferite.

In merito alla *Vicia faba*, diversi sono gli studi che riportano i benefici della simbiosi mutualistica con le formiche e il ruolo centrale dei EFNs nella mediazione del rapporto pianta-insetto. Mondor *et al.* (2003) hanno dimostrato che nelle piante di fava, per le quali è stato impedito l'arrivo delle formiche, il numero complessivo dei EFNs su una pianta aumenta notevolmente in seguito al danno fogliare da erbivori, sostenendo l'ipotesi che l'aumento del numero dei nettari e quindi della produzione di nettare extrafiore sia una risposta adattativa inducibile per attirare artropodi predatori quando aumenta il rischio di attacchi da erbivori. Le piante in simbiosi mutualistica registrano in tal modo meno danni da erbivori, che si riflettono positivamente sul tasso di crescita e produzione.

Nell'ambiente in cui si sono svolti gli esperimenti del presente studio, ovvero una camera di crescita con condizioni di luce e umidità controllati, le piante di *Vicia faba* non visitate dalle formiche si sono sviluppate senza alterazioni nella crescita rispetto alle piante in simbiosi con le formiche. I benefici del mutualismo sulla *Vicia faba* sono alterati dal fatto che non ci sono patogeni o erbivori da combattere, ma non per questo le piante sarebbero dovute crescere in maniera diversa rispetto al controllo. L'assenza di una differenza nei parametri morfologici presi in esame è sintomo di uno stato generale di benessere delle piante appartenenti alle due tesi. Questo risultato è supportato anche dai dati fisiologici analizzati. Il tasso netto fotosintetico, la conduttanza stomatica e la concentrazione intracellulare di CO<sub>2</sub> sono parametri che aiutano a comprendere lo stato fisiologico della pianta, la sua alterazione in risposta a stress abiotici, come acqua, temperatura e luce (Damour *et al.*; 2010). L'assenza di una differenza tra le due tesi ci porta di nuovo alla conclusione che la presenza costante delle formiche e la loro costante interazione con i nettari extrafloriali non sia fonte di stress per le piante. L'unico aspetto morfologico a presentare una differenza statistica significativa tra le due tesi è stata l'area dei nettari extrafloriali. Nelle piante in simbiosi mutualistica con le formiche i nettari appaiono più grandi, estendendo l'area fino al doppio di quella misurata nelle piante non visitate. Una possibile spiegazione per questo fenomeno può essere ricercata nelle diverse tattiche di attrazione che le piante hanno sviluppato per l'instaurazione della simbiosi mutualistica. I nettari extrafloriali di *Vicia faba* appaiono come strutture di colore rosso/marrone scuro a causa dell'accumulo di antociani nei tricomi (Wiens, 2016), pigmenti che agiscono come agenti visivi attrattivi per gli insetti (Muravnik, 2021). Insieme all'aumento della produzione e accumulo di VOCs nei tricomi secernenti, l'incremento delle aree dei EFNs potrebbe giocare un ruolo fondamentale nel mantenere e rinforzare il rapporto mutualistico con le formiche. La loro persistente stimolazione dei nettari per la produzione di nettare potrebbe essere dunque il motivo per il quale queste strutture risultano ampliate, potendo così garantire nel tempo una produzione di nettare adeguata alla domanda.

#### 4.5 L'interazione pianta-formica

Se da una parte, a livello macroscopico, il rapporto con le formiche in ambiente controllato non altera lo sviluppo delle piante, dall'altra importanti differenze ultrastrutturali e metaboliche

sono emerse come conseguenza della simbiosi. A tale proposito è interessante il dato che emerge dal confronto della natura elettrogenica dei EFNs visitati con quella esaminata nei EFNs non visitati.

Come già discusso, il colorante DiBAC4 ha evidenziato un'intensa attività elettrica in corrispondenza del tessuto nettario prelevato dalle piante non visitate dalle formiche. Nei nettari extrafloral visitati dalle formiche, questa attività elettrica tuttavia diminuisce significativamente di intensità, ma rimane sempre ben distinta dai tessuti della stipula che la circondano. Per cercare di interpretare questi risultati prendiamo in esame la plasticità comportamentale della *Mimosa pudica*. I pulvini possono adattare la loro risposta di chiusura alla stimolazione elettrica o meccanica in modo da riaprirsi a stimoli ripetuti. In altre parole, la *Mimosa pudica* diminuisce la risposta ad uno stimolo ritenuto non dannoso, simile all'assuefazione negli animali (Groves e Thompson, 1970). E di fatti, i meccanismi coinvolti nella plasticità comportamentale della mimosa sembrano avere caratteristiche in comune con quelli appartenenti agli organismi animali. Questi sono principalmente: trasmissione e propagazione del potenziale elettrico; scambio ionico; modifica della permeabilità di membrana; coinvolgimento di cationi; uso di sostanze simili a trasmettitori e dipendenza energetica (Applewhite, 1972). Si potrebbe ipotizzare che la stimolazione meccanica costante dei nettari extrafloral da parte delle formiche (rilevata, come descritto in precedenza, da un time-lapse) possa provocare una risposta di adattamento, con conseguente diminuzione dell'attività bioelettrica alla base dei tricomi secernenti.

Questa ipotesi di risposta delle piante ad una stimolazione meccanica costante viene supportata dai risultati ottenuti dalle indagini svolte con la tecnologia MEA, che ha evidenziato una differenza statistica significativa nel numero delle depolarizzazioni spontanee tra i EFNs non visitati e quelli visitati. In questi ultimi l'attività elettrica spontanea permane ma diminuisce, facendo supporre che il morso delle formiche potrebbe essere percepito come uno stimolo non dannoso da parte della *V. faba*, che continua a produrre e secernere nettare.

## 5. Conclusione

I risultati della presente ricerca ci portano a concludere che il nettario extrafioreale della *Vicia faba* sia una struttura altamente specializzata nella mediazione del rapporto mutualistico con le formiche, caratterizzata da una natura elettrogenica intrinseca e dalla capacità di adattarsi alla loro presenza con modificazioni ultrastrutturali, metaboliche e morfologiche.

La sua stimolazione meccanica genera un chiaro segnale di depolarizzazione, che non si propaga nei tessuti circostanti ma rimane confinato nell'area nettarifera e che determina, probabilmente, una cascata di segnalazione interna atta ad attivare la produzione e il rilascio della sostanza zuccherina attrattiva e appetibile per le formiche. La difesa che esse offrono alla pianta è dunque ricompensata, ed è una forma di difesa indiretta tanto importante quanto specializzata che i tricomi dei nettari extrafioreali manifestano notevoli cambiamenti tutti finalizzati al mantenimento del mutualismo. Abbondano nei tricomi secernenti visitati dalle formiche vescicole secretorie, evidenze di un corposo rilascio di nettare, e corpi lipidici che potrebbero fungere da precursori per la formazione di alcuni metaboliti secondari o mobilitati per il continuo rinnovo del sistema di endomembrane e per la formazione della cuticola. L'accumulo delle sostanze terpeniche, attrattive per alcuni insetti, e l'aumento dell'area nettarifera sono ulteriori prove di come la presenza delle formiche sia percepita come elemento di vantaggio per la pianta, che investe energie nel mantenere stabile il rapporto mutualistico.

Il nettario extrafioreale è dunque un'interfaccia interattiva, in grado di percepire la presenza delle formiche con la generazione di un segnale elettrico, il quale a sua volta determina specifiche risposte nel breve e nel lungo termine. È un organo altamente specializzato nella mediazione del rapporto mutualistico, e dall'ipotesi che le sostanze terpeniche giochino un ruolo decisivo nell'attrarre le formiche e consolidare il loro rapporto, scaturisce l'idea che la pianta possa manipolare a proprio vantaggio l'attività difensiva di questi insetti. Idea supportata anche dall'aumento dell'area del nettario come conseguenza della sua costante stimolazione. Inoltre, la disposizione verticale di questi organi elettrogenici lungo il fusto della pianta assicura una ben distribuita presenza delle formiche, il cui comportamento territoriale e predatorio è fondamentale per la protezione contro patogeni ed erbivori.

È da sottolineare che le piante mirmecofite e mirmecofile hanno una lunghissima storia di coevoluzione con le formiche, che ha determinato l'instaurarsi e il perfezionamento di un rapporto mutualistico attraverso sofisticate strutture quali i nettari extraflorali.

## 6. Bibliografia

**Adams, D. S., & Levin, M. (2012).** General principles for measuring resting membrane potential and ion concentration using fluorescent bioelectricity reporters. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2012(4), pdb-top067710.

**Agarwal, V. M., N. Rastogi , and S. V. S. Raju . 2007.** Impact of predatory ants on two lepidopteran insect pests in Indian cauliflower agroecosystems . *Journal of Applied Entomology* 131: 493 -5 00.

**Aljbery, Z.; Chen, M.** Indirect plant defense against insect herbivores: A review. *Insect Sci.* 2018, 25, 2–23

**Applewhite, P. B. (1972).** Behavioral plasticity in the sensitive plant, *Mimosa*. *Behavioral Biology*, 7(1), 47-53.

**Aranda-Rickert, A.; Diez, P.; Marazzi, B.** Extrafloral nectar fuels ant life in deserts. *AoB Plants* 2014, 6, plu068

**Arimura, G. I., Kost, C., & Boland, W. (2005).** Herbivore-induced, indirect plant defences. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1734(2), 91-111.

**Barkas, W. W., Hearmon, R. F. S., & Pratt, G. H. (1943).** Electrical resistance of wood. *Nature*, 151(3820), 83-83.

**Baxter, D.F., Kirk, M., Garcia, A.F., Raimondi, A., Holmqvist, M.H., Flint, K., Bojanic, D., Distefano, P.S., Curtis, R. and Xie, Y. (2002)** A novel membrane potential sensitive fluorescent dye improves cell-based assays for ion channels. *J. Biomol. Screen.* 7, 79 – 85.

**Beilby, M. J. (2007).** Action potential in charophytes. *International review of cytology*, 257, 43-82.

**Bentley, B. L. (1977).** Extrafloral nectaries and protection by pugnacious bodyguards. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 8(1), 407-427.

**Berhin**, A., Nawrath, C., & Hachez, C. (2022). Subtle interplay between trichome development and cuticle formation in plants. *New Phytologist*, 233(5), 2036-2046.

**Berridge**, M.J., Bootman, M.D. and Roderick, H.L. (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 517 – 529.

**Bertholon**, N. (1783). *De L'Électricité Des Végétaux (etc.)*. Chez PF Didot Jeune.

**Bosabalidis**, A. M. (2010). Wall protuberance formation and function in secreting salt glands of *Tamarix aphylla* L. *Acta Botanica Croatica*, 69(2.), 229-235.

**Brenner**, E. D., Stahlberg, R., Mancuso, S., Vivanco, J., Baluška, F., & Van Volkenburgh, E. (2006). Plant neurobiology: an integrated view of plant signaling. *Trends in plant science*, 11(8), 413-419.

**Bronstein**, J. L., Alarcón, R., & Geber, M. (2006). The evolution of plant–insect mutualisms. *New Phytologist*, 172(3), 412-428.

**Bruce**, T. J., Wadhams, L. J., & Woodcock, C. M. (2005). Insect host location: a volatile situation. *Trends in plant science*, 10(6), 269-274.

**Blüthgen**, N., Verhaagh, M., Goitía, W., Jaffé, K., Morawetz, W., & Barthlott, W. (2000). How plants shape the ant community in the Amazonian rainforest canopy: the key role of extrafloral nectaries and homopteran honeydew. *Oecologia*, 125, 229-240.

**Boland**, W., Hopke, J., Donath, J., Nüske, J., & Bublitz, F. (1995). Jasmonic acid and coronatin induce odor production in plants. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 34(15), 1600-1602.

**Bulychev**, A. A., Kamzolkina, N. A., Luengviriya, J., Rubin, A. B., & Müller, S. C. (2004). Effect of a single excitation stimulus on photosynthetic activity and light-dependent pH banding in *Chara* cells. *The Journal of membrane biology*, 202, 11-19.

**Burdon-Sanderson**, J. S. (1873). I. Note on the electrical phenomena which accompany irritation of the leaf of *Dionæa muscipula*. *Proceedings of the Royal Society of London*, 21(139-147), 495-496.

**Camara**, T.; Leal, I.R.; Bluethgen, N.; Oliveira, F.M.P.; de Queiroz, R.T.; Arnan, X. Effects of chronic anthropogenic disturbance and rainfall on the specialization of ant-plant mutualistic networks in the Caatinga, a Brazilian dry forest. *J. Anim. Ecol.* 2018, 87, 1022–1033.

**Cardoso-Gustavson**, P., Andreazza, N. L., Sawaya, A. C., & de Moraes Castro, M. (2013). Only attract ants? The versatility of petiolar extrafloral nectaries in *Passiflora*.

**Champ** M, 2002. Foreword. *Brit. J. Nutr.* 88:237.

**Campbell**, N.A.; Thomson, W.W. Effects of lanthanum and ethylenediaminetetraacetate on leaf movements of *Mimosa*. *Plant Physiol.* 1977, 60, 635–639

**Cheeseman**, J. M., & Pickard, B. G. (1977). Electrical characteristics of cells from leaves of *Lycopersicon*. *Canadian Journal of Botany*, 55(5), 497-510.

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

**Choi**, W.G. et al. (2016) Rapid, long-distance electrical and calcium signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 67, 287–307.

**Comparini**, D., Masi, E., Pandolfi, C., Sabbatini, L., Dolfi, M., Morosi, S., & Mancuso, S. (2020). Stem electrical properties associated with water stress conditions in olive tree. *Agricultural Water Management*, 234, 106109.

**Crump**, N. S., Cother, E. J., & Ash, G. J. (1999). Clarifying the nomenclature in microbial weed control. *Biocontrol Science and Technology*, 9(1), 89.

**David, R., & Carde, J. P. (1964).** Coloration différentielle des inclusions lipidiques et terpéniques des pseudophylles du *Pin maritime* au moyen du réactif NADI. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 258: 1338-1340

**Davies, E., & Schuster, A. (1981).** Intercellular communication in plants: evidence for a rapidly generated, bidirectionally transmitted wound signal. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(4), 2422-2426.

**Davies E.** Electrical signals in plants: Facts and hypotheses. *Plant Electrophysiol* 2006:407-22

**Davies, E., & Stankovic, B. (2006).** Electrical signals, the cytoskeleton, and gene expression: a hypothesis on the coherence of the cellular responses to environmental insult. In *Communication in plants: neuronal aspects of plant life* (pp. 309-320). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg

**Darwin, C. (1875).** *The movements and habits of climbing plants*. John Murray.

**Darwin, C. (1881).** Movements of plants. *Nature*, 23(592), 409-409.

**de la Fuente, M. A. S., & Marquis, R. J. (1999).** The role of ant-tended extrafloral nectaries in the protection and benefit of a Neotropical rainforest tree. *Oecologia*, 118(2), 192-202

**Demidchik, V., Nichols, C., Oliynyk, M., Dark, A., Glover, B. J., & Davies, J. M. (2003).** Is ATP a signaling agent in plants? *Plant Physiology*, 133(2), 456-461.

**Dicke, M., Van Loon, J. J., & Soler, R. (2009).** Chemical complexity of volatiles from plants induced by multiple attack. *Nature chemical biology*, 5(5), 317-324.

**Dudareva, N., Negre, F., Nagegowda, D. A., & Orlova, I. (2006).** Plant volatiles: recent advances and future perspectives. *Critical reviews in plant sciences*, 25(5), 417-440.

**D. Tholl, C. M. Kish, I. Orlova, et al.,** "Formation of Monoterpenes in *Antirrhinum majus* and *Clarkia breweri* Flowers Involves Heterodimeric Geranyl Diphosphate Synthases," *The Plant Cell*, Vol. 16, No. 4, 2004, pp. 977- 992.

**Elias, T. S.** (1983). Extrafloral nectaries: their structure and distribution. *The biology of nectaries*, 174-203.

**Epps, D. E., Wolfe, M. L., & Groppi, V.** (1994). Characterization of the steady-state and dynamic fluorescence properties of the potential-sensitive dye bis-(1, 3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol (Dibac4 (3)) in model systems and cells. *Chemistry and physics of lipids*, 69(2), 137-150.

**Escalante-Pérez, M., & Heil, M.** (2012). Nectar secretion: its ecological context and physiological regulation. *Secretions and exudates in biological systems*, 187-219.

**Fahn, A.** (1988) Secretory tissues in vascular plants. *New Phytol.* 108, 229–257.

**Farmer, E. E., Gao, Y. Q., Lenzoni, G., Wolfender, J. L., & Wu, Q.** (2020). Wound-and mechanostimulated electrical signals control hormone responses. *New Phytologist*, 227(4), 1037-1050.

**Felle, H. H., & Zimmermann, M. R.** (2007). Systemic signalling in barley through action potentials. *Planta*, 226, 203-214.

**Fiala, B., & Linsenmair, K. E.** (1995). Distribution and abundance of plants with extrafloral nectaries in the woody flora of a lowland primary forest in Malaysia. *Biodiversity & Conservation*, 4, 165-182.

**Fritzsche** Hoballah ME, Turlings TJC. 2001b. Benefits and costs of induced volatile production in maize plants. In I Baldwin, M Dicke, E Haukioja, B Mauch-Mani, A Schmitt, eds. *Induced resistance in Plants against Insects and Diseases. IOBC/wprs Bulletin*, 95

**Fromm, J., & Lautner, S.** (2007). Electrical signals and their physiological significance in plants. *Plant, cell & environment*, 30(3), 249-257.

**Frost, C. J., Appel, H. M., Carlson, J. E., De Moraes, C. M., Mescher, M. C., & Schultz, J. C.** (2007). Within-plant signalling via volatiles overcomes vascular constraints on systemic signalling and primes responses against herbivores. *Ecology Letters*, 10(6), 490-498.

**Galston, A. W., & Slayman, C. L. (1979).** The not-so-secret life of plants: In which the historical and experimental myths about emotional communication between animal and vegetable are put to rest. *American Scientist*, 67(3), 337-344.

**Gershenzon, J.; Dudareva, N.** The function of terpene natural products in the natural world. *Nat. Chem. Biol.* 2007, 3, 408–414

**Gerdeman J.W.** 1968. Vesicular-arbuscular mycorrhiza and plant growth. *Ann. Rev. Phytopath.* 60: 397–418.

**Ghorai, N., Chakraborty, S., Guichait, S., Saha, S. K., & Biswas, S. (2012).** Estimation of total Terpenoids concentration in plant tissues using a monoterpene, Linalool as standard reagent.

**Gosling, P., Hodge, A., Goodlass, G., & Bending, G. D. (2006).** Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming. *Agriculture, ecosystems & environment*, 113(1-4), 17-35.

**Gotwald, W. H.** 1986. The beneficial economic role of ants. pp. 290-313. In, *Economic Impact and Control of Social Insects*. S. B. Vinson (Editor). Praeger Publishers. New York, NY, U.S.A. 421 pp.

**Grabov, A. and Blatt, M.R. (1998)** Membrane voltage initiates Ca<sup>2+</sup> waves and potentiates Ca<sup>2+</sup> increases with abscisic acid in stomatal guard cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 95, 4778 – 4783.

**Grams, T. E., Lautner, S., Felle, H. H., Matyssek, R., & Fromm, J. (2009).** Heat-induced electrical signals affect cytoplasmic and apoplastic pH as well as photosynthesis during propagation through the maize leaf. *Plant, Cell & Environment*, 32(4), 319-326.

**Grangier, J., Dejean, A., Malé, P. J. G., & Orivel, J. (2008).** Indirect defense in a highly specific ant-plant mutualism. *Naturwissenschaften*, 95, 909-916.

**Groves, P. M., & Thompson, R. F. (1970).** Habituation: a dual-process theory. *Psychological review*, 77(5), 419.

**Gutermuth**, T. et al. (2013) Pollen tube growth regulation by free anions depends on the interaction between the anion channel SLAH3 and calcium-dependent protein kinases CPK2 and CPK20. *Plant Cell* 25, 4525–4543.

**Hedrich**, R., & Neher, E. (2018). Venus flytrap: how an excitable, carnivorous plant works. *Trends in Plant Science*, 23(3), 220-234

**Heil** M, Fiala B, Baumann B, Linsenmair KE. 2000. Temporal, spatial and biotic variations in extrafloral nectar secretion by *Macaranga tanarius*. *Functional Ecology*

**Heil**, M., Fiala, B., Maschwitz, U., & Linsenmair, K. E. (2001). On benefits of indirect defence: short- and long-term studies of antiherbivore protection via mutualistic ants. *Oecologia*, 126, 395-403.

**Heil**, M., & McKey, D. (2003). Protective ant-plant interactions as model systems in ecological and evolutionary research. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34(1), 425-553.

**Heil**, M., & Silva Bueno, J. C. (2007). Within-plant signaling by volatiles leads to induction and priming of an indirect plant defense in nature. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(13), 5467-5472.

**Heil**, M., Rattke, J., & Boland, W. (2005). Postsecretory hydrolysis of nectar sucrose and specialization in ant/plant mutualism. *Science*, 308(5721), 560-563.

**Heil**, M. (2011). Nectar: generation, regulation and ecological functions. *Trends in plant science*, 16(4), 191-200.

**Heil**, M. Extrafloral Nectar at the Plant-Insect Interface: A Spotlight on Chemical Ecology, Phenotypic Plasticity, and Food Webs. *Annu. Rev. Entomol.* 2015, 60, 213–232

**Heil**, M. (2008). Indirect defence via tritrophic interactions. *New Phytologist*, 178(1), 41-61

**Heil, M.** (2011). Nectar: generation, regulation and ecological functions. *Trends in plant science*, 16(4), 191-200.

**Heneidak, S., & Hassan, A. E.** (2007). Morphological and anatomical studies of floral and extrafloral nectaries in some Vicia taxa (Fabaceae). *International Journal of Botany*.

**Holopainen, J. K.** (2004). Multiple functions of inducible plant volatiles. *Trends in plant science*, 9(11), 529-533.

**Huang, H. T. and P. Yang.** 1987. The ancient cultured citrus ant. *BioScience* 37: 665 -6 71.

**Jensen, E. S., Peoples, M. B., & Hauggaard-Nielsen, H.** (2010). Faba bean in cropping systems. *Field crops research*, 115(3), 203-216.

**Jönsson, M., Lindkvist, A., & Anderson, P.** (2005). Behavioural responses in three ichneumonid pollen beetle parasitoids to volatiles emitted from different phenological stages of oilseed rape. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 115(3), 363-369.

**Junker, R. R., & Tholl, D.** (2013). Volatile organic compound mediated interactions at the plant-microbe interface. *Journal of chemical ecology*, 39, 810-825.

**Katicheva, L., Sukhov, V., Akinchits, E., & Vodeneev, V.** (2014). Ionic nature of burn-induced variation potential in wheat leaves. *Plant and Cell Physiology*, 55(8), 1511-1519.

**Kappers, I. F., Hoogerbrugge, H., Bouwmeester, H. J., & Dicke, M.** (2011). Variation in herbivory-induced volatiles among cucumber (*Cucumis sativus* L.) varieties has consequences for the attraction of carnivorous natural enemies. *Journal of chemical ecology*, 37, 150-160.

**Kessler, A., Halitschke, R., Diezel, C., & Baldwin, I. T.** (2006). Priming of plant defense responses in nature by airborne signaling between *Artemisia tridentata* and *Nicotiana attenuata*. *Oecologia*, 148, 280-292.

**Kessler**, Andre, and Martin Heil. "The multiple faces of indirect defences and their agents of natural selection." *Functional Ecology* 25, no. 2 (2011): 348-357.

**Koenig**, A. M., Benning, C., & Hoffmann-Benning, S. (2020). Lipid trafficking and signaling in plants. In *Lipid Signaling and Metabolism* (pp. 23-44). Academic Press.

**Kolb**, D., & Müller, M. (2004). Light, conventional and environmental scanning electron microscopy of the trichomes of *Cucurbita pepo* subsp. *pepo* var. *styriaca* and histochemistry of glandular secretory products. *Annals of Botany*, 94(4), 515-526.

**Kram**, B.W. and Carter, C.J. (2009) *Arabidopsis thaliana* as a model for functional nectary analysis. *Sexual Plant Reprod.* 22, 235–246

**Krips**, O. E., Willems, P. E. L., Gols, R., Posthumus, M. A., Gort, G., & Dicke, M. (2001). Comparison of cultivars of ornamental crop *Gerbera jamesonii* on production of spider mite-induced volatiles, and their attractiveness to the predator, *Phytoseiulus persimilis*. *Journal of Chemical Ecology*, 27, 1355-1372.

**Ksenzhek**, O. S., & Volkov, A. G. (1998). *Plant energetics*. Elsevier.

**Kunert** M, Biedermann A, Koch T, Boland W. 2002. Ultrafast sampling and analysis of plant volatiles by a hand-held miniaturised GC with pre-concentration unit: kinetic and quantitative aspects of plant volatile production. *Journal of Separation Science* 25: 677–684.

**Kuo**, J. and Pate, J.S. (1985) The extrafloral nectaries of cowpea (*Vicia unguiculata* (L.) Wapp). 1. Morphology, anatomy and fine-structure. *Planta* 166, 15–27

**Lange**, D., & Del-Claro, K. (2014). Ant-plant interaction in a tropical savanna: may the network structure vary over time and influence on the outcomes of associations? *PLoS One*, 9(8), e105574.

**Lautner**, S., Grams, T. E. E., Matyssek, R., & Fromm, J. (2005). Characteristics of electrical signals in poplar and responses in photosynthesis. *Plant Physiology*, 138(4), 2200-2209.

**Letourneau**, D. K. (1998). Ants, stem-borers, and fungal pathogens: experimental tests of a fitness advantage in Piper ant-plants. *Ecology*, *79*(2), 593-603.

**Li**, J. H., Fan, L. F., Zhao, D. J., Zhou, Q., Yao, J. P., Wang, Z. Y., & Huang, L. (2021). Plant electrical signals: A multidisciplinary challenge. *Journal of Plant Physiology*, *261*, 153418.

**Luyet**, B. J. (1932). Variation of the electric resistance of plant tissues for alternating currents of different frequencies during death. *The Journal of general physiology*, *15*(3), 283.

**Malone**, M. (1994). Wound-induced hydraulic signals and stimulus transmission in *Mimosa pudica* L. *New Phytologist*, *128*(1), 49-56.

**Malone**, M. (1996). Rapid, long-distance signal transmission in higher plants. *Advances in botanical research*, *22*, 163-228.

**Mancuso** S. (1999) Hydraulic and electrical transmission of wound induced signals in *Vitis vinifera*. *Australian Journal of Plant Physiology* *26*, 55–61.

**Manning**, R. (2006) - Honeybee pollination technical data for potential honey bee pollinated crops and orchards in Western Australia. Bulletin 4298. Department of Agriculture and Food Western Australia, Perth. [cit. 2016- 07-04].

**Mannino**, G., Abdi, G., Maffei, M. E., & Barbero, F. (2018). *Origanum vulgare* terpenoids modulate *Myrmica scabrinodis* brain biogenic amines and ant behaviour. *PLoS One*, *13*(12), e0209047.

**Marazzi**, B.; Bronstein, J.L.; Koptur, S. The diversity, ecology and evolution of extrafloral nectaries: Current perspectives and future challenges. *Ann. Bot.* 2013, *111*, 1243–1250.

**Marten**, H., Hedrich, R., & Roelfsema, M. R. G. (2007). Blue light inhibits guard cell plasma membrane anion channels in a phototropin-dependent manner. *The Plant Journal*, *50*(1), 29-39.

**Masi, E., Azzarello, E., Mancuso, S. (2012).** Multielectrode Array: A New Approach to Plant Electrophysiology. In *Plant electrophysiology*. Springer, Berlin, Heidelberg, 187–204.

**Mathur, V.; Wagenaar, R.; Caissard, J.; Reddy, A.S.; Vet, L.E.M.; Cortesero, A.; van Dam, N.M.** A novel indirect defence in *Brassicaceae*: Structure and function of extrafloral nectaries in *Brassica juncea*. *Plant Cell Environ.* 2013, *36*, 528–541.

**McCormick, A. C., Unsicker, S. B., & Gershenson, J. (2012).** The specificity of herbivore-induced plant volatiles in attracting herbivore enemies. *Trends in plant science*, *17*(5), 303-310.

**Miklaszewska, M., Zienkiewicz, K., Inhana, P., & Zienkiewicz, A. (2021).** Lipid metabolism and accumulation in oilseed crops. *OCL*, *28*, 50.

**Moellering, E. R., Muthan, B., & Benning, C. (2010).** Freezing tolerance in plants requires lipid remodeling at the outer chloroplast membrane. *Science*, *330*(6001), 226-228.

**Mondor, E. B., & Addicott, J. F. (2003).** Conspicuous extra-floral nectaries are inducible in *Vicia faba*. *Ecology Letters*, *6*(6), 495-497.

**Muravnik, L. E. (2021).** The structural peculiarities of the leaf glandular trichomes: A review. *Plant Cell and Tissue Differentiation and Secondary Metabolites: Fundamentals and Applications*, 63-97.

**Nelsen, M. P., Ree, R. H., & Moreau, C. S. (2018).** Ant–plant interactions evolved through increasing interdependence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(48), 12253-12258.

**Ness, J.H.** *Catalpa bignonioides* alters extrafloral nectar production after herbivory and attracts ant bodyguards. *Oecologia* 2003, *134*, 210–218

**O'Dowd DJ.** 1979. Foliar nectar production and ant activity on a neotropical tree, *Ochroma pyramidale*. *Oecologia* **43**: 233–248.

**Ofuya** ZM, Akhidue V, 2005. The role of pulses in human nutrition: a review. *J. Appl. Sci. Environ. Manage.* 9:99-104

**Ohm**, J.R.; Miller, T.E.X. Balancing anti-herbivore benefits and anti-pollinator costs of defensive mutualists. *Ecology* 2014, *95*, 2924–2935

**Okazaki**, Y., Otsuki, H., Narisawa, T., Kobayashi, M., Sawai, S., Kamide, Y., ... & Saito, K. (2013). A new class of plant lipid is essential for protection against phosphorus depletion. *Nature communications*, *4*(1), 1510.

**Opritov**, V. A., Pyatygin, S. S., & Retivin, V. G. (1991). Bioelectrogenesis in higher plants. *Moscow, Nayka*.

**Oyarce**, P., & Gurovich, L. (2010). Electrical signals in avocado trees: Responses to light and water availability conditions. *Plant signaling & behavior*, *5*(1), 34-41.

**Panikashvili**, D., Savaldi-Goldstein, S., Mandel, T., Yifhar, T., Franke, R. B., Höfer, R., ... & Aharoni, A. (2007). The Arabidopsis DESPERADO/AtWBC11 transporter is required for cutin and wax secretion. *Plant physiology*, *145*(4), 1345-1360.

**Pandey**, S., Zhang, W. and Assmann, S.M. (2007) Roles of ion channels and transporters in guard cell signal transduction. *FEBS Lett.* 581, 2325 – 2336.

**Paré**, P.W., and Tumlinson, J.H. 1999. Plant volatiles as a defense against insect herbivores. *Plant Physiol.* 121: 325–331.

**Pateraki**, I., Andersen-Ranberg, J., Hamberger, B., Heskies, A. M., Martens, H. J., Zerbe, P., ... & Hamberger, B. (2014). Manoyl oxide (13R), the biosynthetic precursor of forskolin, is synthesized in specialized root cork cells in *Coleus forskohlii*. *Plant physiology*, *164*(3), 1222-1236.

**Pemberton**, R.W. The occurrence and abundance of plants with extrafloral nectaries, the basis for antiherbivore defensive mutualisms, along a latitudinal gradient in east Asia. *J. Biogeogr.* 1998, 25, 661–668.

**Peng**, R. K., K. Christian, and K. Gibb . 1995. The effect of the green ant, *Oecophylla smaragdina* (Hymenoptera: Formicidae) on insect pests of cashew trees in Australia. *Bulletin of Entomological Research* 85: 279 -2 84

**Perfecto**, I. 1991. Ants (Hymenoptera: Formicidae) as natural control agents of pests in irrigated maize in Nicaragua. *Journal of Economic Entomology* 84: 65 -7 0

**Philpott** SM, Foster PF. 2005. Nest-site limitation in coffee agroecosystems: artificial nests maintain diversity of arboreal ants. *Ecological Applications* 15: 1478–1485.

**Pickard**, B. G. (1973). Action potentials in higher plants. *The Botanical Review*, 39, 172-201.

**Ponzio**, C., Gols, R., Pieterse, C. M., & Dicke, M. (2013). Ecological and phytohormonal aspects of plant volatile emission in response to single and dual infestations with herbivores and phytopathogens. *Functional Ecology*, 27(3), 587-598.

**Price** PW, Bouton CE, Gross P, McPheron BA, Thompson JN, Weis AE. 1980. Interactions among three trophic levels: influence of plants on interactions between insect herbivores and natural enemies. *Annual Review of Ecology and Systematics* 11: 41–65.

**Pyatygin**, S. S., Opritov, V. A., & Vodeneev, V. A. (2008). Signaling role of action potential in higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 55, 285-291.

**Pyke**, G. H., & Ren, Z. X. (2023). Floral nectar production: what cost to a plant?. *Biological Reviews*, 98(6), 2078-2090.

**Radhika**, V., Kost, C., Bartram, S., Heil, M., & Boland, W. (2008). Testing the optimal defence hypothesis for two indirect defences: extrafloral nectar and volatile organic compounds. *Planta*, *228*, 449-457.

**Reddy**, P. V. R., & Sreedevi, K. (2016). Arthropod communities associated with mango (*Mangifera indica* L.): diversity and interactions. *Economic and Ecological Significance of Arthropods in Diversified Ecosystems: Sustaining Regulatory Mechanisms*, 271-298.

**Renna**, L., Stefano, G., Slabaugh, E., Wormsbaecher, C., Sulpizio, A., Zienkiewicz, K., & Brandizzi, F. (2018). TGNap1 is required for microtubule-dependent homeostasis of a subpopulation of the plant trans-Golgi network. *Nature communications*, *9*(1), 5313.

**Rico-Gray** V, Oliveira PS. 2007. *The ecology and evolution of ant–plant interactions*. Chicago: The University of Chicago Press.

**Risch**, S. J., & Carroll, C. R. (1982). The ecological role of ants in two Mexican agroecosystems. *Oecologia*, *55*, 114-119.

**Roblin**, G. (1985). Analysis of the variation potential induced by wounding in plants. *Plant and cell physiology*, *26*(3), 455-461.

**Roelfsema**, M. R. G., & Hedrich, R. (2005). In the light of stomatal opening: new insights into ‘the Watergate’. *New Phytologist*, *167*(3), 665-691.

**Roelfsema**, M. R. G., & Hedrich, R. (2005). In the light of stomatal opening: new insights into ‘the Watergate’. *New Phytologist*, *167*(3), 665-691.

**Rosumek**, F. B., Silveira, F. A., de S. Neves, F., de U. Barbosa, N. P., Diniz, L., Oki, Y., ... & Cornelissen, T. (2009). Ants on plants: a meta-analysis of the role of ants as plant biotic defenses. *Oecologia*, *160*, 537-549.

**Rousset M**, de Roo M, Le Guennec JY, Pichon O. Electrophysiological characterization of tomato hypocotyl putative action potentials induced by cotyledon heating. *Physiol Plant* 2002; [115](#):197-203.

**Roy, R.**, Schmitt, A. J., Thomas, J. B., & Carter, C. J. (2017). Nectar biology: from molecules to ecosystems. *Plant Science*, *262*, 148-164.

**Röse, U. S. R.**, Lewis, J., and Tumlinson, J. H. (2006). Extrafloral nectar from cotton (*Gossypium hirsutum*) as a food source for parasitic wasps. *Funct. Ecol.* *20*, 67–74.

**Rudgers, J. A.**, & Gardener, M. C. (2004). Extrafloral nectar as a resource mediating multispecies interactions. *Ecology*, *85*(6), 1495-1502.

**Sadre, R.**, Kuo, P., Chen, J., Yang, Y., Banerjee, A., Benning, C., & Hamberger, B. (2019). Cytosolic lipid droplets as engineered organelles for production and accumulation of terpenoid biomaterials in leaves. *Nature Communications*, *10*(1), 853.

**Sanberg, P. R.** (1976). "Neural capacity" in *Mimosa pudica*: a review. *Behavioral biology*, *17*(4), 435-452.

**Schupp, E. W.**, & Feener, D. H. (1991). Phylogeny, lifeform, and habitat-dependence of ant-defended plants in a Panamanian forest.

**Seo, P. J.**, Lee, S. B., Suh, M. C., Park, M. J., Go, Y. S., & Park, C. M. (2011). The MYB96 transcription factor regulates cuticular wax biosynthesis under drought conditions in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, *23*(3), 1138-1152.

**Silva, E. O.**, Feio, A. C., Cardoso-Gustavson, P., Milward-De-Azevedo, M. A., Dos Santos, J. U. M., & De Aguiar Dias, A. C. A. (2017). Extrafloral nectaries and plant–insect interactions in *Passiflora* L. (Passifloraceae). *Brazilian Journal of Botany*, *40*, 331-340.

**Smith, L.L.**; Lanza, J.; Smith, G.C. Amino-Acid-Concentrations in Extrafloral Nectar of *Impatiens sultani* Increase After Simulated Herbivory. *Ecology* 1990, *71*, 107–115

**Spurr**, A. R. (1969). A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of ultrastructure research*, 26(1-2), 31-43.

**Staab**, M.; Methorst, J.; Peters, J.; Bluethgen, N.; Klein, A. Tree diversity and nectar composition affect arthropod visitors on extrafloral nectaries in a diversity experiment. *J. Plant Ecol.* **2017**, *10*, 201–212.

**Stahlberg**, R., & Cosgrove, D. J. (1997). The propagation of slow wave potentials in pea epicotyls. *Plant Physiology*, 113(1), 209-217.

**Stahlberg**, R., Cleland, R. E., & Van Volkenburgh, E. (2006). Slow wave potentials—a propagating electrical signal unique to higher plants. *Communication in plants: Neuronal aspects of plant life*, 291-308.

**Stanković**, B., & Davies, E. (1996). Both action potentials and variation potentials induce proteinase inhibitor gene expression in tomato. *Febs Letters*, 390(3), 275-279.

**Stapley**, J. H. 1973. Insect pests of coconuts in the Pacific region . *Outlook on Agriculture* 7 : 211-217

**Stpiczyńska**, M. (1995). The structure of floral nectaries of some species of *Vicia* L. (Papilionaceae). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 64(4), 327-334.

**Stumpf**, P. K. (Ed.). (2014). *Lipids: structure and function: the biochemistry of plants* (Vol. 4). Elsevier.

**Sullivan**, H., "Ionic channels of excitable membranes", *Neurology*, Vol. 42, No. 7, (1992), 1439-1451-a.

**Sukhov**, V., Akinchits, E., Katicheva, L., & Vodeneev, V. (2013). Simulation of variation potential in higher plant cells. *The Journal of membrane biology*, 246, 287-296.

**Tanno** KI, Willcox G, 2006. The origins of cultivation of *Cicer arietinum* L. and *Vicia faba* L.: early finds from Tell el-Kerkh, north-west Syria, late 10th millennium BP. *Veg. Hist. Archaeobot.* 15:197-204

**Tarkowska**, J. A., Zobel, A. M., & Maciak, M. (1981). Development and transfer character of secretory glands in the broad bean (*Vicia faba* L.). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 50(3), 391-398.

**Tazawa**, M., & Kishimoto, U. (1968). Cessation of cytoplasmic streaming of *Chara* internodes during action potential. *Plant and cell physiology*, 9(2), 361-368.

**Thellier**, M. (2017). *Plant Responses to Environmental Stimuli* (Vol. 76). Dordrecht: Springer Netherlands.

**Tholl**, D., Kish, C. M., Orlova, I., Sherman, D., Gershenzon, J., Pichersky, E., & Dudareva, N. (2004). Formation of monoterpenes in *Antirrhinum majus* and *Clarkia breweri* flowers involves heterodimeric geranyl diphosphate synthases. *The Plant Cell*, 16(4), 977-992.

**Trebacz**, K., Dziubinska, H., & Krol, E. (2006). Electrical signals in long-distance communication in plants. *Communication in plants: Neuronal aspects of plant life*, 277-290.

**Tsaplev**, Y. B., & Zatsepina, G. N. (1980). Electric nature of variable potential propagation in *Tradescantia*. *Biofizika*, 25(4), 708-712.

**Turlings** TCJ, Wäckers FL. 2004. Recruitment of predators and parasitoids by herbivore-injured plants. In RT Cardés, JG Millar, eds. *Advances in insect chemical ecology*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 21–75.

**Valkama**, E., SALMINEN, J. P., Koricheva, J., & Pihlaja, K. (2003). Comparative analysis of leaf trichome structure and composition of epicuticular flavonoids in Finnish birch species. *Annals of Botany*, 91(6), 643-655.

**Van Mele**, P., J. Vayssières, E. Van Tellingen , and J. Vrolijk . 2007. Effects of an African weaver ant, *Oecophylla longinoda*, in controlling mango fruit flies (Diptera: Tephritidae) in Benin. *Journal of*

**Vassilyev**, A. E. (2010). On the mechanisms of nectar secretion: revisited. *Annals of Botany*, *105*(3), 349-354.

**Vodeneev**, V. A., Opritov, V. A., & Pyatygin, S. S. (2006). Reversible changes of extracellular pH during action potential generation in a higher plant *Cucurbita pepo*. *Russian Journal of Plant Physiology*, *53*, 481-487.

**Vodeneev**, V. A., Akinchits, E. K., Orlova, L. A., & Sukhov, V. S. (2011). The role of Ca<sup>2+</sup>, H<sup>+</sup>, and Cl<sup>-</sup> ions in generation of variation potential in pumpkin plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, *58*, 974-981.

**Vodeneev**, V. A., Katicheva, L. A., & Sukhov, V. S. (2016). Electrical signals in higher plants: Mechanisms of generation and propagation. *Biophysics*, *61*, 505-512.

**Volkov**, A. G., & Brown, C. L. (2006). Electrochemistry of plant life. In *Plant electrophysiology: theory and methods* (pp. 437-459). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

**Way**, M. J. and K. C. Khoo. 1992. Role of ants in pest management. *Annual Review of Entomology* *37*: 479 -5 03.

**Werker**, E. (1993). Function of essential oil-secreting glandular hairs in aromatic plants of Lamiaceae—a review. *Flavour and fragrance journal*, *8*(5), 249-255.

**Wiens**, D. J. (2016). The influence of tannins on the extrafloral nectar characteristics and insect mutualists of *Vicia faba* L. (Doctoral dissertation, University of Saskatchewan).

**Yamawo**, A.; Suzuki, N. Induction and relaxation of extrafloral nectaries in response to simulated herbivory in young *Mallotus japonicus* plants. *J. Plant Res.* 2018, *131*, 255–260.

**Yao**, H.; Xu, Q.; Yuan, M. Actin dynamics mediates the changes of calcium level during the pulvinus movement of *Mimosa pudica*. *Plant Signal. Behav.* 2008.

**Zamora**, R., J. A. Hódar, and D. García. 1996. Experimental study of pollination by ants in Mediterranean high mountain and arid habitats. *Oecologia* 105: 236 -2 42.

**Zhao**, D. J., Chen, Y., Wang, Z. Y., Xue, L., Mao, T. L., Liu, Y. M., ... & Huang, L. (2015). High-resolution non-contact measurement of the electrical activity of plants in situ using optical recording. *Scientific reports*, 5(1), 13425.

**Zimmermann**, S., Ehrhardt, T., Plesch, G., & Müller-Röber, B. (1999). Ion channels in plant signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 55, 183-203.