



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

BIO
DIPARTIMENTO
DI BIOLOGIA



Parco Nazionale
Foreste Casentinesi
Monte Falterona
e Campagna

Individuazione e valutazione dello stato di conservazione di popolazioni della specie *Formica pratensis* (gruppo *Formica rufa*) nel Parco Nazionale Foreste Casentinesi, Monte Falterona e Campagna.

RELAZIONE DELLE ATTIVITA' SVOLTE NEL SECONDO ANNO (2022)



PARCO NAZIONALE DELLE FORESTE CASENTINESI
Protocollo Arrivo N. 173/2023 del 11-01-2023
Doc. Principale - Class. 11.02.01 - Copia Documento

A cura di:
Alberto Masoni, Filippo Frizzi, Paride Balzani e Giacomo Santini
Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Firenze

Premessa e contestualizzazione del progetto

Il Parco Nazionale Foreste Casentinesi, Monte Falterona e Campigna è una delle più importanti e conosciute aree protette italiane, soprattutto per la presenza di antichi ecosistemi forestali costituiti principalmente da Faggio (*Fagus sylvatica* L.) e da Abete bianco (*Abies alba* M.). Le faggete vetuste e la Riserva Integrale di Sasso Fratino, prima riserva integrale istituita in Italia, sono entrate addirittura a far parte della lista dei siti patrimonio mondiale dell'UNESCO dal 2017, sottolineando l'importanza degli habitat che si possono ritrovare nel parco.

Formica pratensis appartiene al più ampio gruppo *Formica rufa*, il quale comprende sette diverse specie in Europa comunemente note per i loro nidi spesso di grandi dimensioni, noti come acervi. Definite comunemente "formiche rosse dei boschi", questi organismi presentano una livrea rosso ruggine, mentre addome, zampe e antenne risultano di colorazione tendente al bruno-nerastro. Sono insetti sociali con colonie spesso poliginiche, composte anche da migliaia di operaie, organizzate in un sistema matriarcale con una suddivisione in caste, ciascuna delle quali riveste un preciso ruolo all'interno del nido assolvendo compiti diversi. La caratteristica più distintiva di queste formiche è sicuramente la loro capacità di utilizzare aghi, resina e altre componenti, per costruire nidi che possono raggiungere in molti casi notevoli dimensioni e forme diverse. Il valore ecologico di questo gruppo di formiche come 'equilibratore' ambientale è ben noto e studiato da molti decenni, tanto che alcune specie sono state utilizzate a partire dalla metà del secolo scorso in un vasto programma di contrasto biologico contro insetti infestanti dannosi per le foreste, come la processionaria del pino e la tentredine minatrice dei larici. Nidi di diverse specie di formiche di questo gruppo sono stati espianati da siti alpini di origine e trapiantati in numerosi siti appenninici dove queste specie erano assenti (Pavan 1959). Questo trapianto è avvenuto anche all'interno del Parco delle Foreste Casentinesi, dove nidi di *Formica paralugubris* furono trapiantati a metà del secolo scorso (Masoni et al 2018), e sono tutt'ora presenti in diverse località come Campigna, Camaldoli e la foresta della Lama (Groppali e Crudele 2005).

Formica pratensis è l'unica specie del gruppo rufa autoctona nelle aree appenniniche. Le pochissime popolazioni conosciute, segnalate ormai quasi mezzo secolo addietro (Pavan et al.1971) e mai più censite, sono probabilmente relitte, residui isolati di tempi remoti in cui la specie era verosimilmente molto più diffusa in gran parte degli Appennini. Questa specie è la più termofila del gruppo rufa e predilige le aree aperte al margine delle foreste. Le popolazioni casentinesi, insieme a quelle presenti nella vicina Riserva di Vallombrosa e nell'area della Consuma, costituivano il nucleo più importante dell'Italia centrale. Oggi purtroppo le popolazioni presenti a Vallombrosa sono del tutto scomparse mentre alla Consuma sono rimasti meno di 10 nidi di questa specie. Della popolazione casentinese invece non si hanno informazioni recenti ma si teme possa essere avvenuta la stessa dinamica negativa osservata a Vallombrosa.

Ogni colonia di queste popolazioni possiede un elevatissimo valore in termini di biodiversità, date le pochissime popolazioni autoctone ancora probabilmente presenti nell'Italia peninsulare, di cui non sono presenti informazioni recenti. Inoltre, dato il lungo periodo di isolamento di queste popolazioni, esiste la possibilità che in questi nuclei siano avvenuti dei processi di deriva genetica che abbiano portato alla costituzione attuale di una possibile sottospecie, geneticamente distinta dalle altre popolazioni presenti sulle Alpi e in Europa centrale. Nel caso in cui questa differenza esista, queste popolazioni diverrebbero uniche, e richiederebbero quindi misure di tutela mirate. La relazione ripercorre gli obiettivi del progetto, descrive in dettaglio le attività di ricerca svolte e presenta i risultati preliminari, rimandando a future potenziali pubblicazioni scientifiche i risultati di analisi ecologiche mirate ed approfondite.

1.Verifica della consistenza numerica delle popolazioni nel Parco Nazionale Foreste Casentinesi, Monte Falterona e Campigna: Parte Romagnola

All'inizio del progetto, partendo dalle informazioni presenti in bibliografia e considerando le esigenze ecologiche della specie (predilige aree aperte a margine di foreste di conifere o miste conifere-faggio ad altitudini superiori ai 900 m slm) erano state individuate le aree del parco idonee alla possibile presenza di *F. pratensis* (Fig 1) e suddivise in due macroaree del parco in base alla regione di appartenenza.

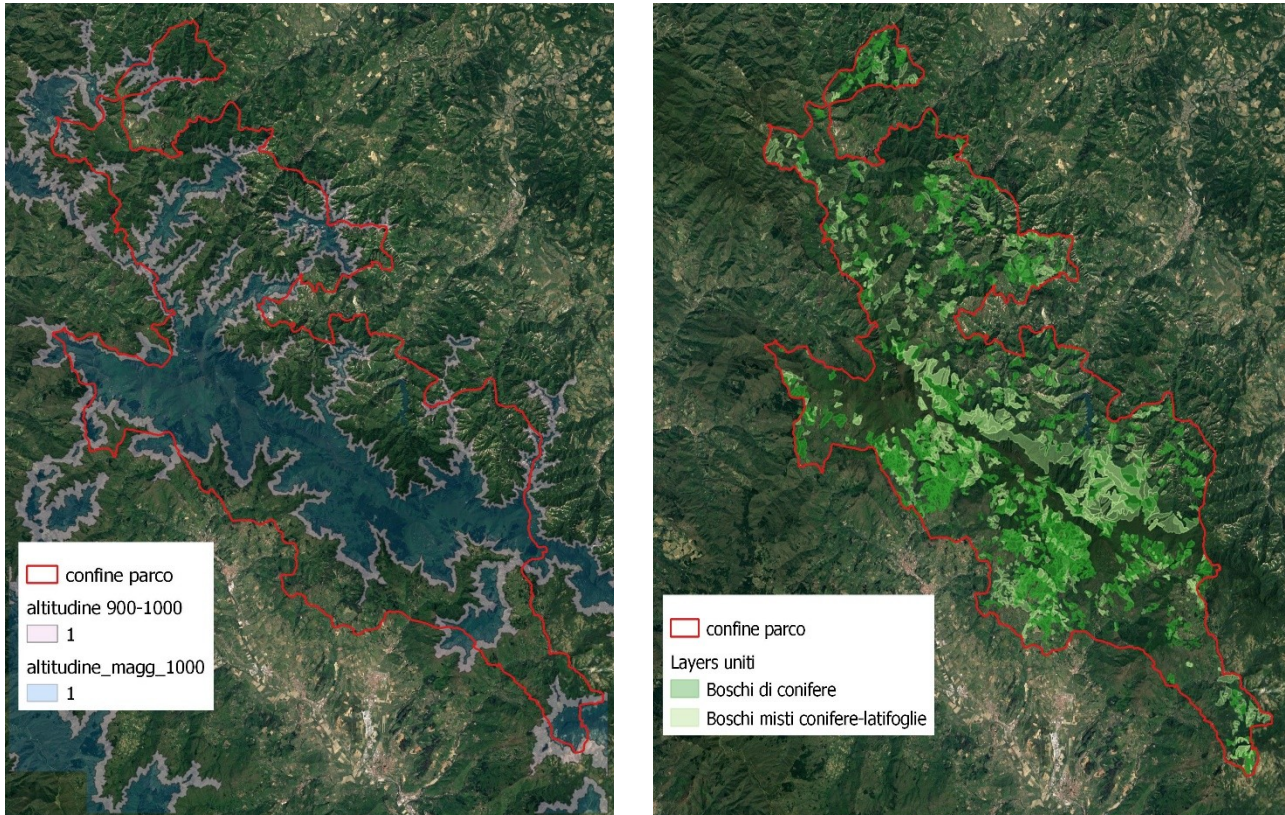


Fig.1 Aree di interesse per caratteristiche altitudinale e di copertura vegetazionale del parco.

Durante il primo anno di progetto sono state esplorate le aree ricadenti nella macroarea Toscana, mentre nel corso del secondo anno sono state visitate le aree appartenenti al territorio Romagnolo del Parco. Sono state prese in esame tutte le aree di altitudine superiore ai 1000 m, caratterizzate da aree aperte circondate da boschi di conifere o boschi misti conifere-latifoglie (Fig.2-3). Tali aree sono state oggetto di numerose sessioni di esplorazione, effettuate dal personale universitario, avvenute nei mesi da maggio a settembre 2022. Le esplorazioni hanno previsto il movimento su strade forestali fino al raggiungimento delle aree di interesse e poi perlustrazioni a piedi di queste aree. Ad ogni possibile nido individuato veniva assegnato un codice identificativo, scattata una foto e compilata una scheda per la registrazione di caratteristiche ambientali ed ecologiche come: la località di ritrovamento, le coordinate GPS (N°/E°), l'altitudine, le dimensioni (lunghezza, larghezza e altezza), la copertura (se assente o presente, e se presente di che tipo), la presenza di un appoggio per il nido, la forma del nido, il materiale utilizzato per costruirlo e in fine lo stato di attività del nido (vivo o abbandonato).

Nonostante si siano riscontrate le condizioni ecologiche idonee per la presenza della specie in diverse aree esplorate della parte Romagnola del Parco, non è stato individuato nessun nido di *F. pratensis*.

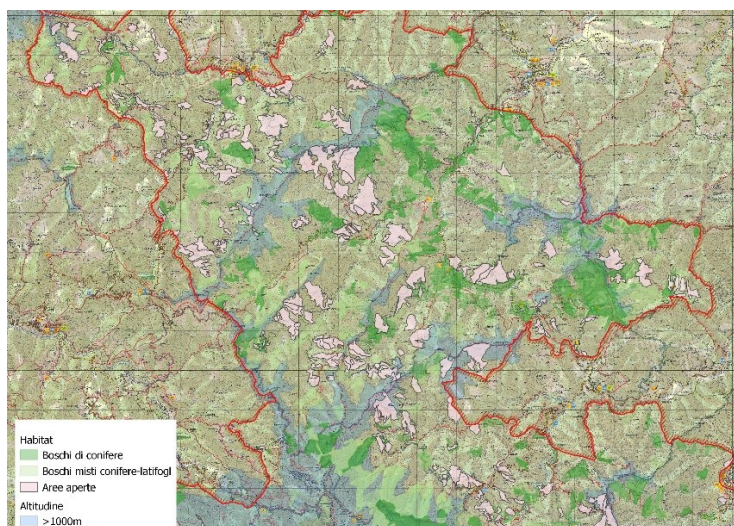


Fig.2 Aree esplorate nella parte Nord del parco tra Campigna e Sant'Antonio in Alpe

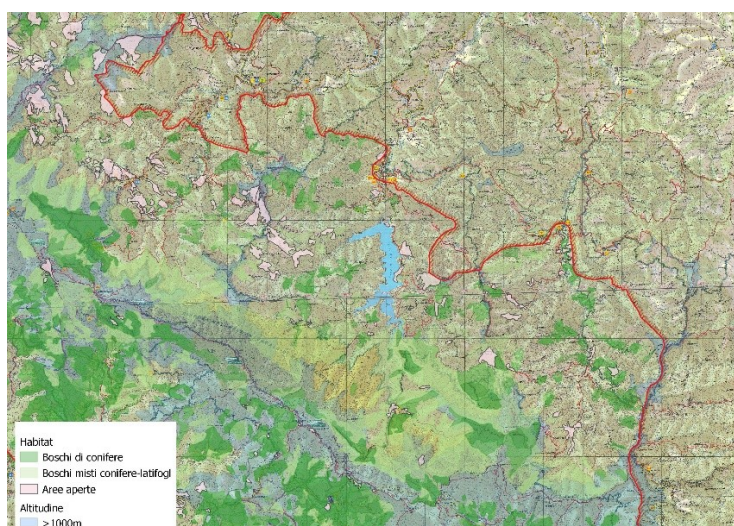


Fig. 3 Aree esplorate tra l'area a nord di Badia Prataglia e Campigna

In alcune di queste aree (es. area intorno al Monte Bucine 1128m) sono state individuate popolazioni di un'altra specie di formica, *F. execta* (appartenente al gruppo "truncorum") che costruisce nidi strutturalmente simili a quelli di *F. pratensis* ma di dimensioni minori (Fig.4).



Fig. 4 Nido di *Formica execta* rinvenuto nelle aree campionate all'interno di un vacciniato.

Questa specie si ritrova infatti in aree aperte, nei prati pascolo dove costruisce nidi generalmente di forma più appiattita rispetto a quelli prodotti da *F. pratensis*, e composti prevalentemente da frammenti di materiale vegetale vario. Il riconoscimento delle due specie è relativamente agevole analizzandone alcuni tratti morfologici come la forma della testa e la colorazione (Fig. 5).

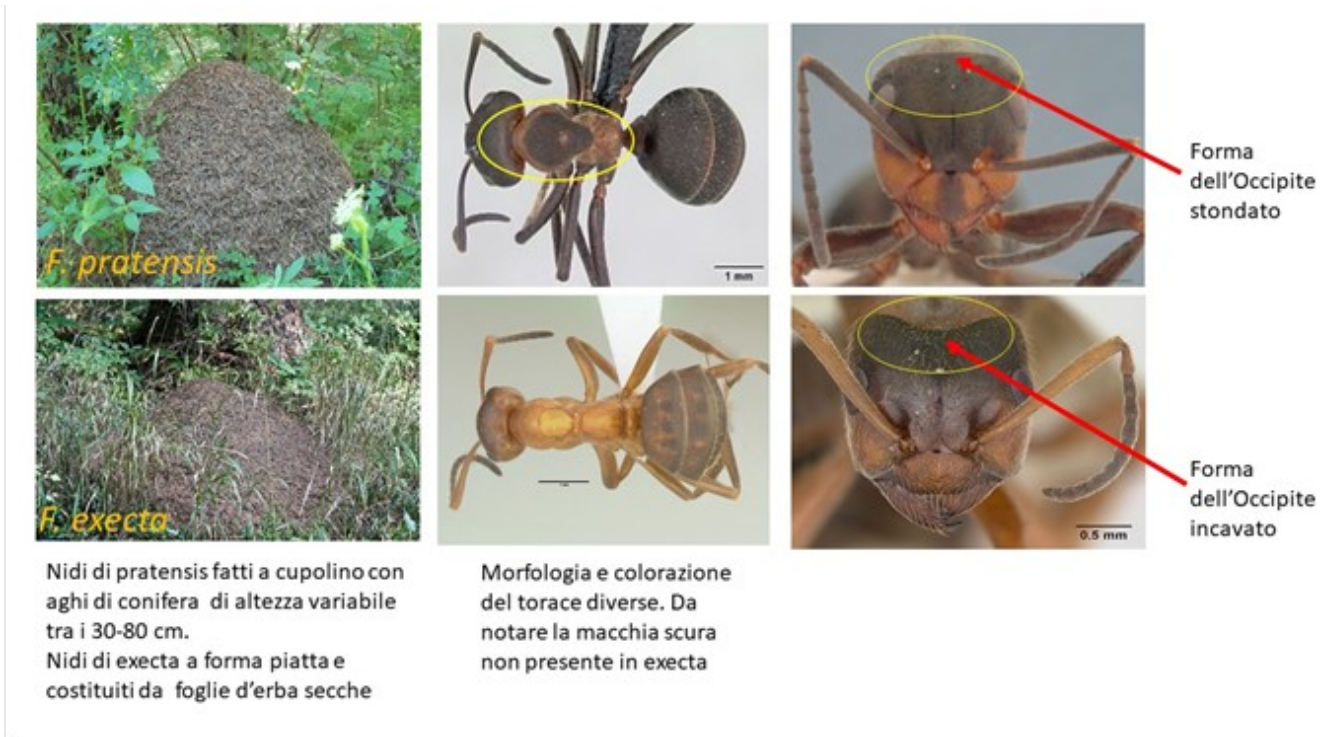


Fig. 5 Caratteristiche distintive della specie *F. pratensis* e *F.execta* (fonte foto:antwiki.org) .

2.Valutazione dello stato di conservazione delle colonie di *F. pratensis* presenti nell'area dell'Alto Corsalone

La zona intorno al Santuario Francese di La Verna è caratterizzata da altitudine sopra i 1000 m slm e da una copertura forestale fatta da boschi di conifere o misti conifere-latifoglie. In quest'area nel 2021, sono stati individuati 81 nidi di *F. pratensis*, di cui 62 attivi. La maggior parte dei nidi era distribuita in zone aperte lungo la strada dell'Alto Corsalone ed una piccola parte in una radura all'interno di un bosco misto di latifoglie (querce e faggi) e abete, vicino alla medesima strada (Fig.6). Tutti i nidi trovati sono riconducibili ad un'unica presunta popolazione distribuita lungo un tratto di strada di circa 5 km a nord del santuario di La Verna, che inizia dopo 3 km dalla località "La Beccia" e va in direzione della località "Rimbocchi" (Fig.6). Tale tratto di strada ricade quasi integralmente all'interno del parco, anche se un piccolo gruppo di nidi si ritrova all'esterno.

La maggior parte dei nidi furono rinvenuti sul prato a margine della carreggiata, a diversa distanza dal manto stradale e con minima ombreggiatura solo nelle ore più tarde del pomeriggio, dovuta alla chioma di giovani querce o faggi, o ai cespugli di rosa canina o ginepro.

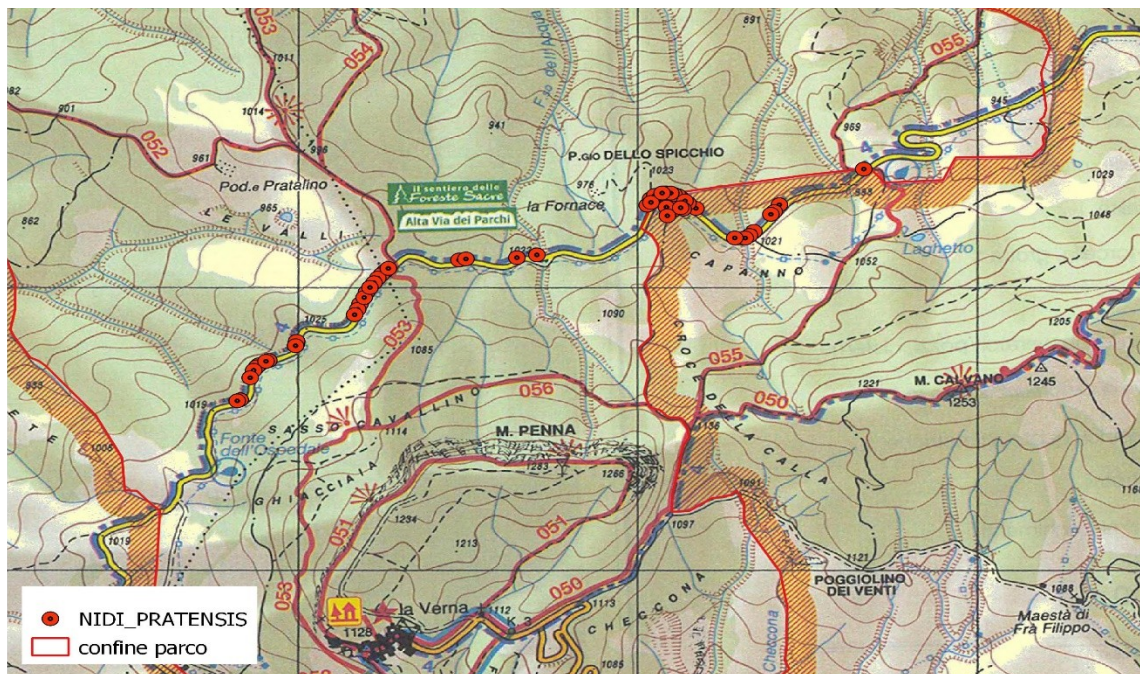


Fig.6 Mappa della localizzazione dei nidi (puntini rossi) lungo la strada dell'Alto Corsalone.

Molti nidi erano soggetti alle pratiche di manutenzione della carreggiata stradale soprattutto alle pratiche di taglio dell'erba mediante trinciatura, con danneggiamento della parte epigea di nidi. Successivamente alla nostra segnalazione e grazie all'intervento del Parco è stato possibile incontrare le istituzioni provinciali deputate alla manutenzione stradale nel maggio 2022 e accordarsi in modo tale da effettuare pratiche manutentive conservative dei nidi.

È stato quindi deciso di censire nuovamente i nidi presenti nell'area dell'Alto Corsalone a Agosto 2022 in modo tale da valutare l'effetto a breve termine del mancato sfalcio delle aree della carreggiata occupate dai nidi. Come previsto le aree non sfalciate (Fig. 7) hanno mostrato la componente vegetale rigogliosa e tutte sono risultate accomunate dalla presenza diffusa di piante di felci che forniscono un ombreggiamento naturale parziale alla superficie dei nidi.



Fig.7 Margine della carreggiata non sfalcio, si notino le felci, la complessità della componente vegetale e il nido presente sotto il guardrail.

Dai risultati delle attività di monitoraggio sono stati censiti 71 nidi attivi contro i 62 censiti nell'annata precedente. È stato registrato quindi, un aumento dell'8% di nidi presenti e della dimensione nelle prime fasi di crescita (10-50 l di range di volume). Tali dati (Tab.1), incoraggianti, suggeriscono un possibile effetto positivo del mancato sfalcio sulla struttura dei nidi e sull'attività delle colonie, sebbene tale pratica sia stata modificata in tempi molto recenti (giugno 2022) rendendola conservativa nei riguardi dei nidi presenti.

Range	Numero nidi	Media volume (litri)
0-10 litri	8	6
10-50 litri	22	38
50-100 litri	14	81
100-150 litri	10	133
150-200 litri	6	165
>200 litri	11	500

Tab.1 Numero e dimensioni dei nidi censiti a luglio 2022.

Tale effetto positivo appare evidente anche comparando le foto dello stesso nido fatte nello stesso periodo luglio 2021 e nell'agosto 2022 (Fig.8). Dalla foto recente si evince come il nido sia ben strutturato e circondato da piante, sia felci che piante erbacee, che gli forniscono un parziale supporto strutturale, parziale ombreggiamento e un'area di foraggiamento limitrofa al nido ben sviluppata.



Fig.8 Nido di *F.pratensis* lungo la carreggiata della strada dell'Alto Corsalone in prossimità del guardrail, fotografato nel giugno del 2021 (sinistra) e nel Agosto del 2022 (destra). Si nota come l'area intorno al nido si sia rinaturalizzata grazie al mancato sfalcio e il nido abbia assunto una forma e struttura normale e ben definita.

Per avere una valutazione chiara e attendibile dell'effetto del mancato sfalcio sull'area interessata dai nidi, saranno necessari monitoraggi futuri su questa popolazione, che considerino un arco temporale più ampio dall'ultimo taglio effettuato.

3. Completamento della App per cellulare per la segnalazione dei nidi di formiche rufa presenti nel parco (attività di Citizen science) e attività di divulgazione

Considerando il notevole interesse turistico del Parco, soprattutto da un punto di vista escursionistico, è stata sviluppata una app che possa permettere il coinvolgimento diretto dei fruitori nell'attività di censimento, attraverso un approccio di *Citizen Science*. La app "Rufa Ranger 2.0", pronta per essere inserita nelle piattaforme online di download, è di facile utilizzo ed è composta sia da pagine esplicative del progetto e di come si utilizza la app, che da pagine dove viene introdotta brevemente l'ecologia delle specie di formiche considerate (Fig.9). La app sviluppata per il sistema Android consente alle persone in cammino nel parco di fotografare e geolocalizzare i nidi incontrati e di ottenere informazioni sulle specie di formiche presenti nel Parco. L'app è tecnicamente pronta per essere resa disponibile al pubblico con modalità da concordare con il Parco. Il nostro gruppo di ricerca si impegna a partecipare ad eventuali attività divulgative e promozionali nella primavera/estate 2023, anche oltre la scadenza del presente progetto.

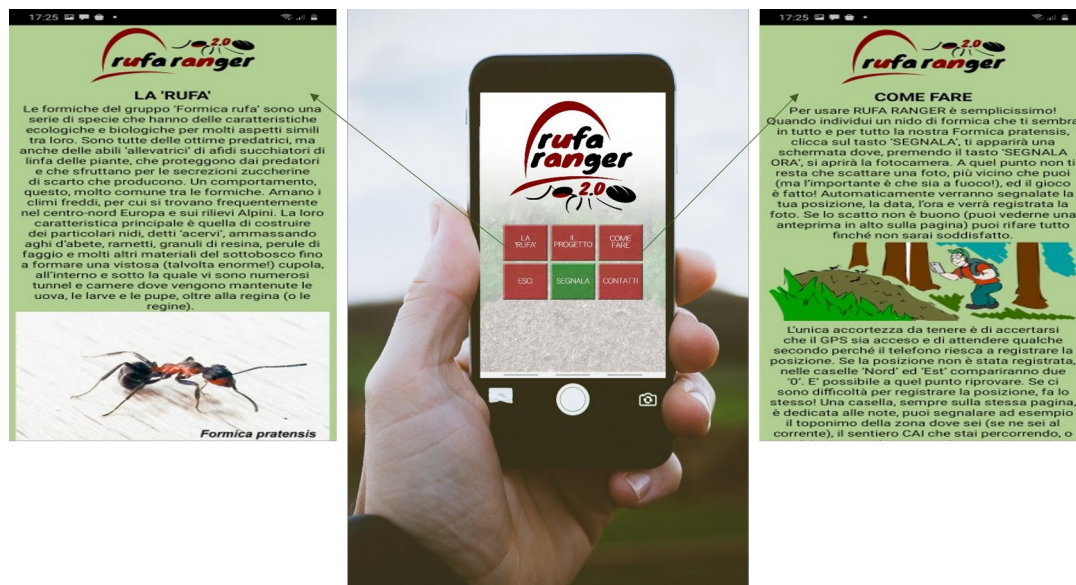


Fig.9 Immagini della App Rufa Ranger 2.0. Al centro la pagina principale dove è possibile selezionare le diverse pagine informative e segnalare il nido.

Attività di divulgazione:

Il 23 Agosto 2022 abbiamo partecipato all'evento promosso dal Parco a Campigna per il Centenario dei Parchi italiani con una giornata dedicata alle foreste vetuste. In tale occasione è stato possibile illustrare ai partecipanti la storia e l'ecologia delle popolazioni di *F. paralugubris* che abitano quelle aree e altre zone del Parco, e allo stesso tempo presentare il progetto in oggetto.

4. Caratterizzare genetica delle popolazioni di *Formica pratensis* del Parco

Dopo la fine dei sopralluoghi effettuati nella macroarea Emiliana abbiamo effettuato alcune analisi genetiche preliminari sull'unica popolazione individuata nel parco nell'area di La Verna. Dal momento che un obiettivo del progetto è quello di valutare se la popolazione di *F. pratensis* del parco possa essere ormai una sottospecie separata dalle popolazioni alpine e centro europee, e anche la distanza filogenetica presente tra questa popolazione e le altre popolazioni appenniniche, abbiamo deciso di analizzare due marcatori molecolari, il citocromo ossidasi 1 (COI) e il Citocromo B (Cytb); entrambi sono marcatori mitocondriali comunemente utilizzati per il barcoding delle specie animali e di cui è presente un'ampia banca dati in letteratura per moltissime specie.

Dalla popolazione di La Verna sono stati scelti tre nidi, ciascuno facente parte di gruppi diversi e distanti tra loro, e da ciascun nido sono state prelevate ed analizzate due operarie. Il DNA di ciascuna operaia è stato estratto con un kit apposito "Blood and Tissue" (Quiagen) seguendo il protocollo previsto da manuale, e valutando la qualità del DNA estratto su un gel di Agarosio (Fig10).

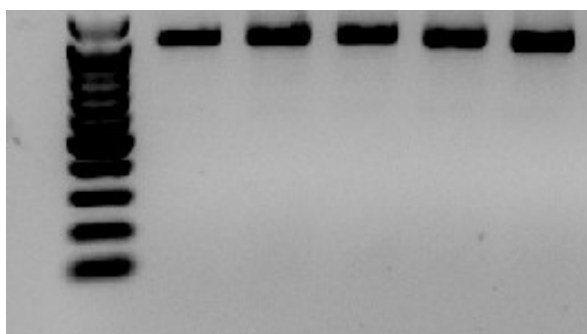


Fig.10 Immagine della corsa elettroforetica di alcuni campioni di DNA genomico estratto. Da sx il ladder da 1000 bp e 5 campioni di *Formica pratensis*. Si noti l'ottima qualità del Dna genomico estratto che forma un'unica banda all'inizio del gel.

Successivamente sono state effettuate le procedure di amplificazione del COI e Cytb attraverso reazioni PCR di amplificazione, utilizzando primer specifici presenti in letteratura (Goropashnaya et al. 2004) e già utilizzati su questa specie. La corretta amplificazione è stata appurata attraverso corsa elettroforetica su gel di agarosio, e gli ampliconi ottenuti sono stati successivamente purificati e inviati ad un laboratorio esterno per le procedure di sequenziamento.

Le sequenze ottenute per ogni marcatore e per ogni campione sono state corrette e allineate (Fig.11) con il software Geneious Prime® v.2022.2.2.

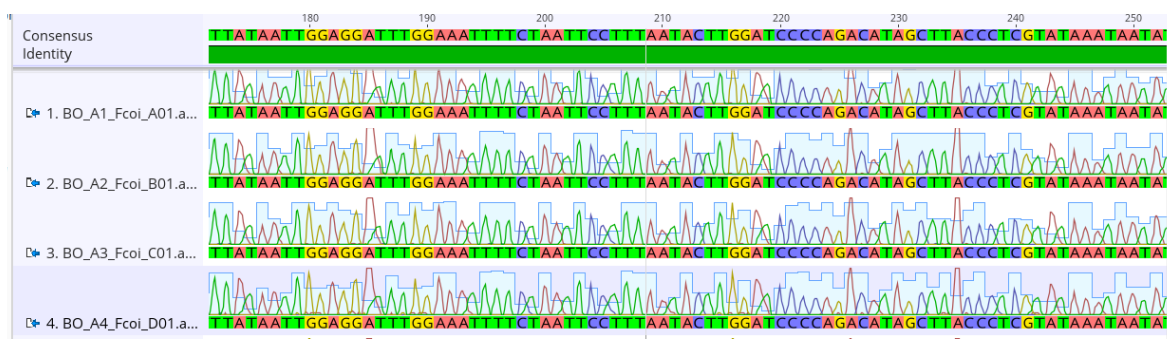


Fig.11 Procedura di allineamento e correzione delle sequenze ottenute del marcatore COI con il software Genious.

Una volta ottenute le sequenze corrette per ogni campione e ciascun marcatore sono stati individuati i singoli aplotipi presenti ed effettuato un'analisi bioinformatica differente a seconda del marcatore con il software MEGA v. X. Sono stati trovati 2 aplotipi diversi per il COI e 4 aplotipi diversi per il Cytb. Per ciascun marcatore, dapprima è stata calcolata una matrice delle distanze genetiche tra ciascun campione utilizzando l'algoritmo di calcolo di Tamura-Nei (1993). Successivamente con le distanze ottenute con il COI è stato creato un albero filogenetico di tipo Neighbour Join confrontando gli aplotipi casentinesi con le sequenze di quelli alpini e appenninici in nostro possesso. Dal confronto (Fig.12) emerge come per il marcatore COI non sussista una chiara diversificazione tra le popolazioni italiane di *Formica pratensis*, anzi ci sia molta vicinanza a livello genetico tra quelle dell'Italia centrale e quelle alpine (Alto Adige).

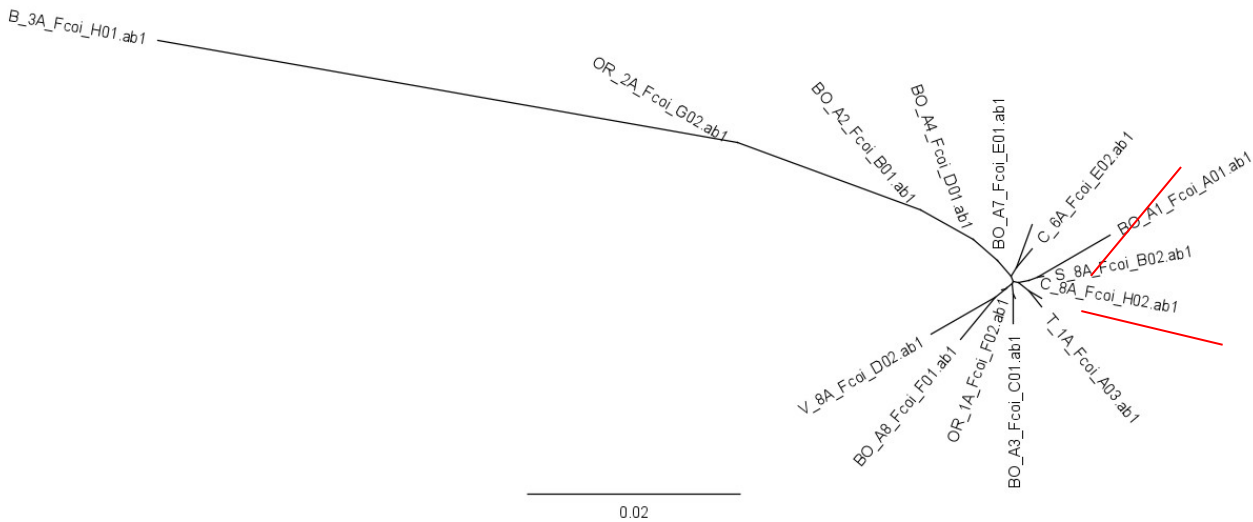


Fig.12 Dendrogramma NJ dei campioni analizzati con il COI. In rosso i due aplotipi trovati a La Verna.

Per valutare la distanza genetica dei campioni Casentinesi da quelli del Centro Europa, presenti nella banca dati online <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> è stata effettuata un'analisi dei Network aplotipici (Fig.13) ottenuti con il marcatore CytB.

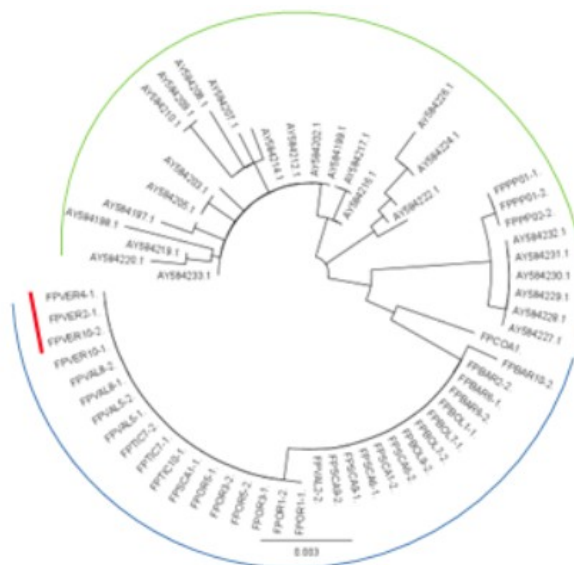


Fig.13 Albero dei Network aplotipici del CytB. In Blu i campioni italiani (in rosso gli aplotipi di La Verna) e in verde quelli con diverse provenienze Europee

Dall'analisi delle sequenze del CytB si evince come le popolazioni italiane si differenzino chiaramente da quelle europee, sottolineandone l'importanza a livello conservazionistico. Le formiche italiane formano un cluster a sé vicino al cluster di quelle Alpine provenienti da Francia e Svizzera.

Possiamo quindi concludere affermando che il marcatore COI si è rivelato un marcatore poco variabile all'interno delle popolazioni appenniniche e alpine, sottolineandone l'appartenenza dei campioni alla medesima specie, e quindi fugando le ipotesi di una possibile sottospecie appenninica di *F.pratensis*. Per contro il marcatore Cytb ha mostrato una buona variabilità e evidenziato l'importanza delle popolazioni Italiane per le strategie di conservazione di questa specie, in quanto molto distanti geneticamente dalle altre popolazioni europee.

Considerazione Finali

Le attività di progetto svolte fino ad oggi, hanno fornito informazioni utili sulla presenza e sulle caratteristiche eco-etologiche della specie *F. pratensis* all'interno del Parco Nazionale. All'interno dell'area del Parco è stata rinvenuta una sola popolazione di *F. pratensis* nei pressi de La Verna. Tale popolazione è purtroppo sottoposta ad una pressione molto forte che può metterne a repentaglio la sopravvivenza; la quasi totalità dei nidi rinvenuti, infatti, sono costruiti vicino alla carreggiata stradale, nell'area interessata dalle attività di manutenzione, come lo sfalcio dell'erba. Grazie alla collaborazione di vari enti è stato possibile porre attenzione al problema e impostare nelle aree di presenza dei nidi, delle pratiche di taglio non a raso in modo da preservare sia la parte epigea del nido che la componente vegetale vicina. L'adozione di tali pratiche potrà sicuramente migliorare la condizione di questa popolazione, anche se la situazione rimane critica, trattandosi della carreggiata di una strada e che questa è l'unica popolazione ancora presente nel Parco. Si raccomanda pertanto il monitoraggio continuo dello stato di questa popolazione in modo da poter cogliere in tempi rapidi eventuali segnali di declino. Non è da escludere possibili interventi di traslocazione di alcuni di questi nidi in aree più sicure e che presentino condizioni ottimali per la specie.

Le attività di monitoraggio hanno interessato un numero elevato di aree caratterizzate da condizioni pedoclimatiche e vegetazionali potenzialmente idonee alla presenza della specie, ma non è del tutto da escludere che possano esistere nidi isolati o popolazioni relittuali molto piccole non rilevate. Per questo il lancio della app che è stata sviluppata e delle attività di *Citizen Science* potrebbero rappresentare un valido aiuto per incrementare la copertura sul territorio del Parco e raccogliere informazioni anche negli anni futuri.

Visti poi i risultati delle analisi genetiche, sarebbe molto importante effettuare uno studio approfondito sulla variabilità genetica di questa popolazione e confrontarla con quella dei nidi rimasti della popolazione della vicina Consuma in modo di poter valutare il livello di inbreeding presente in tali popolazioni e pensare a traslocazioni incrociate, con lo scopo di aumentare la variabilità genetica di tali popolazioni in modo da garantirne la sopravvivenza. Le informazioni genetiche ottenute hanno evidenziato anche l'importanza di questa popolazione come riserva di variabilità genetica a livello di specie. È vero che le popolazioni appenniniche non sembrano essere una sottospecie separata ma rappresentano comunque nuclei geneticamente molto distanti dalle altre popolazioni presenti in Europa. Gli aplotipi presenti in Casentino, infatti, sono diversi da quelli delle altre popolazioni appenniniche, e l'insieme di quelli italiani è risultato molto diverso da quelli delle popolazioni di *F. pratensis* in Europa. Per questo sarebbe necessario provare a creare un network tra i parchi nazionali in cui ricadono le popolazioni italiane per provare a stabilire delle politiche di conservazione comuni che mirino a preservare queste popolazioni in rapido declino e gli ambienti a loro idonei.

Ringraziamenti

Ringraziamo sentitamente il personale del Parco, soprattutto il Dott. Davide Alberti, referente scientifico, per la costruttiva collaborazione nel pianificare il monitoraggio e per il supporto tecnico e finanziario. Ringraziamo inoltre l'Unione dei Comuni della Romagna Forlivese, nella persona del Dott. Andrea Ghirelli, e l'Unione dei Comuni del Valdarno e Val di Sieve, nella persona del Dott. Jacopo Battaglini, che oltre a fornire informazioni utili, hanno fornito permessi e chiavi di accesso alle strade forestali che conducevano a gran parte delle aree di interesse del progetto.

Bibliografia

Frizzi, F., Masoni, A., Quilghini, G., Ciampelli, P., & Santini, G. (2018). Chronicle of an impact foretold: the fate and effect of the introduced *Formica paralugubris* ant. *Biological Invasions*, 20(12), 3575-3589.

Groppali R, Crudele G (2005) Le formiche del gruppo *Formica rufa* trapiantate nel Parco Nazionale delle Foreste Casentinesi, Monte Falterona e Campigna. *Quad Stud Nat Romagna* 20:63–73

Goropashnaya AV, Fedorov VB, Seifert B, Pamilo P. Limited phylogeographical structure across Eurasia in two red wood ant species *Formica pratensis* and *F. lugubris* (Hymenoptera, Formicidae). *Mol Ecol*. 2004 Jul;13(7):1849-58. doi: 10.1111/j.1365-294X.2004.02189.x. PMID: 15189208.

Masoni A, Frizzi F, Natali C, Bernasconi C, Ciofi C, Santini G (2018) Molecular identification of imported red wood ant populations in the Foreste Casentinesi National Park (Italy). *Conserv Genet Resour*. <https://doi.org/10.1146/10>.

Pavan M (1959) Attivita` italiana per la lotta biologica con formiche del gruppo *Formica rufa* contro gli insetti dannosi alle foreste. *Collana Verde Ministero dell'Agricoltura e Foreste* 4:1–78

Pavan M., Ronchetti G., Vendegna V. (1971) *Corologia del gruppo Formica rufa in Italia*. Collana verde 30, Ministero Agricoltura e Foreste, Roma.

Tamura K & Nei M (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10:512-526.