

## ARCANA NATURAE

### Studio di colonie di *Aphididae* su *Chrysanthemum sp.*

#### Introduzione

Il nostro progetto nasce all'inizio del mese di ottobre quando la nostra docente di Scienze naturali ci propone di partecipare al concorso di ScienzaFirenze. Il tema che avremmo dovuto sviluppare trattava del rapporto tra il micro e il macro come approccio allo studio dei fenomeni naturali. Dopo diverse ipotesi abbiamo preso in considerazione l'idea di studiare una colonia di afidi che aveva infestato dei crisantemi presenti sul balcone della docente. Il progetto della nostra ricerca entomologica nasce quindi, in modo abbastanza casuale, da una serie di interrogativi che ci siamo posti, legati al fenomeno delle parassitosi vegetali: l'argomento, visto il continuo intersecarsi dell'approccio micro e macro ai problemi affrontati nel corso delle nostre osservazioni, ci è parso interessante, adatto e meritevole della nostra applicazione, con l'utilizzo di semplici strumenti a nostra disposizione nella scuola, in particolare microscopi ottici e lenti d'ingrandimento.

Nascono quindi delle domande fondamentali che saranno successivamente le linee guida del nostro progetto e che, nel tentativo di rispondere, susciteranno in noi nuovi interrogativi: a quale specie appartiene l'afide che infesta la pianta? E a quale specie la pianta ospite? Il primo obiettivo della nostra indagine ha quindi riguardato la classificazione biologica degli oggetti del nostro studio e ha messo in evidenza i problemi correlati, la scelta dei criteri, l'esistenza di una molteplice varietà di forme e strutture, sia macroscopiche che microscopiche, e di comportamenti. La nostra ricerca ci ha portato anche all'Istituto di Zoologia dell'Università di Milano-Bicocca, dove abbiamo potuto approfondire alcuni aspetti dello studio degli afidi che si avvalgono della bioinformatica, aventi come oggetto l'interessante simbiosi con batteri del genere *Buchnera*. Un secondo quesito che ci siamo posti è stato: come si riproducono gli afidi che stiamo osservando? L'obiettivo di una migliore comprensione del loro ciclo riproduttivo poteva essere raggiunto confrontando le nostre osservazioni con la letteratura scientifica; abbiamo quindi cercato articoli e testi che ci potessero essere utili. Un terzo quesito, nato da letture di articoli riguardanti il comportamento degli afidi e l'attività aficida di antibiotici e di infusi vegetali, ci ha portato verso una dimensione più sperimentale del nostro lavoro: la colonia di afidi oggetto del nostro studio risulta disturbata da un aumento di concentrazione dell'anidride carbonica, o dalla presenza sullo stelo di un antibiotico in polvere o di gocce di un infuso di aglio? Quali interazioni possono verificarsi tra le molecole considerate e gli afidi? L'obiettivo è stato quindi quello di valutare macroscopicamente eventuali effetti aficidi, sul numero di individui o sulla disposizione della colonia. Un'ultima domanda si è posta osservando i danni alla pianta: esistono altri parassiti, oltre agli afidi osservati? L'ipotesi formulata, dato che le foglie risultavano in parte corrose in modo macroscopico, era che potevano essere presenti bruchi, particolarmente mimetici; l'obiettivo che ci siamo prefissati è stato quindi quello di trovare conferma della presenza di altre forme parassitarie.

## INDICE

1. Materiali e metodi
2. Classificazione biologica degli afidi e della pianta ospite
3. Anche gli afidi hanno ospiti
4. Osservazioni sul ciclo riproduttivo
5. Valutazione di effetti aficidi
6. Ricerca di altre forme parassitarie
7. Conclusioni
8. Bibliografia e sitografia

## 1. MATERIALE E METODI

Per prima cosa ci siamo preoccupati che l'osservazione si svolgesse sempre nelle medesime condizioni. Proprio per questo abbiamo mantenuto la pianta in un ambiente a temperatura costante di circa 22 °C, davanti a una finestra da cui potesse ricevere luce, con annaffiature regolari, al riparo da correnti d'aria e da possibili manomissioni. Il crisantemo contava 12 steli fioriti, 3 dei quali erano già infestati alla prima osservazione datata l'11/11/2013. I conteggi degli afidi delle colonie sono stati effettuati tramite stime su tratti di stelo lunghi 6 cm. Gli steli, i fiori e le foglie sono stati osservati con la lente d'ingrandimento e fotografati. Tramite pinze sono stati prelevati campioni di individui, osservati in vivo al microscopio ottico (ingrandimento 4X10) e fotografati. Le osservazioni sono state compiute nel corso di sette incontri a cadenza generalmente settimanale, per un totale di quattordici ore sommate alle osservazioni quotidiane. Abbiamo inoltre consultato, al fine di classificare la specie di afidi da noi studiata, schede e articoli come da bibliografia e sitografia, nonché direttamente alcuni docenti universitari. Ci siamo recati all'Università di Milano Bicocca, alla Facoltà di Scienze Biologiche, dove il docente di Zoologia Maurizio Casiraghi, il quale si era precedentemente occupato della simbiosi con *Buchnera*, ci ha mostrato gli strumenti di un laboratorio di bioinformatica. Per quanto riguarda, invece, il riconoscimento della pianta ci si è avvalsi di chiavi dicotomiche, di schede di classificazione vegetale e del sito [www.aphidsonworldsplants.info](http://www.aphidsonworldsplants.info). Il ritrovamento di forme differenti (forme alate, afidi di minori dimensioni e di colore rosso, exuvie), ci ha portato a discutere sul loro significato nell'ambito del ciclo riproduttivo, ricostruito grazie alla letteratura scientifica. Infine per condurre gli esperimenti sull'attività aficida ci siamo forniti di un antibiotico comune in polvere come la Neomicina (Streptosil); abbiamo preparato in laboratorio un infuso di aglio e un dispositivo che emettesse anidride carbonica pura, prodotta da una reazione chimica, su uno stelo. Ogni esperimento è stato preceduto da discussioni sui dati forniti da articoli letti sull'argomento; ogni osservazione è stata fonte di dibattito e confronto nel gruppo.

## 2. CLASSIFICAZIONE BIOLOGICA DEGLI AFIDI E DELLA PIANTA OSPITE

Gli afidi, minuscoli ma numericamente potenti, riconoscibili per il corpo globoso o piriforme e detti anche impropriamente "pidocchi delle piante", costituiscono senza dubbio uno dei gruppi di insetti più notevoli e ricco di specie: tuttavia, con l'eccezione di agricoltori, giardinieri e gruppi di entomologi ricercatori, pochi si interessano a questi animali. Le loro straordinarie capacità riproduttive e la grande complessità dei loro cicli di sviluppo sono legate ad adattamenti specifici alle piante di cui sono parassiti – sono tutti fitofagi - e alla varietà dei fattori ambientali. Esistono afidi generalisti, adattati a diverse specie vegetali, e afidi specialisti, associati a una sola pianta ospite. Spesso si alternano forme strutturali e metodi riproduttivi differenti a seconda della pianta su cui si trovano, il che crea sicuramente problemi all'entomologo che li studia. Gli afidi sono fitomizi floematici, ossia posseggono un apparato boccale atto a succhiare dal floema la linfa elaborata; contemporaneamente sono in grado di iniettare un secreto, la loro saliva, che può contenere virus.(11b) Oltre ai danni diretti provocati alla pianta dall'asportazione di grandi quantità di linfa, le superfici fogliari vengono ricoperte – e gli stomi chiusi – da una secrezione zuccherina intestinale, costituita da escrementi viscosi ricchi di carboidrati non digeriti, detta melata, che a sua volta è cibo per disparati insetti, in particolare formiche e api; quando si essicca, funge da substrato per la crescita di muffe e funghi. Gli afidi hanno numerosi nemici in natura, in particolare tra uccelli e altri insetti, ma questo non frena la loro capacità di pullulazione; in agricoltura è quindi spesso necessario ricorrere all'uso di prodotti attivi per contatto o per ingestione, detti "aficidi", o ad azioni di lotta biologica. Alcuni batteri sono simbiotici obbligati degli afidi, in quanto procurano loro amminoacidi essenziali e ne ricevono nutrimento; vengono trasmessi alla progenie attraverso le uova. Dunque anche l'uso di antibiotici, negli ultimi anni, è stato testato per valutare la possibilità di agire contro le infestazioni.

La classificazione degli afidi ha presentato subito una difficoltà: nei testi da noi consultati inizialmente la tassonomia utilizzata è diversa. L'ordine risulta *Homoptera*, famiglia *Aphididae* (cfr.A.Klots, E.B.Klots, *Il libro degli Insetti*), oppure *Rhynchotha* o *Hemiptera*, con *Homoptera* come sottordine, insieme

agli *Heteroptera* (cfr. S.Zangheri, L.Masutti, *Entomologia agraria*); gli *Homoptera* vengono suddivisi in due sezioni (*Auchenorrhyncha* e *Sternorrhyncha*). Gli afidi in questo caso sono considerati Sternorrhinchi appartenenti alla superfamiglia degli Afidoidei suddivisa in diverse famiglie, tra cui *Aphididae*.

Abbiamo dunque consultato altre fonti per adottare la tassonomia maggiormente in uso.

Da un'interessante discussione al riguardo sul forum degli entomologi italiani da noi utilizzato si evince che gli Omotteri sono stati esclusi dalla tassonomia, in ambito filogenetico, dal 1995, anno di pubblicazione di "*Molecular Phylogeny of Homoptera: a paraphyletic taxon*", delle statunitensi Carol D. von Dohlen e Nancy A. Moran. La ricerca, basata su analisi del DNA, metteva in luce quanto fossero in realtà diversi geneticamente gli *Sternorrhyncha*, (separatisi dagli altri gruppi probabilmente fin dal Permiano), che dunque meritavano il rango di sottordine, mentre in un altro ramo filogenetico dovevano essere messi *Heteroptera* e *Auchenorrhyncha*. Il nome "Omotteri" (=dalle ali uguali, a tessitura uniforme) perdeva significato; oltretutto alcuni entomologi sottolineavano che dal punto di vista etimologico poteva essere scorretto considerare Omotteri degli Emitteri (=dalle ali a metà, ossia con una parte sclerificata e una membranosa).

E' da aggiungere che gli entomologi statunitensi usano spesso Emitteri come sinonimo di Eterotteri, il che aumenta la confusione.

Secondo la Royal Entomological Society of London, in *Insect Classification*, *Hemiptera* costituiscono un ordine: "this order includes aphids".

Esistono posizioni critiche anche riguardo alla considerazione che gli *Auchenorrhyncha* siano parafiletici rispetto agli *Heteroptera*, in quanto questa conclusione sarebbe tratta dallo studio di un unico gene (18SRNA), ma dal punto di vista morfologico questo non sarebbe confermato.

In ambito agrario si tende a mantenere la suddivisione in: Ordine *Rhyncota*, sottordini *Heteroptera* e *Homoptera*.

In ambito filogenetico si utilizza preferenzialmente l'ordine *Hemiptera* suddiviso in gruppi monofiletici con valore di sottordini (*Heteroptera*, *Sternorrhyncha*, *Coleorrhyncha*, *Cicadomorpha*, *Fulgoromorpha*). I nomi sono proposti da Sorensen, Campbell et al.(1995).

In AphidsNet, sito curato dal prof. Colin Favret dell'Università di Montreal, che abbiamo direttamente consultato anche per un parere sul nostro riconoscimento, è riportata la seguente tassonomia che abbiamo deciso di adottare:

Dominio *Eukaryota* (Whittaker & Margulis, 1978)

Regno *Animalia* (Linneo, 1758)

Sottoregno *Eumetazoa* (Butschli, 1910)

Divisione *Bilateria* (Hatschek, 1888)

Sottodivisione *Protostomia* (Grobbsen, 1908)

Phylum *Arthropoda* (Latreille, 1829)

Subphylum *Hexapoda* (Blainville, 1816)

Classe *Insecta*

Sottoclasse *Pterygota*

Infraclasse *Neoptera* (Martynov, 1923)

Coorte *Paraneoptera*

Ordine *Hemiptera* (Linneo, 1758) (sinonimi *Rhyncota*, *Cimicida*, *Homoptera* + *Heteroptera*)

Sottordini *Heteroptera*, *Sternorrhyncha*, *Coleorrhyncha*, *Auchenorrhyncha*.

Gli afidi appartengono al sottordine *Sternorrhyncha*, suddiviso in

Infraordine *Aphidomorpha*

Superfamiglie *Aphidoidea*, *Phylloxeroidea*, *Aleyrodoidea*, *Coccoidea*, *Psylloidea*.

La superfamiglia *Aphidoidea* è suddivisa in otto famiglie tra cui *Aphididae*.

Il genere che dà il nome alla famiglia, alla superfamiglia e all'infraordine è *Aphis* (Linnaeus, 1758); la scelta di dare la priorità ad *Aphis* per le categorie tassonomiche summenzionate risale a Latreille, 1802 (Aphidii).

Ci si è interrogati anche sul significato di *Aphis*: perchè Linneo scelse questo nome? Sul vocabolario Treccani della lingua italiana alla voce "afide" è riferito "etimo incerto". La nostra ipotesi iniziale, ossia che possa derivare dal verbo greco ἀφισσω, che significa "attingo" (liquidi da un recipiente), con riferimento alla capacità degli afidi di succhiare linfa, non è quella riportata ne "Il Dizionario delle scienze Naturali" del 1830 (3) che abbiamo reperito sul web, dove si ipotizza invece che Linneo abbia usato il vocabolo ἀφισ come sinonimo di *cimex*, perchè anticamente gli afidi si chiamavano "cimici dalle ali trasparenti"; il termine avrebbe un'etimologia risalente al verbo ἀφωμαι, che significherebbe "bevo succiando", che noi però non abbiamo trovato nel nostro vocabolario di greco. Dal medesimo dizionario scopriamo che nell'Ottocento gli afidi erano classificati come Emitteri, della

famiglia dei Plantisughi o Fitadelgi. Apprendiamo anche che il primo autore a descrivere questi insetti fu Anton van Leeuwenhoek, che ne parla nel primo volume (epistola 90) dell'opera intitolata *Arcana Naturae detecta* (1695), definendoli *exigua animalcula*. (4)

Dopo aver deciso la tassonomia da adottare per gli afidi, abbiamo iniziato le nostre osservazioni mirate a confermare la classificazione della pianta ospite, che, dato il periodo di fioritura (ottobre-novembre) e la morfologia di foglie e infiorescenze, portava all'ipotesi iniziale che si trattasse di un crisantemo. Il riconoscimento della pianta è sempre di fondamentale importanza per selezionare le specie possibili di afidi infestanti.

Abbiamo dunque utilizzato la chiave dicotomica proposta dal botanico Dalla Fior per le famiglie delle *Angiospermae* (cfr. *La nostra flora*, pagg.112 e segg.), passando di punto in punto ad ogni nostra osservazione ma tenendo ben presente che non si tratta di una specie spontanea ma di una varietà coltivata e originata da ibridazioni.

Osservazioni: gli steli sono lunghi anche 40-50 cm, sottilmente legnosi alla base (piante sub-arbustive o suffruticose); i capolini sono singoli o riuniti a 3-5, apicali, presentano fiori del raggio (esterni) ligulati, ossia con la corolla a linguetta, arrotondata, in un'unica fila, e i fiori del disco più piccoli con corolla tubiforme; il colore è rosa per i fiori esterni e rosa più pallido tendente al bianco per i fiori del disco; sotto il capolino ci sono foglie modificate, con brattee scure, che simulano un calice; le foglie lungo gli steli sono alterne, con cinque lobi e margini dentellati, e presentano peluria chiara sulla pagina inferiore (pubescenti).

La chiave dicotomica ci porta alla famiglia delle *Compositae*, che comprende circa 24.000 specie, il 10 % di tutte le Angiosperme, e rappresenta per i botanici il livello evolutivo più complesso raggiunto dalle Dicotiledoni. La caratteristica principale della famiglia è quella di comprendere piante erbacee che hanno fiori minuscoli riuniti in capolini, con fiori periferici in genere raggianti simili a petali.

Abbiamo quindi utilizzato la chiave per i generi giungendo al genere *Chrysanthemum*. La stessa procedura applicata per le specie ci porta a *Ch. indicum*, pianta ornamentale con foglie verdi-grigiastre, specialmente di sotto, inciso-lobate e con capolini grandi, di colore assai variabile e sovente formati esclusivamente da fiori a linguetta (capolini doppi).

I capolini che osserviamo in realtà non sono grandi, ma medio-piccoli; i fiori hanno forma diversa; la nostra discussione ci porta a una ricerca sul web che ci fa scoprire il Kathrin Kalmbach Herbarium dei Denver Botanic Gardens: al n°2999 risulta fotografata una pianta dalla morfologia sovrapponibile a quella che stiamo osservando, classificata come *Chrysanthemum morifolium* o *Dendranthema morifolium*. Un successivo approfondimento sui crisantemi ci porta a scoprire che anche la loro tassonomia è alquanto complessa. La famiglia delle *Compositae* viene per lo più sostituita da quella delle *Asteraceae*; alcuni botanici però la mantengono e considerano *Asteraceae* una sottofamiglia. Il genere *Chrysanthemum* (Linneo, 1753, "Fiore d'oro") è stato sostituito dal genere *Dendranthema* per i cosiddetti "crisantemi dei fioristi" fino al 1999, anno in cui l'International Code of Botanical Nomenclature cancella il genere *Dendranthema* e ripristina definitivamente il genere *Chrysanthemum*. Il *C. indicum* è stato usato per ottenere molti ibridi: il *C. morifolium* è appunto un ibrido derivato da *C. indicum*, con innumerevoli varietà, dai capolini di diverse dimensioni e forme, e dai colori che vanno dal giallo al rosa, al porpora, al rosso, al bianco... Nell'*Handbook on Chrysanthemum Classification* della U.S. National Chrysanthemum Society si può consultare la chiave di classificazione delle centinaia di *cultivars* attualmente in commercio (sono circa 7000). La morfologia fogliare può essere utilizzata in floricoltura per distinguere le varietà, che creano notevoli problemi di riconoscimento agli stessi esperti. Riteniamo dunque che la nostra pianta sia un *cultivar*, un poliibrido, derivata da *Ch. indicum*.

La nostra discussione si è quindi spostata nuovamente sul problema della classificazione degli afidi infestanti. Esistono circa 4800 specie di afidi nel mondo (1373 in Europa) di cui circa 250 gravemente dannosi. In "Aphids on the world's plants" (15) abbiamo trovato l'elenco delle piante associate alle possibili specie infestanti. Alla voce "*Ch. indicum* (incl. *morifolium*), *Florists chrysanthemum*" sono elencate ben trenta specie di afidi: le nostre osservazioni al microscopio e con la lente d'ingrandimento sono state quindi mirate al riconoscimento di caratteri morfologici distintivi, rilevabili nelle forme adulte.

Le colonie, disposte a manicotto, si trovano inizialmente sotto i germogli fiorali o le infiorescenze appena formatesi: la nostra ipotesi è che in questa parte dello stelo giunga molta linfa e che le pareti siano più facilmente perforabili. Successivamente, a fioritura completata, abbiamo notato un progressivo spostarsi degli individui verso il centro degli assi fiorali e anche sotto le foglie. Alcuni afidi si spostano con movimenti relativamente rapidi, altri restano addossati in gran numero nella zona in cui succhiano la linfa.

La lunghezza massima è risultata essere di circa 4-5 mm. In ogni colonia sono presenti anche forme più piccole, di circa 2 mm di lunghezza, di colore rosso o rosso-bruno, certamente forme immature. Come tutti gli insetti, risultano evidenti tre parti del corpo: testa, torace e addome. La testa,

trapezoidale, presenta due lunghe antenne e occhi composti. Il torace, che porta tre paia di zampe sottili, con femore e tibia molto allungati, è affusolato e scuro, mentre la parte posteriore dell'addome degli adulti è globosa sul dorso, appiattita sul ventre, lucida, bruna o marrone-nero. L'addome è formato da otto segmenti (uriti). In maggior parte sono atteri; abbiamo ritrovato alcune forme alate, di colore scuro, più esili e slanciate, con due paia di ali chiare, membranose (le ali anteriori più grandi di quelle posteriori), ripiegate dorsalmente a tetto sull'addome. In posizione dorso-laterale, tra il quinto e il sesto segmento dell'addome si trovano due appendici tubulari a forma cilindrica (sifoni o cornicoli), a lato di una sorta di piccola coda (cauda o codicola). La codicola è più corta nelle ninfe rispetto agli adulti. Il rostro, tra le zampe anteriori, poggia sul torace (da qui il nome *Sternorrhyncha*) è l'apparato boccale.

Apprendiamo dalla letteratura (2) che il rostro contiene 4 stiletti che, associati, formano 2 canali, usati uno per aspirare la linfa (che entra per capillarità) e l'altro per introdurre la saliva. I sifoni servono a produrre sostanze cerose a scopo di difesa (intrappolano eventuali aggressori) e feromoni come segnalatori di pericoli. La codicola serve ad allontanare la melata.

Abbiamo osservato anche strutture particolari, semitrasparenti, di dimensioni prossime ai 2 mm, con una morfologia completamente diversa dagli individui adulti: sono presenti sia sugli steli, che attaccate alle foglie; osservazioni successive hanno messo in evidenza che si trovano in gran quantità anche sotto la pianta, sui fogli di carta che abbiamo collocato per raccogliere e studiare individui morti e staccatisi dagli steli. Abbiamo dunque confrontato le nostre fotografie con le immagini dei siti consultati, scoprendo che si tratta di exuvie, ossia dei resti di esoscheletri dopo la metamorfosi. Sembra che in natura tale abbondanza di exuvie in prossimità della colonia abbia un significato evolutivo per gli afidi, perché distrarrebbe eventuali predatori, soprattutto vespe, che se ne nutrono. (11c)

La lettura dei caratteri morfologici, in particolare il colore (generalmente verde o verde pallido), associato alle diverse specie associate al *Chrysanthemum indicum* ci porta ad escludere la maggior parte di queste; la nostra attenzione si rivolge alla specie *Macrosiphoniella sanborni* (Gillette, 1908), il cui quadro sistematico-descrittivo ci sembra invece abbastanza coerente con le nostre osservazioni. "Le attere sono lucenti, dal rosso-bruno scuro al marrone-nerastro, generalmente affusolate, con sifoni neri, relativamente corti e sottili, più corti della cauda nera; lunghezza del corpo 1.0-2.3 mm. Una specie infestante cosmopolita sul "crisantemo dei fioristi" (*Dendranthema indicum*, *morifolium*, *frutescens*) sul lato inferiore delle foglie. Origine: Asia orientale, dove spesso si trova su altre Composite. Sconosciute forme sessuali."

Abbiamo cercato di avvalorare la nostra ipotesi con un'indagine mirata alla *Macrosiphoniella sanborni* e consultando esperti. L'indagine sul web ci ha portato a leggere alcuni articoli e a confrontare le nostre foto con alcune immagini, e i risultati di tali ricerche ci sono parsi positivi; ci siamo dunque rivolti al dott. Fabrizio Rigato, Conservatore di Entomologia del Museo Civico di Storia Naturale di Milano, che a sua volta ci ha indirizzato a una docente di Entomologia Agraria dell'Università di Milano, la prof.essa Lidia Limonta, esperta di afidi; quest'ultima, da noi interpellata, ci ha suggerito di preparare un vetrino da sottoporle per il riconoscimento, ma tale preparazione richiede tempi lunghi ed è di difficoltà tecnica molto elevata. Abbiamo dunque consultato via mail un docente dell'Università di Montreal responsabile del sito AphidsNet e del Favret Laboratory of Insects Systematics and Biodiversity di Montreal, il prof. Colin Favret, che ha esaminato alcune nostre fotografie. La risposta del prof. Favret (27 dicembre 2013) è stata: "I cannot be 100% certain without examining one myself, but I agree with you that the aphid appears to be *Macrosiphoniella sanborni*."

La classificazione precedentemente riportata quindi potrebbe essere completata con i successivi taxa:

Sottofamiglia *Aphidinae*

Genere *Macrosiphoniella* (del Guercio, 1911)

Sottogenere *Macrosiphoniella* (Del Guercio, 1911)

Specie *Macrosiphoniella sanborni* (Gillette, 1908)

Tale specie risulta rilevata in Lombardia su *Chrysanthemum indicum* (dati di campo riportati sul *Bollettino di Zoologia agraria e bachicoltura* in bibliografia n° 10, a Concorezzo il 7/X/2007 e a Milano il 15/X/2007, segnalazione bibl: Limonta, 2001a).

Classificare un organismo è sicuramente un'operazione complessa: "complesso" deriva dal latino "cum plexum", dove plexum significa "intreccio", ed in effetti si tratta di "intrecciare" tra loro molte variabili, connesse tra loro da molte relazioni diverse, non studiabili separatamente e da considerare perciò come un unico sistema. Abbiamo visto che si può procedere a diversi livelli, dal *macro* al *micro*. L'approccio più "micro" è quello molecolare, basato sul Dna-barcoding: è il metodo che dà al biologo la percentuale più bassa di errore. Nel caso degli Afidi, l'identificazione utilizza un frammento di DNA mitocondriale di 658 paia di basi, dalla regione del gene CO1 (cytochrome C oxydase 1).

### 3. ANCHE GLI AFIDI HANNO OSPITI

Il prof. Maurizio Casiraghi, dello ZooPlantLab del Dipartimento di Biotecnologie e Bioscienze dell'Università di Milano-Bicocca, ci ha guidato nella comprensione delle tecniche utilizzate per il DNA *barcoding* e le analisi genetiche, descrivendoci il metodo di lavoro nel suo laboratorio e i risultati ottenuti. L'oggetto dei suoi studi è il batterio *Buchnera aphidicola*, endosimbionte obbligato degli afidi. Si trova in cellule particolari dell'ospite, dette batteriociti, presenti nell'emocele, e si trasmette in linea verticale, in uova ed embrioni. Questo batterio procura all'insetto una decina di amminoacidi essenziali, che l'afide non è in grado di ottenere dal suo metabolismo (la dieta degli afidi è sbilanciata, molto ricca in carboidrati ma povera di proteine), e riceve a sua volta dall'ospite, in un flusso bidirezionale, altri amminoacidi che non è più in grado di produrre. Infatti si è dimostrato che *Buchnera* ha perso circa 2000 geni da quando - da circa 150/250 milioni di anni - è diventato endosimbionte (ha subito il cosiddetto *genome shrinkage*): il suo genoma è molto ridotto rispetto ad altri batteri a vita libera, ed è pari a 600-650 paia di basi. Possiede però ben 54 geni per gli amminoacidi essenziali dell'ospite. Nel floema vi è abbondanza di glutammina; gli afidi trasferiscono questo amminoacido nei batteriociti, dove *Buchnera* lo trasforma in acido glutammico; da questo partono vie metaboliche batteriche che portano ad altri amminoacidi, che vengono assimilati dalle cellule dell'insetto. Gli afidi non sono in grado di ridurre il solfato, *Buchnera* invece lo è. Si è in presenza di un caso evidente di coevoluzione. Si ritiene che questo batterio sia una sorta di organulo cellulare nascente, il che costituisce una prova a favore dell'ipotesi di Lynn Margulis circa l'origine degli eucarioti da forme di endosimbiosi ancestrali.

Per mappare il genoma di *Buchnera* si usano procedure per lo più automatiche o semiautomatiche; una volta prelevato e preparato il campione di afidi, si usa un estrattore di DNA; si separano il DNA dell'insetto da quello del batterio, tramite sonde geniche; frammenti di DNA vengono amplificati con la PCR (*Polymerase Chain Reaction*), separati con elettroforesi e poi inviati al sequenziatore di DNA, che legge direttamente sullo schermo di un computer la sequenza nucleotidica. Attraverso le banche dati genomiche si possono poi confrontare le sequenze con quelle di altri batteri.

Avendo scoperto l'esistenza di questi simbiotici, ci siamo chiesti quale fosse la reazione degli afidi in loro assenza, abbiamo quindi programmato un'attività sperimentale che ci consentisse di fare delle considerazioni in merito. (vedi: Valutazione di effetti aficidi)

### 4. OSSERVAZIONI SUL CICLO RIPRODUTTIVO

La riproduzione degli afidi è tanto rapida quanto complicata. "Complicato" deriva dal latino "*cum plicum*", dove *plicum* indica la piega di un foglio, e quindi significa "piegato insieme". Un problema complicato, quindi con molte variabili, connesse da relazioni generalmente lineari, si risolve con un approccio analitico: si considerano le diverse parti, si dà una spiegazione per ognuna, per poi ricomporle in un'unica risoluzione. I cicli riproduttivi degli afidi sono differenti tra le specie e possono diversificarsi anche all'interno della stessa specie, a seconda della stagione, della pianta ospite, delle condizioni ambientali. Sulla nostra pianta abbiamo contato un numero di colonie progressivamente crescente, quadruplicato in quattro settimane; una nostra stima necessariamente approssimativa, vista l'impossibilità di contare con precisione gli individui, ci ha portato a considerare ogni colonia costituita da circa 100-120 afidi. Considerando l'isolamento della pianta in laboratorio, la crescita numerica è certamente legata alla riproduzione degli individui delle colonie originarie e non a successive infestazioni. Il ritrovamento di forme alate (18/11/2013) ci ha fatto discutere sul loro significato: maschi o femmine? Perché con le ali? Ipotizziamo che le forme alate servano per la diffusione rapida della colonia su altre piante. Nel caso degli afidi che stiamo osservando, scopriamo che si tratta di femmine, perché il ciclo riproduttivo della *Macrosiphoniella sanborni* è un anolociclo: si ha cioè una successione di generazioni partenogenetiche, con scomparsa della generazione bisessuale (anfigonica). La partenogenesi, ossia lo sviluppo embrionale da uova non fecondate, è quindi la loro modalità di riproduzione. Apprendiamo, che la partenogenesi di questo afide è di tipo apomittico, ossia in assenza di meiosi. Da individui atteri possono nascere forme alate, che a loro volta possono generare forme attere. Essendo uguali dal punto di vista genetico queste forme, morfologicamente diverse, vengono evidentemente influenzate da fattori ambientali che favoriscono l'espressione di alcuni geni (13). Ma quali sono questi fattori? La nostra pianta è rimasta in laboratorio in condizioni stabili di temperatura e di umidità, solo il fotoperiodo è

diminuito durante il nostro periodo di osservazione. Gli scienziati devono ancora indagare le ragioni di questo polifenismo (dimorfismo indotto dall'ambiente): gli afidi potrebbero diventare un interessante organismo modello, in grado di mettere in crisi la validità delle leggi di Mendel. (11f) Nel 2010 l'International Aphid Genomics Consortium ha sequenziato il genoma dell'afide del pisello *Acyrtosiphon pisum* scoprendo molti geni duplicati ma altrettanti geni persi. (20)

Le femmine, dette virginopare, sono vivipare: infatti non sono visibili ovopositori; inoltre le nostre osservazioni non hanno mai messo in luce uova deposte sulla pianta. Gli afidi sono come "matrioske": dentro ogni femmina c'è una ninfa in sviluppo, che a sua volta contiene un embrione di afide. (11a) E' la partenogenesi a consentire una crescita così rapida della popolazione; il vantaggio è legato al fatto che è più facile perché non è necessario l'accoppiamento con un individuo di sesso opposto; lo svantaggio si collega alla scarsa variabilità genetica della discendenza. È da notare che sicuramente la riproduzione è stata favorita dalle condizioni ambientali in cui abbiamo mantenuto la pianta.

Durante la nostra ricerca abbiamo visto alcune forme globose rosse, con aspetto simile a una mora se viste al microscopio, attaccate ad una decina di afidi, sia all'estremità di un'antenna che in prossimità di un sifone. Ci siamo interrogati sulla loro natura, ipotizzando che fossero correlate alla riproduzione, abbiamo provato a romperle e ne sono derivate molte strutture microscopiche che non siamo riusciti a interpretare. L'ipotesi da noi formulata è che non si tratti di forme correlate al ciclo riproduttivo; potrebbero essere materiale di secrezione prodotto come risposta di allarme – stavamo sicuramente disturbando la colonia - oppure masse di uova di ectoparassiti di afide (gli acari del genere *Allothrombium*, per esempio, sono rossi e le loro larve parassitizzano molti afidi; scartiamo però l'ipotesi perché in autunno sono presenti le forme adulte, le uova sono deposte in primavera). Resta quindi un interrogativo aperto.

Il colore rosso-arancio negli afidi è correlato ai carotenoidi presenti sotto la cuticola: sono gli unici insetti a possedere un gene che ne consente la produzione. Nel 2012 una ricerca guidata dal prof. Alain Robichon, biochimico francese del dipartimento "Plants and Insects" della Nice Sophia Antipolis University, ha messo in evidenza la possibile correlazione tra tali pigmenti e una sorta di fotosintesi compiuta dagli afidi, che possono sintetizzare ATP assorbendo energia luminosa. Si tratterebbe però di un processo fototropico più che fotosintetico, perché non viene fissata l'anidride carbonica, come nelle piante. In ogni caso la scoperta ha stimolato il dibattito scientifico e ha aperto la questione: gli afidi potrebbero essere i primi animali ad utilizzare direttamente la luce come fonte di energia? (11d)

Tornando al problema della riproduzione, altre specie di afidi si riproducono con un ciclo completo, ossia con successione di generazioni partenogenetiche e una generazione bisessuale (olociclo), o con un ciclo in cui la partenogenesi è dominante al punto che quella bisessuale può mancare per alcuni anni (paraciclo).

Se il ciclo si svolge su una sola specie vegetale si dice monoico, altrimenti dioico o eteroico. Una stessa specie a ciclo eteroico con olociclo può svolgere un ciclo monoico o sull'ospite primario o su quello secondario. Infine, il ciclo si definisce omotopo se si svolge sempre sulle stesse parti della pianta oppure eterotopo se si alternano, per esempio, chioma e radici.

I nostri afidi stanno compiendo un ciclo monoico omotopo.

Gli stadi giovanili sono normalmente quattro sia per le forme alate che per quelle attere e si chiamano neanidi (I, II, III e IV per le attere; I, II, preninfa e ninfa per le alate). Sono di dimensioni più piccole ma morfologicamente molto simili agli adulti. Abbiamo riconosciuto ninfe per il fatto che la codicola era più piccola rispetto a quella delle forme mature.

## 5. VALUTAZIONE DI EFFETTI AFICIDI

Come detto in precedenza abbiamo compiuto un esperimento circa il rapporto tra *Buchnera* e afide e la possibile sopravvivenza di quest'ultimo in assenza del simbionte. Tale esperimento ci è stato suggerito dal docente Maurizio Casiraghi, il quale ha consigliato l'utilizzo di un antibiotico.

Abbiamo quindi cosperso uno stelo infestato con 0.5 g di Streptosil polvere (10 g contengono 9.95 g di solfatiazolo e 0.05 g di neomicina solfato): la neomicina è un antibiotico a largo spettro, un aminoglicoside come la rifampicina, utilizzata dai ricercatori per valutare come gli antibiotici che agiscono contro *Buchnera* indeboliscono la colonia di afidi. E' quindi un modo indiretto per combatterli. Le nostre osservazioni a distanza di una settimana ci hanno mostrato non tanto una riduzione delle dimensioni della colonia sullo stelo interessato, quanto un allontanamento degli afidi dalla parte ricoperta dalla polvere. Forse il dosaggio utilizzato (2,5 mg di neomicina solfato) è troppo basso per avere un effetto aficida, oppure *Buchnera* non è sensibile a questo antibiotico.



Successivamente ci siamo quindi proposti di elaborare degli esperimenti che ci permettessero di attaccare in modo diretto gli afidi: il primo prevedeva un infuso di aglio (21), il secondo l'emissione direzionata di anidride carbonica.

Abbiamo preparato un infuso di aglio (*Allium sativum*) schiacciando in un mortaio 5 spicchi in 130 mL di acqua bollente; abbiamo lasciato riposare per circa un'ora e mezza e poi abbiamo filtrato con carta da filtro un volume di 37 mL. L'infuso è stato rilasciato in gocce su uno stelo infestato, lontano da quello cosparso di antibiotico.

L'aglio contiene allicina, un composto solfororganico (S-allil acrilato 1-solfotioato) con attività antibiotica e antimicotica, che difende la pianta da parassiti ed è responsabile del caratteristico odore. La dose minima battericida per lo *Staphylococcus aureus* è di 128 mg/L; abbiamo cercato di calcolare la concentrazione di allicina del nostro infuso. In letteratura risulta che per ogni grammo di uno spicchio di aglio schiacciato sono presenti 2.5-4.5 mg di allicina. Gli spicchi da noi utilizzati pesano 1.69 g, 2.65 g, 3.06 g, 4.18 g, 2.72 g, per un totale di 14.3 g. L'allicina totale nel nostro infuso dovrebbe quindi variare tra 35.75 mg e 64.35 mg, con concentrazione compresa tra 275 mg/L e 495 mg/L, quindi almeno doppia rispetto a quella minima testata. Dopo una settimana non abbiamo rilevato significativi cambiamenti nella colonia.

Abbiamo infine cercato di testare la risposta degli afidi all'anidride carbonica concentrata. La CO<sub>2</sub> non ha attività aficida, ma sembra che gli insetti manifestino un comportamento di fuga, che li preserverebbe dalla morte dovuta all'ingestione della pianta infestata da parte di erbivori. (11e) L'anidride carbonica viene infatti emessa dagli animali con l'espiazione e se un erbivoro si avvicina aumenta nell'aria la sua concentrazione. L'esperimento è stato ripetuto due volte, a distanza di due settimane, e ci si è avvalsi della reazione:  $\text{CaCO}_3 + 2 \text{HCl} \rightarrow \text{CaCl}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2$ . Il carbonato di calcio è stato posto in una beuta codata cui è stato attaccato un tubicino di gomma; si è versato acido cloridrico concentrato, si è tappata immediatamente la beuta e si è direzionato il tubicino verso una colonia precedentemente osservata. Sotto lo stelo è stato messo un foglio di carta. Abbiamo visto cadere in pochi secondi numerosi afidi; nel secondo esperimento ne abbiamo contati 65. Discutendo il risultato, constatiamo che non possiamo però stabilire se la caduta degli afidi sia legata direttamente alla CO<sub>2</sub> oppure al flusso di gas e alla pressione esercitata da esso all'uscita dal tubo. Dalla letteratura apprendiamo poi che due fattori sembrano essere più importanti: il vapore acqueo (anch'esso presente nell'aria espirata) e la temperatura aumentata localmente.

Gli afidi possono resistere al disseccamento della pianta: abbiamo lasciato gli steli di crisantemo in laboratorio durante le vacanze natalizie, per circa quindici giorni, senza apporto idrico, trovandoli del tutto secchi e apparentemente non più infestati. In realtà, sotto uno stelo, abbiamo scoperto sette afidi vivi, piuttosto mobili. Sotto il vaso, ma anche sugli steli, molte exuvie. A circa 15 cm dal vaso, distanti dalle foglie, abbiamo trovato una ventina di afidi morti: forse si stavano allontanando per trovare altre piante. Ci siamo chiesti tuttavia perché non si trovassero i resti delle centinaia di individui che popolavano le colonie. Un'ipotesi da noi formulata è che si fossero trasferiti nel terreno vicino alle radici. Gli steli, ormai secchi del tutto, sono stati da noi estratti dal vaso e abbiamo osservato il terriccio intorno alle radici dopo averlo rovesciato su un piano di lavoro precedentemente preparato. Le nostre osservazioni ci hanno permesso di riconoscere: molluschi gasteropodi, microscopici nematelminti, forse fitoparassiti, un piccolo anellide e diversi esemplari di una specie molto comune nel terriccio delle piante, l'*Armadillium vulgare*, meglio conosciuto come "porcellino di terra". Non abbiamo tuttavia trovato tracce di afidi, come avevamo invece supposto.

Nelle piante esistono difese naturali: se attaccate da parassiti, alcune producono sostanze organiche volatili (sinomoni) che richiamano antagonisti naturali che limiteranno la densità del fitofago. L'ovodeposizione di un fitofago su una foglia, per esempio, stimola la pianta a produrre sinomoni, spesso terpenoidi specifici, che attirano insetti oofagi. (8) Gli afidi vivipari non depongono uova, quindi evitano questo tipo di risposta: la viviparità è dunque un adattamento importante anche per questo motivo.

Un insetticida naturale viene estratto dai capolini di alcuni crisantemi, in particolare il *Chrysanthemum* (o *Tanacetum*) *cinerariaefolium*: è il piretro, che contiene esteri dell'acido crisantemico con un alcool, il piretrolone; uno di questi esteri, la piretrina I, è più efficace nel colpire il sistema nervoso degli insetti, afidi compresi, paralizzandoli.

## 6. RICERCA DI ALTRE FORME PARASSITARIE

I danni presenti sugli steli, nel corso delle nostre osservazioni precedenti al disseccamento dei medesimi, sono consistiti in visibile e progressivo deperimento, associato all'ingiallimento delle foglie e al loro accartocciamento. Molte foglie presentavano anche lesioni macroscopiche, ossia erosioni sia ai margini che all'interno della lamina fogliare, non compatibili con gli attacchi puntiformi degli afidi. Abbiamo quindi ipotizzato la presenza di altri parassiti fitofagi: infatti, perfettamente mimetici sugli steli e sotto le foglie, abbiamo scoperto due bruchi lunghi circa 2 cm, sottili, di colore verde chiaro con puntini neri laterali, privi di pseudozampe nella regione mediana del corpo, dal movimento caratteristico: inarcano e distendono il corpo, come se misurassero il supporto su cui si spostano. Sono sicuramente larve di Lepidotteri Geometridi. La famiglia *Geometridae* è la seconda famiglia più numerosa dell'ordine dei *Lepidoptera*, dopo i *Noctuidae*. Comprende circa 21000 specie, in Italia ce ne sono circa 600. Cercando tra le foglie abbiamo anche trovato i resti ben conservati di un uovo. La specie da noi osservata quindi si riproduce in tardo autunno.

## 7. CONCLUSIONI

Gli obiettivi della nostra ricerca ci hanno portato a indagare vari aspetti della biologia degli organismi oggetto del nostro studio, intrecciati tra loro, in un continuo passaggio da livelli di organizzazione microscopici (cellulare, molecolare) ad altri macroscopici (morfologico, anatomico). Le nostre osservazioni ci hanno sollevato dubbi che sono stati fonte di discussioni e confronti, a loro volta origine di altre domande e indagini e di sempre nuove scoperte. La curiosità è stata catalizzatore comune e motore del nostro gruppo. All'inizio del nostro lavoro la domanda fondamentale è stata: QUALI animali stiamo osservando? Riteniamo di essere riusciti a darci una risposta, per quanto non certa, non avendo potuto montare un vetrino di riconoscimento entomologico da sottoporre all'esperta afidologa da noi contattata; e in ogni caso ci siamo trovati a discutere in modo costruttivo sui problemi della tassonomia e della classificazione biologica. La domanda correlata alla precedente (DOVE si trovano gli animali che stiamo osservando?) ci ha riportato agli stessi problemi, relativi al Regno Vegetale. Le domande successive (QUANTI sono? COME vivono e si riproducono? COME possono difendersi ed essere difese le piante dai fitofagi?) ci hanno sollevato moltissimi PERCHE'. E' stato affascinante il percorso teorico di lettura dei testi che via via trovavamo nella nostra ricerca, soprattutto nel web: e tradurre l'epistola 90 dell' *Arcana Naturae Detecta*, scritta in latino da van Leeuwenhoek più di trecento anni fa, scoprendo che le nostre osservazioni sugli afidi potevano conciliarsi in molti punti con le sue e che la sua meraviglia nello studiarli era anche la nostra, ci ha realmente emozionato.

Non siamo riusciti a darci tutte le risposte, molte incertezze restano, ma crediamo che nella scienza il dubbio sia un valore: come afferma Richard Feynman in *The meaning of it all* (1998), "non deve essere temuto, ma accolto volentieri, in quanto possibilità di nuove potenzialità per gli esseri umani. Se non siamo sicuri, e lo sappiamo, abbiamo una *chance* di migliorare la situazione".

## 8. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

1. Klots A., Klots E.B., *Il libro degli Insetti*, A. Mondadori Ed., Milano, 1960 pagg.11-18; pag.85; pagg. 92-94; pagg.191-193.
2. Zangheri S., Masutti L., *Entomologia agraria*, Edagricole, Bologna, 1983 pagg.7-72; pagg.92-94; pagg.105-115.
3. *Dizionario delle Scienze Naturali nel quale si tratta metodicamente dei differenti esseri della natura(...)* Opera...redatta da vari professori del Giardino del Re, e delle principali scuole di Parigi, prima traduzione dal francese con aggiunte e correzioni, Vol.I, Firenze, per V.Batelli e figli, 1830 pagg.236-239
4. Antonii a Leeuwenhoek, Regiae Societatis Anglicanae Socii, *Arcana Naturae Detecta*, Editio novissima, auctior et correctior, Lugduni Batavorum apud Joh:Arnold:Langerak, MDCCXXII, pagg.486-502
5. Dalla Fior G., *La nostra flora*, Casa editrice G.B.Monauni, Trento, 1974 pagg.112 e segg., pagg.617 e segg., pagg.641 e segg.)

6. Sorensen J.T., Campbell B.C., Jill R.J. , Steffen-Campbell J.D., *Non monophyly of Auchenorrhynca Homoptera based upon 18SRNA phylogeny: eco-evolutionary cladistic implications within Pre-Heteropteroidea Hemiptera (s.l.) and a proposal for new monophyletic orders*, Pan Pacific entomologist, 1995
7. Dose A., *La teoria delle reti applicata allo studio delle simbiosi*, Tesi di Laurea Specialistica in Scienze Biologiche, Università degli Studi Milano-Bicocca, relatore prof. M.Casiraghi, A.A.2006-2007
8. Atti dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia, Tavola Rotonda XIII, Firenze, 2006, Interazioni Insetti-Piante: i segnali di allarme delle piante e le risposte dei parassitoidi: Guerrieri E., Sasso R., Digilio M.C., Iodice L., *Meccanismi di difesa indiretta indotti in pianta dall'attacco di afidi*.
9. Abbasi S., Farsin M., Kittler J., *Reliable classification of chrysanthemum leaves through Curvature Scale Space*, Computer Science vol.1252, pagg.284-295, 1987
10. *Bollettino di Zoologia agraria e di Bachicoltura dell'Università degli Studi di Milano*, Ser.II, 40 (2),pag.208, 2008
11. [www.lescienze.it](http://www.lescienze.it)
  - a. Un parassita dentro l'altro, 30/08/2002
  - b. La saliva degli afidi, 22/07/2005
  - c. Un comportamento (solo apparentemente) antievolutivo, 19/12/2008
  - d. Afidi: gli unici animali che sintetizzano carotenoidi, 28/04/2010
  - e. Il senso del pericolo nei piccoli insetti, 09/08/2010
  - f. Afide: l'insetto che avrebbe messo in crisi Mendel, 11/10/2011
12. theaphidsroom.wordpress.com (All about aphids...not simply bugs!) Mandrioli M., *Aphids use light to produce ATP, but they are not making photosynthesis*, 02/08/2012
13. C. Braendle, G. K. Davis, JA Brisson, DL Stern *Wing dimorphism in aphids*, Nature, Luglio 2006
14. [www.aphidnet.org](http://www.aphidnet.org) A resource for aphid systematics and taxonomy.
15. [www.aphidsonworldsplants.info](http://www.aphidsonworldsplants.info) Aphids on the world's plants. An online identification and information guide.
16. [www.mums.org](http://www.mums.org) U.S. National Chrysanthemum Society Inc.
17. [www.biolib.cz](http://www.biolib.cz) Macrofotografie di afidi in *Aphidoidea* (con sette immagini di *Macrosiphoniella sanborni*, di Miroslav Deml)
18. [www.entomologiitaliani.net](http://www.entomologiitaliani.net) Forum di entomologi.
19. bugguide.net Informazioni e fotografie di insetti e altri Artropodi (Canada e Stati Uniti)
20. [www.plosbiology.org](http://www.plosbiology.org) The International Aphid Genomics Consortium, *Genome sequence of the pea aphid Acyrthosiphon pisum*, February 23, 2010
21. adatbank.transindex.ro A.Balog, R.Thiesz, L.Ferencz, J.Albert, *The effects of plant extracts on apple aphid (Homoptera: Aphis pomi De Geer) under laboratory conditions*, September 25, 2007.