



Tavole Rotonde sui maggiori problemi  
riguardanti l'Entomologia Agraria in Italia  
Sotto gli auspici del MIPAAF

## XXI.

# CONTRIBUTI DI ENTOMOLOGIA GENERALE PER NUOVE STRATEGIE DI CONTROLLO DEGLI INSETTI NOCIVI



*Estratto da:*  
ATTI DELLA  
ACCADEMIA NAZIONALE  
ITALIANA DI ENTOMOLOGIA  
Rendiconti Anno LIX - 2011



Tavole Rotonde sui maggiori problemi  
riguardanti l'Entomologia Agraria in Italia  
Sotto gli auspici del MIPAAF

**XXI.**

**CONTRIBUTI DI ENTOMOLOGIA GENERALE  
PER NUOVE STRATEGIE DI CONTROLLO  
DEGLI INSETTI NOCIVI**

*Estratto da:*  
ATTI DELLA  
ACCADEMIA NAZIONALE  
ITALIANA DI ENTOMOLOGIA  
Rendiconti Anno LIX - 2011

© 2012 Accademia Nazionale Italiana di Entomologia  
50125 Firenze - Via Lanciola 12/a

ISBN 978-88-96493-08-3

## PRESENTAZIONE

*L'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia promuove periodicamente aggiornamenti nell'ambito della Entomologia generale, consapevole delle numerose ed importanti acquisizioni in questo campo ed anche certa che esse siano la premessa indispensabile per una conoscenza sempre più approfondita ed attuale, della struttura e funzione dei diversi organi degli insetti. È a partire da queste conoscenze che è possibile intervenire sulle attività degli insetti nocivi all'agricoltura, nel tentativo di limitarne i danni.*

*Con queste finalità, ed in questo contesto, le tematiche affrontate dai diversi specialisti in un primo simposio hanno inteso di fornire un quadro aggiornato relativo all'evoluzione degli artropodi in generale e più in particolare degli esapodi, agli adattamenti morfologici che si sono verificati in alcuni ordini di particolare interesse, quali i coleotteri meloidi ed i ditteri cecidomidi. Negli interventi sono stati presentati i dati più recenti sulla filogenesi degli "atterigoti", ottenuti da indagini ultrastrutturali e molecolari, e quelli forniti dalle ricerche sul controllo genetico della segmentazione degli artropodi. È stata altresì descritta la radiazione adattativa, sia biologica che morfologica, occorsa nella famiglia Meloidae che, unitamente ad indagini molecolari, ha consentito di riconsiderare la*

*storia evolutiva del gruppo. Una particolare attenzione è stata anche dedicata alle strutture cefaliche delle larve dei cecidomidi, come esempio di evoluzione morfologica legata alla nutrizione in particolari ambienti, e chiari esempi di convergenza adattativa.*

*Un secondo simposio è stato dedicato ad un aggiornamento sulla struttura e funzione dell'apparato escretore degli insetti, ottenuto da recenti indagini di microscopia elettronica, di genomica, di trascrittomica e proteomica. Diversi organi sono coinvolti nella funzione escrettrice, ma i Tubuli Malpighiani sono le strutture maggiormente coinvolte in questo processo. Il dato di maggiore interesse scaturito da questi studi, per le implicazioni future che esso potrebbe avere nella applicazione di future strategie di controllo biologico degli insetti, è il ruolo svolto dai Tubuli Malpighiani nei processi di detossificazione e nella risposta immunitaria. Ai Tubuli Malpighiani, infine, in particolari momenti della vita dell'insetto, possono essere affidate funzioni alternative (costruzione di bozzoli) e complementari (produzione di sostanze difensive o protettive).*

ROMANO DALLAI

Presidente Accademia Nazionale Italiana di Entomologia



## INDICE

### **Giornata culturale su:**

#### EVOLUZIONE ED ADATTAMENTI DEGLI ARTROPODI CONTRIBUTI DI BASE ALLA CONOSCENZA DEGLI INSETTI

ANTONIO CARAPELLI, FRANCESCO NARDI, ROMANO DALLAI, FRANCESCO FRATI – <i>La filogenesi degli esapodi basali, aspetti controversi e recenti acquisizioni</i> .....	Pag. 119
ALESSANDRO MINELLI – <i>I segmenti degli artropodi, tra evoluzione e sviluppo</i> .....	» 133
MARCO A. BOLOGNA, ANDREA DI GIULIO – <i>Biological and morphological adaptations in the pre-imaginal phases of the beetle family Meloidae</i> .....	» 141
MARIO SOLINAS – <i>Cephalic structures and special feeding habits in larvae of Cecidomyiidae (Insecta, Diptera): biodiversity, evolution and ecology in action</i> .....	» 153

### **Tavola rotonda su:**

#### STRUTTURA E FUNZIONI DEI TUBULI MALPIGHIANI DEGLI INSETTI

ROMANO DALLAI – <i>Gli organi escretori degli insetti</i> .....	» 169
BARBARA GIORDANA – <i>Lo studio del ruolo dei Tubuli Malpighiani</i> .....	» 179
MORENA CASARTELLI – <i>I Tubuli Malpighiani nei processi di detossificazione e difesa</i> .....	» 183
MARIA GIOVANNA LEONARDI – <i>Strutture cellulari e molecolari dei Tubuli Malpighiani coinvolte nella ione- e osmoregolazione</i> .....	» 189
BARBARA CONTI, FABIOLA GIUSTI, DAVID MERCATI, MARCO GOTTARDO, ROMANO DALLAI – <i>Le funzioni complementari e alternative dei Tubuli Malpighiani degli insetti</i> .....	» 193



SEDUTA PUBBLICA, FIRENZE 13 MAGGIO 2011

Giornata culturale su:

EVOLUZIONE ED ADATTAMENTI DEGLI ARTROPODI  
CONTRIBUTI DI BASE ALLA CONOSCENZA DEGLI INSETTI

Coordinatori:

ROMANO DALLAI e STEFANO TURILLAZZI, Accademici



## LA FILOGENESI DEGLI ESAPODI BASALI, ASPETTI CONTROVERSI E RECENTI ACQUISIZIONI

ANTONIO CARAPELLI (\*) - FRANCESCO NARDI (\*) - ROMANO DALLAI (\*) - FRANCESCO FRATI (\*)

(\*) *Dipartimento di Biologia Evolutiva, Università di Siena, via A. Moro 2, 53100 Siena, Italia.*

Lettura tenuta durante la Giornata culturale «Evoluzione ed adattamenti degli Artropodi – Contributi di base alla conoscenza degli insetti». Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 13 maggio 2011.

### *The phylogeny of basal hexapods, new data and controversial results*

The application of novel techniques in molecular phylogenetics has opened to the study and critical reevaluation of the phylogenetic relationships among many and different animal groups, including arthropods. Such studies have sometimes produced reconstructions that are in conflict with well supported morphological phylogenies and have seldom lead to a reevaluation and/or dismission of phylogenetic hypotheses widely supported in the past.

In this contribution, the most important results of molecular phylogenetics on the phylogeny of hexapods are presented, with special reference to the relationships among basal hexapod groups. Special attention is given to supra-ordinal relationships and monophily of five relevant groups (the “apterygotes”: Protura, Collembola, Diplura, Microcoryphia e Zygentoma), that constitute some among the most hotly debated issues in arthropod phylogeny. Areas of consensus/conflict between phylogenies obtained based on molecular and morphological data are further identified.

KEY WORDS: basal hexpods, Entognathe, molecular phylogenetics.

### BACKGROUND MORFOLOGICO

Nonostante il grande numero di data set morfologici, paleontologici e molecolari che sono stati prodotti e i numerosi metodi di analisi applicati a questi, le relazioni filogenetiche fra i diversi gruppi di esapodi basali ed il problema della monofilia stessa degli esapodi *tout court* rimangono temi controversi (NARDI *et al.*, 2003a,b; DELSUC *et al.*, 2003; CAMERON *et al.*, 2004; GIRIBET ET AL., 2004; BITSCH *et al.*, 2004; LUAN *et al.*, 2005; CARAPELLI *et al.*, 2007; REGIER *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2011).

I cinque gruppi di esapodi basali (Protura, Collembola, Diplura, Microcoryphia e Zygentoma), in passato inclusi nel taxon “Apterygota” oggi non più considerato valido (HENNIG, 1981; BITSCH & BITSCH, 1998, 2000; BRUSCA & BRUSCA 1990), sono tradizionalmente classificati in base alla struttura del loro apparato boccale. Tuttavia scenari evolutivi diversi sono stati proposti riguardo alle loro relazioni filogenetiche. La visione tradizionale (HENNIG, 1981; Kristensen, 1981) interpreta la presenza di pieghe della capsula cefalica che racchiudono le mandibole e le prime mascelle (condizione entotrofica) come il carattere sinapomorfico più importante per raggruppare Protura, Collembola e Diplura nel taxon Entognatha. Nel contesto degli Entognatha, Protura e Collembola sono in genere considerati come sister-groups, andando a formare il taxon Ellipura. Questi due ordini condividono numerosi

caratteri presumibilmente sinapomorfi, quali l'assenza di cerci (da qui il nome Ellipura), una condizione entotrofica maggiormente pronunciata, la presenza di unghie impari nel pretarso (KRISTENSEN, 1981) e la *linea ventralis* (un solco cuticolare ventrale che si estende longitudinalmente dal labium al torace). I Collembola sono probabilmente uno dei più antichi gruppi di artropodi terrestri, visto che sono stati ritrovati resti di esemplari dell'ordine risalenti al Devoniano (circa 400 milioni di anni fa) (HIRST & MAULIK, 1926). I collemboli, diversamente dai veri insetti presentano solamente 6 segmenti addominali e mancano di Tubuli Malpighiani per cui l'escrezione è affidata all'intestino medio, al tessuto adiposo e al tegumento il quale continua ad essere periodicamente sostituito anche negli esemplari adulti. I caratteri morfologici distintivi dei collemboli sono due organi peculiari: la furca ed il colloforo. La furca è un organo saltatorio che consente a questi esapodi basali di compiere brevi balzi per sfuggire ad un predatore; il colloforo o “tubo ventrale” è invece implicato nello scambio di liquidi con l'ambiente ed è funzionale nell'adesione al substrato. La furca e il tubo ventrale sono autoapomorfie: caratteri distintivi esclusivi di questo taxon. Sistematicamente i Collembola vengono classificati nei 3 sottordini Arthropleona, Symphypleona e Neelipleona, a seconda della morfologia corporea.

I proturi sono indubbiamente uno dei gruppi di esapodi più atipici e mostrano molteplici carat-

teri unici, quali: lo sviluppo anamorfico, l'assenza di antenne, la presenza di 12 segmenti addominali negli adulti, la posizione delle aperture genitali fra l'11<sup>mo</sup> ed il 12<sup>mo</sup> segmento addominale, oltre a peculiarità nella struttura dell'assonema spermatico (DALLAI, 1980, 1994) e nella segregazione del mesoderma (MACHIDA & TAKAHASHI, 2003). Essendo privi di antenne, il primo paio di zampe (anteriori) supplisce alla funzione sensoriale, mentre le altre quattro zampe sono utilizzate per la locomozione. Inoltre, lo sviluppo anamorfico è una condizione che i Protura condividono con alcuni miriapodi, mentre risulta una modalità di sviluppo unica fra gli esapodi. Viste le particolarità della loro morfologia, la monofilia degli Ellipura e la posizione dei Protura, nel contesto degli esapodi, rimangono controverse (DALLAI, 1980, 1989; BITSCH & BITSCH, 1998; D'HAESE, 2002; GIRIBET *et al.*, 2004).

L'ordine Diplura è formato da tre linee evolutive, Campodeoidea, Japygoidea e Projapygoidea. Alle caratteristiche comuni e distintive dei dipluri (cerchi sull'ultimo segmento addominale, assenza di occhi, ecc.) sono contrapposte alcune evidenti differenze morfologiche tra le famiglie dell'ordine (ad es: forma dei cerci filiforme o a pinza; morfologia degli spermatozoi e struttura degli ovari).

Negli ultimi vent'anni, le caratteristiche morfologiche condivise da Protura, Collembola e Diplura, *in primis* il tipo di apparato boccale (entognato) con pezzi inclusi in pliche cefaliche, sono state reinterpretate da diversi autori (KOCH, 1997; KRAUS, 1997; vedi più avanti nel paragrafo). Le nuove analisi morfologiche hanno quindi portato a non considerare più gli Entognatha come un gruppo monofiletico, in quanto la condizione entotrofica osservata in proturi, collemboli e dipluri potrebbe rappresentare un carattere convergente (BITSCH, 1994), che si è originato parallelamente anche in una grande varietà di altri artropodi non-esapodi, quali: chilopodi, pauropodi, diplopodi e onicofori (DALLAI, 1980; BITSCH, 1994; KRAUS, 1997). Nella visione tradizionale (HENNIG, 1981) gli Entognatha sono comunque considerati il sister-taxon degli Ectognatha (=Insecta *sensu stricto*; KRISTENSEN, 1981), altresì definiti dalla presenza di pezzi boccali, mandibole e mascelle, esposti (condizione ectotrofica) (KRISTENSEN, 1997; KLASS & KRISTENSEN, 2001, WHEELER *et al.*, 2001).

I due restanti gruppi di atterigoti, Microcoryphia e Zygentoma, noti anche come Thysanura *s.l.*, sono inclusi fra gli Ectognatha, insieme agli Pterygota. I Microcoryphia sono caratterizzati da un'articolazione delle mandibole monocondila e sono considerati il gruppo più basale fra gli Ectognatha, sister-group di Zygentoma+Pterygota. Questi ultimi condividono invece un'articolazione delle mandi-

bole dicondila, e pertanto prendono il nome di Dicondylia.

Fenomeni di convergenza evolutiva, dovuti ad adattamenti funzionali paralleli, possono rendere lo studio comparativo dei caratteri anatomici problematico e hanno portato, in alcuni casi, alla definizione di filogenesi non affidabili. Come già detto, fra gli atterigoti, l'entognatia di Protura, Collembola e Diplura è stata considerata dalla maggior parte degli autori del passato un buon carattere tassonomico a supporto della loro affinità, mentre si considera oggi una condizione acquisita indipendentemente, associata al particolare tipo di alimentazione di questi gruppi. A questo proposito, MANTON (1973, 1977) ha mostrato che il tipo di entognatia che caratterizza Protura, Collembola e Diplura è fondamentalmente diverso, suggerendo che questa condizione potrebbe essere stata acquisita indipendentemente nei tre gruppi. Questo tema è stato ripreso da KUKALOVÁ-PECK (1987) che, descrivendo la condizione semi-entotrofica (con mandibole e mascelle solo parzialmente esposte) nel dipluro japygide fossile *Testajapyx thomasi*, interpreta la condizione entognata dei moderni Diplura come un'acquisizione secondaria, parallela, ma indipendente da quella che caratterizza gli Ellipura. L'autrice altresì suggerisce il riposizionamento dei Diplura come sister taxon degli Ectognatha, con conseguente dismissione della monofilia degli Entognatha. In aggiunta a questa interpretazione sistematica di *Testajapyx thomasi*, che è stata peraltro messa ripetutamente in discussione (BITSCH, 1994; BOURGOIN, 1996), altre indicazioni a supporto della non monofilia degli Entognatha sono state proposte da KRAUS (1997) e KOCH (1997). Questi autori interpretano l'epimorfosi, cioè la condizione che vede tutti i segmenti addominali già presenti a partire dal primo stadio giovanile, come un carattere sinapomorfico di Diplura ed Ectognatha. Tuttavia anche i Collembola, fra gli Ellipura, mostrano un tipico sviluppo epimorfico mentre, come già detto, l'anamorfosi, cioè l'acquisizione di segmenti addominali aggiuntivi durante lo sviluppo che caratterizza anche alcuni miriapodi, potrebbe altresì essere una condizione plesiomorfa conservata dai Protura. Un'ulteriore potenziale sinapomorfia di Diplura+Ectognatha è la perdita dell'organo temporale (KOCH, 1997). Inoltre, alcuni caratteri ultrastrutturali legati ai tubuli accessori dell'assonema dello spermatozoo sono stati interpretati a supporto del posizionamento dei Diplura sulla linea evolutiva degli Ectognatha (DALLAI & AFZELIUS, 1999; DALLAI *et al.*, 2011), suggerendo ancora una volta la dismissione del taxon Entognatha. Infatti la presenza di tubuli accessori potrebbe essere considerata una condizione sinapomorfica di Diplura+Insecta *s.s.*, originatasi a partire

dal ramo evolutivo principale degli esapodi solo dopo la diversificazione di Protura e Collembola, che di tubuli accessori sono privi. Inoltre, entrambi i gruppi principali di dipluri, Campodeina e Japygina, mostrano tubuli accessori con 13 protofilamenti, a supporto della monofilia dei Diplura.

STYS & BILINSKI (1990), studiando l'apparato riproduttore femminile dei Diplura nel contesto degli esapodi basali, hanno inoltre ipotizzato che i Diplura (Japygina+Campodeina) potrebbero rappresentare un gruppo parafiletico, con i Campodeina posizionati come sister-taxon degli Ellipura, con cui condividono la presenza di ovaroli meroistici, indipendentemente degli Japygina che sono caratterizzati da una condizione panoistica. Gli ovarii dei Protura sono, infatti, meglio interpretabili come secondariamente panoistici, cioè evolutisi a partire da una condizione iniziale di ovarii meroistici politrofici. Inoltre, gli ovarii di Protura, Collembola e Campodeina sono sacciformi, mentre quelli degli Japygina sono composti da ovaroli primariamente panoistici disposti in maniera segmentale, osservazione che ha portato STYS & BILINSKI (1990) ad ipotizzare per gli Japygina una condizione basale fra gli Entognatha. Nonostante queste osservazioni, la maggioranza degli autori supporta tuttora la monofilia dei Diplura. Riguardo alla loro posizione filogenetica, Kristensen (1997), pur accettandone la monofilia, sostiene che non esistano evidenze sufficienti per risolvere la tricotomia basale fra Ellipura, Diplura e Ectognatha, idea che verrà ripresa anche in seguito da WHEELER *et al.* (2001).

Un ulteriore punto conteso riguardo alla filogenesi degli atterigoti è la supposta monofilia degli Zygentoma. Fra questi i Lepidotrichidae, infatti, rappresentati dalla specie fossile *Lepidotrix pilifera* e dalla sola specie vivente *Tricholepidion gertschi*, mostrano caratteristiche della mandibola interpretabili a supporto di una loro collocazione come gruppo basale dei Dicondylia (KRISTENSEN, 1981; STANICZEK, 2000; BEUTEL & GORB, 2001), implicando la condizione parafiletica degli Zygentoma.

#### NATURA DEI DATI MOLECOLARI

Il disaccordo fra le ipotesi filogenetiche proposte da diversi autori su base morfologica ha stimolato l'acquisizione di data set alternativi e l'applicazione di metodi nuovi e più accurati per l'analisi dei dati. In questo contesto, l'analisi di dati molecolari, da soli o insieme a quelli morfologici, ha fornito nuovi e promettenti sistemi di caratteri indipendenti per studiare le relazioni filogenetiche a diversi livelli all'interno degli artropodi.

I data set molecolari possono essere classificati secondo schemi che ne mettono in luce le diverse caratteristiche: secondo il genoma da cui derivano (nucleare o mitocondriale), il tipo di gene (codificante per proteina o per RNA), o secondo la natura del dato analizzato (sequenze nucleotidiche o aminoacidiche, oppure dati strutturali, quali la posizione dei geni o la distribuzione degli introni). Ogni diverso marcatore molecolare ha le sue caratteristiche e peculiarità, che saranno qui descritte brevemente, che influenzano gli approcci metodologici all'analisi delle sequenze, nonché la loro applicabilità a problemi filogenetici diversi. Negli studi di relazioni filogenetiche "profonde", come nel caso di quelle fra i gruppi di esapodi basali, è appropriato l'uso di marcatori che evolvono lentamente (SIMON *et al.*, 1994) ed è necessaria una certa cautela quando si lavora con sequenze, o parti di sequenze, che sono molto divergenti. I geni che codificano per RNA ribosomali, presenti sia nel genoma nucleare (5.8S, 18S e 28S rDNA) che mitocondriale (12S e 16S rDNA), sono generalmente composti da un mosaico di regioni molto conservate intercalate da altre ipervariabili (SIMON *et al.*, 1994). Mentre queste ultime, che generalmente sono caratterizzate da eventi di sostituzione multipla e da indels (inserzioni e delezioni) di lunghezza variabile, sono problematiche sul fronte dell'allineamento (vedi sotto), le regioni più conservate possono contenere informazioni utili per la risoluzione di eventi filogenetici antichi. Rispetto ai geni in singola copia codificanti per subunità proteiche, i geni per rRNA nucleari sono generalmente più facili da amplificare mediante PCR, dal momento che sono presenti in centinaia di copie sul genoma. Un simile vantaggio tecnico si riscontra anche per i geni per rRNA mitocondriali, dal momento che copie multiple del genoma mitocondriale si trovano in ciascuna cellula. Come conseguenza di questi vantaggi tecnici, i geni ribosomali (da soli o in combinazione con dati morfologici) sono fra le prime sequenze ad essere state estensivamente applicate allo studio delle relazioni filogenetiche dei grandi gruppi di artropodi, includendo anche rappresentati dei taxa di atterigoti (WHEELER, 1989; FRIEDRICH & TAUTZ, 1995; WHITING *et al.*, 1997; GIRIBET & RIBERA, 1998, 2000; WHEELER *et al.*, 2001; D'HAESE, 2002; KJER, 2004; MALLATT *et al.*, 2004; LUAN *et al.*, 2005). L'affidabilità delle analisi filogenetiche basate su geni ribosomali è comunque fortemente influenzata dalla qualità dell'allineamento, un fattore critico in molti studi di questo tipo (Swofford *et al.*, 1996). A differenza dei geni codificanti per proteine, dove la definizione dell'omologia fra posizioni nucleotidiche è guidata dall'organizzazione delle sequenze in codoni, l'allineamento di geni per rRNA risulta più critico, e informazioni di natura strutturale sono

state talvolta utilizzate per migliorarlo, spesso con risultati promettenti (SIMON *et al.*, 1994; HICKSON *et al.*, 2000; PAGE, 2000, CARAPPELLI *et al.*, 2004; KJER, 2004).

I geni codificanti per proteine (protein coding genes, PCGs) forniscono un set di dati di sequenza diverso e indipendente. L'allineamento è in genere più affidabile, in quanto l'organizzazione in codoni, insieme alla possibilità di confrontare anche le relative traduzioni aminoacidiche, forniscono una guida per la definizione dell'allineamento. Una limitazione tecnica dei PCGs nucleari è che questi sono presenti nel genoma in singola copia, complicando talvolta la loro amplificazione mediante PCR. Inoltre, nei genomi diploidi, queste sequenze si possono trovare in forma eterozigote, anche se questo non è in genere un problema sostanziale quando si studiano relazioni filogenetiche antiche. Un terzo potenziale problema nell'utilizzo di PCGs è la possibile presenza di introni, variabili sia come numero che come lunghezza (ad esempio la sequenza codificante del gene EF-1 $\alpha$  nei collemboli è interrotta da 2-3 introni di medie dimensioni; Carapelli *et al.*, 2000) che complica l'amplificazione del gene a partire da DNA genomico. Questo problema può essere aggirato applicando la tecnica della RT-PCR su un isolato di mRNA (REGIER & SHULTZ, 1997). Tuttavia, se l'amplificazione del gene intero a partire da DNA genomico risulta possibile, la stessa presenza/assenza degli introni può essere interpretata in termini filogenetici e fornire un ulteriore set di dati potenzialmente informativo (CARAPPELLI *et al.*, 2000). Fino a poco tempo fa, solo un numero limitato di geni nucleari codificanti per proteine era stato applicato allo studio della filogenesi degli artropodi: gli Elongation Factor 1a e 2, la RNA polymerase II, gli istoni H3, U2 ed i geni *Hox* (REGIER & SHULTZ, 1997; COLGAN *et al.*, 1998; SHULTZ & REGIER, 2000; REGIER *et al.*, 2004, 2005; COOK *et al.*, 2001; GIRIBET *et al.*, 2004). Recentemente, grazie al consolidamento delle tecniche di amplificazione di sequenze retrotrascritte da RNA messaggeri (EST), è stato possibile ottenere un gran numero di dati di "filogenomica", basati sull'analisi dei trascrittomi, in grado di definire le relazioni filogenetiche tra le principali linee evolutive di artropodi in maniera più accurata (REGIER *et al.*, 2008; REGIER *et al.*, 2010; MEUSEMANN *et al.*, 2010; GIRIBET & EDGEcombe, 2012). In alcune di queste analisi sono state incluse anche sequenze provenienti da esapodi basali, sebbene in tutti i casi l'obiettivo degli autori era maggiormente indirizzato verso la ricostruzione delle ipotesi evolutive fra i gruppi principali di artropodi.

Un terzo marcatore molecolare, molto utilizzato per la ricostruzione di relazioni filogenetiche in diversi gruppi, inclusi gli artropodi, è il genoma mito-

condriale (BOORE, 1999). Alcune caratteristiche del DNA mitocondriale, quali la presenza di un gran numero di molecole per cellula, la generale assenza di ricombinazione, l'eredità esclusivamente matrilineare e la presunta ortologia dei geni nell'ambito dei Metazoa hanno fatto sì che questo marcatore sia stato largamente utilizzato per studiare le relazioni filogenetiche a molteplici livelli tassonomici (BALLARD *et al.*, 1992; SIMON *et al.*, 1994; CUROLE & KOCHER, 1999). La presenza sul genoma mitocondriale di un set conservato di geni (13 PCGs, 2 geni per rRNA e 22 per tRNA) e le sue dimensioni limitate (tipicamente 16-18 Kb), insieme alla disponibilità di approcci tecnici specifici al sequenziamento di questa molecola, hanno permesso la determinazione di un certo numero di sequenze complete di genomi mitocondriali in una varietà di taxa animali (BOORE, 1999). I tipi di informazione rilevanti in termini filogenetici estrapolabili da genomi mitocondriali completi sono le sequenze nucleotidiche dei geni per proteine e per RNA, le sequenze aminoacidiche dei PCGs ed il posizionamento dei geni sulla molecola. Le sequenze nucleotidiche o aminoacidiche di specifici PCGs possono essere analizzate individualmente o concatenate con lo scopo di migliorare la risoluzione e la robustezza dell'analisi (CAO *et al.*, 1994; GARCIA-MACHADO *et al.*, 1999). Grazie al sequenziamento di alcuni genomi mitocondriali completi in rappresentanti dei taxa atterigoti, diversi data set multigenici che includono specie di esapodi basali sono disponibili per l'analisi (NARDI *et al.*, 2001; 2003a; NEGRISOLO *et al.*, 2004; CAMERON *et al.*, 2004; CARAPPELLI *et al.*, 2005; COOK *et al.*, 2005; CARAPPELLI *et al.*, 2007). Inoltre i geni mitocondriali sono talvolta usati in combinazione con sequenze nucleari e caratteri morfologici (GIRIBET *et al.*, 2001, 2004; PISANI *et al.*, 2004), permettendo lo sviluppo di data set di maggiori dimensioni. Per quanto siano generalmente più difficili da ottenere, tali data set multigenici generalmente migliorano sia la qualità che la robustezza delle analisi filogenetiche (SAVOLAINEN *et al.*, 2000; BAPTESTE *et al.*, 2002).

Un ulteriore tipo di carattere legato al genoma mitocondriale, e potenzialmente molto interessante per lo studio di filogenesi profonde, è l'ordine con cui i 37 geni sono disposti lungo la molecola, il "gene order" (BOORE, 1999). Essendo le traslocazioni di geni mitocondriali sulla molecola eventi rari e presumibilmente indipendenti, queste sono considerate essere meno suscettibili a cambiamenti omoplastici (convergenti) di altri tipi di mutazioni, e quindi sembrano in grado di fornire un segnale filogenetico potenzialmente più robusto ed affidabile. Un esempio paradigmatico si trova in BOORE *et al.* (1995, 1998), che hanno interpretato la traslocazione di un gene per tRNA come un forte supporto all'ipotesi di una

stretta relazione fra insetti e crostacei (Pancrustacea), portando alla dismissione della monofilia, tradizionalmente accettata, degli Atelocerata (Insecta+Myriapoda).

#### CONTRIBUTO DEI DATI MOLECOLARI PER LA FILOGENESI DEGLI ESAPODI

L'uso di dati molecolari ha portato negli ultimi due decenni ad una profonda rivisitazione delle ipotesi filogenetiche tradizionali relative alla collocazione dei diversi gruppi di esapodi basali. Tuttavia, nonostante la crescente quantità e qualità delle informazioni disponibili, molti dei risultati ottenuti risultano in disaccordo fra loro e anche in contrasto con alcune ipotesi sull'evoluzione degli esapodi basali largamente accreditate su base morfologica (BITSCH *et al.*, 2004; GIRIBET *et al.*, 2004).

Per tutti gli anni '90 ed oltre, le analisi condotte su dati molecolari non erano mirate specificamente allo studio degli esapodi basali e, con poche eccezioni (CARAPELLI *et al.*, 2000; WHEELER *et al.*, 2001; GIRIBET *et al.*, 2004; LUAN *et al.*, 2005), qualche rappresentante degli esapodi basali veniva incluso solo sporadicamente in data set più ampi, con un campionamento di questi ultimi del tutto non uniforme (FRIEDRICH & TAUTZ, 1995; REGIER & SHULTZ, 1997, 2001; GIRIBET & RIBERA, 1998, 2000; GIRIBET & WHEELER, 1999; EDGEcombe *et al.*, 2000; SHULTZ & REGIER, 2000; COOK *et al.*, 2001; Giribet *et al.*, 2001; LAVROV *et al.*, 2004; MALLATT *et al.*, 2004; REGIER *et al.*, 2005).

In seguito agli studi di NARDI *et al.* (2001, 2003a), la possibile non monofilia degli esapodi viene per la prima volta proposta e, successivamente alla discussione che da questi è emersa (DELSUC *et al.*, 2003; NARDI *et al.*, 2003b), una attenzione maggiore è stata dedicata allo studio delle relazioni filogenetiche fra i diversi gruppi di esapodi basali e alla rivalutazione della monofilia di questi e degli Hexapoda *tout court* (BITSCH *et al.*, 2004; CAMERON *et al.*, 2004; GIRIBET *et al.*, 2004; KJER, 2004; NEGRISOLO *et al.*, 2004; REGIER *et al.*, 2004, 2005; CARAPELLI *et al.*, 2007; MEUSEMANN *et al.*, 2010; REGIER *et al.*, 2010). A questo proposito, uno degli aspetti più discussi riguarda la supposta monofilia dei cinque ordini in cui gli esapodi basali vengono tradizionalmente divisi (Protura, Collembola, Diplura, Microcoryphia e Zygentoma). Questa è stata specificamente messa in discussione in passato per i Diplura (STYS & BILINSKI, 1990) e gli Zygentoma (KRISTENSEN, 1997; BITSCH & BITSCH, 2000; STANICZEK, 2000; BEUTEL & GORB, 2001). Al contrario, anche se la maggior parte degli studi disponibili ha preso in considerazione solo un numero limitato di specie in ciascuna linea evolu-

tiva, la monofilia di Protura, Collembola e Microcoryphia risulta ben corroborata dalla maggioranza delle analisi molecolari. I proturi sono probabilmente il taxon per cui esistono meno informazioni, seppure i pochi studi in cui siano state analizzate più sequenze hanno supportato la monofilia del gruppo (GIRIBET *et al.*, 2004; Kjer *et al.*, 2004; LUAN *et al.*, 2005). La monofilia dei Microcoryphia è similmente ben supportata, sia in base a dati solo molecolari che in data set combinati (GIRIBET *et al.*, 2004; KJER *et al.*, 2004). Eccezioni sono lo studio di COLGAN *et al.* (1998) su dati molecolari, anche se la monofilia del gruppo risulta supportata se questi vengono analizzati in combinazione con dati morfologici (EDGEcombe *et al.*, 2000), e quello di GIRIBET & RIBERA (2000), in cui le relazioni fra tre specie di Microcoryphia risultano instabili e la monofilia del gruppo dipende essenzialmente dai parametri usati nell'analisi.

I Collembola sono probabilmente il gruppo di esapodi basali per il quale si hanno dati molecolari più abbondanti. Tutte le analisi in cui sono stati inclusi gli otto genomi completi disponibili posizionano le specie dell'ordine nello stesso clade, indipendentemente dal numero di geni utilizzato, dal tipo di dati e dal metodo di analisi (NARDI *et al.*, 2003a,b; DELSUC *et al.*, 2003; LAVROV *et al.*, 2004; NEGRISOLO *et al.*, 2004; CAMERON *et al.*, 2004; CARAPELLI *et al.*, 2005; CARAPELLI *et al.*, 2007). La monofilia dei Collembola è stata inoltre supportata dall'analisi delle sequenze di 18S+28S rRNA (Giribet & RIBERA, 2000; Wheeler *et al.*, 2001; LUAN *et al.*, 2005), di un data set di 5 geni concatenati (GIRIBET *et al.*, 2004), del 18S rRNA (KJER *et al.*, 2004) e dei geni nucleari EF-1 $\alpha$ , EF-2 e POLII (SHULTZ & REGIER, 2000; REGIER *et al.*, 2004, 2005). Queste evidenze, insieme alle numerose caratteristiche morfologiche condivise dai collemboli (KRISTENSEN, 1981; BITSCH & BITSCH, 2000; D'HAESE, 2003), supportano fortemente la monofilia dell'ordine.

Molto più controversa risulta invece essere la monofilia dei Diplura, sia dal punto di vista delle evidenze morfologiche (STYS & BILINSKI, 1990), che molecolari. Le analisi di SHULTZ & REGIER (2000) e GIRIBET *et al.* (2001), che includono rappresentanti delle principali linee evolutive dell'ordine (Campodeina e Japygina), non supportano la monofilia dei Diplura. Nell'analisi combinata dei geni EF-1 $\alpha$  e Pol II, SHULTZ & REGIER (2000) presentano due ricostruzioni (basate su massima parsimonia e maximum likelihood) dove i Diplura risultano parafiletici, con le due specie *Eumesocampa frigidis* e *Metajapyx subterraneus* collocate rispettivamente vicino ai Collembola ed ai Microcoryphia, anche se la monofilia dei Diplura viene potenzialmente recuperata con l'aggiunta del gene EF-2 in un'analisi combinata (REGIER *et al.*, 2004). GIRIBET *et al.* (2001), usando un approccio

di “total evidence”, similmente supportano la non monofilia dei Diplura, con un inaspettato collocamento dei Japygidae vicino ai Balanidae (Crustacea). D'altra parte, le analisi di data set alternativi basati su 18S e 28S rRNA (GIRIBET & RIBERA, 2000; WHEELER *et al.*, 2001; KJER, 2004) o altri geni (GIRIBET *et al.*, 2004; CARAPELLI *et al.*, 2007; REGIER *et al.*, 2008; MEUSEMANN *et al.*, 2010; REGIER *et al.*, 2010) trovano supporto per la monofilia dei Diplura, lasciando la questione irrisolta.

Un ulteriore aspetto dibattuto risulta essere la monofilia degli Zygentoma, in alternativa al posizionamento di *Tricholepidion gertschi* (Lepidotrichidae) come sister-group dei rimanenti Dicondylia e conseguente parafila degli Zygentoma (nella loro accezione comune) rispetto agli Pterygota. Questo punto è stato specificamente analizzato da GIRIBET *et al.* (2004) utilizzando il più ampio campionamento di Zygentoma allora disponibile (5 specie da 3 famiglie, incluso *T. gertschi*). La monofilia degli Zygentoma (come peraltro quella dei Microcoryphia) è supportata dall'analisi dei dati molecolari mitocondriali (COMANDI *et al.*, 2009). D'altra parte, l'analisi combinata di dati molecolari e morfologici suggerisce un posizionamento alternativo di *T. gertschi* o alla base dei rimanenti Dicondylia (utilizzando il set di parametri più congruente) o insieme agli altri Zygentoma (applicando set di parametri sub-ottimali), seppur di nuovo con basso supporto statistico per i nodi chiave. L'analisi complessiva delle sequenze del 18S rRNA di KJER (2004), che include *T. gertschi* insieme ad altri due rappresentanti degli Zygentoma, similmente suggerisce la non monofilia degli Zygentoma, con *Lepisma* sp. + *Thermobia domestica* collocati in posizione basale agli altri Dicondylia e *T. gertschi* inaspettatamente posizionato fra gli Pterygota. Le notevoli incongruenze fra queste ricostruzioni riguardo alla posizione ed alla monofilia degli Zygentoma suggeriscono la necessità di raccogliere dati aggiuntivi e di migliorare il campionamento del gruppo.

Oltre alla monofilia dei singoli ordini, alcuni aspetti fra i più dibattuti ed interessanti nel contesto della filogenesi degli esapodi basali sono altresì rappresentati dalla relazioni filogenetiche fra ordini e dalla validità di alcuni raggruppamenti sopra-ordinali come gli Ellipura, gli Entognatha, i Dicondylia, e così degli stessi Hexapoda.

GIRIBET & RIBERA (2000) affrontano questo problema con uno studio ad ampio spettro delle relazioni fra gruppi di artropodi in cui si utilizza un'analisi combinata del gene completo del 18S e parziale del 28S rRNA da 139 taxa. Tuttavia la procedura di “direct optimization” applicata non supporta molti dei raggruppamenti tradizionali, quali Hexapoda, Entognatha ed Ellipura, e lascia molte domande

aperte. In un'analisi successiva, mirata allo studio delle relazioni filogenetiche degli esapodi e migliorata dall'aggiunta di marcatori molecolari e dati morfologici aggiuntivi, GIRIBET *et al.* (2004) trovano, invece, un certo supporto per la relazione fra Protura e Diplura, con conseguente dismissione degli Ellipura. Inaspettatamente il cluster Protura+Diplura si colloca in maniera stabile al di fuori di un gruppo costituito da Collembola, Ectognatha e alcuni Crustacea, negando quindi allo stesso tempo la monofilia di Entognatha ed Hexapoda. Anche se il supporto statistico della relazione fra Protura e Diplura è moderato, e i risultati dell'analisi sono condizionati in maniera determinante dai dati molecolari visto che l'albero basato su dati morfologici supporterebbe un posizionamento alternativo dei Diplura fra gli Ectognatha, questo studio ha l'indubitabile merito di aver incluso il più numeroso campionamento dai gruppi di esapodi basali disponibile fino ad allora. La relazione di sister-group fra Protura e Diplura ha trovato tuttavia supporto anche in altre analisi molecolari, come in GIRIBET e RIBERA (2000), KJER (2004), LUAN *et al.*, (2005), MEUSEMANN *et al.* (2010). L'analisi Bayesiana del data set di 18S rRNA presentata da KJER (2004), che include un cospicuo numero di specie per ciascun ordine, ha prodotto una ricostruzione filogenetica alternativa e ben supportata, dove gli Entognatha risultano monofiletici e Protura+Diplura si collocano come sister-group dei Collembola. In alternativa, una relazione fra Protura e Collembola è stata ottenuta, mediante un'analisi di “total evidence” basata su sequenze di 18S, 28S e dati morfologici, in WHEELER *et al.* (2001). Anche se il supporto statistico (Bremer support) risulta fortemente condizionato dai dati morfologici, ed in effetti nessuno dei nodi rilevanti per i gruppi di entognati risulta supportato dai soli dati molecolari, la monofilia degli Entognatha viene rifiutata, con i Diplura sister-group degli Ectognatha. D'altra parte, un raggruppamento di Diplura+Collembola è stato proposto da CARAPELLI *et al.* (2000) in base alla comune perdita di un introne nel gene per l'EF-1 $\alpha$ . L'analisi combinata dei geni EF-1a, Pol II e EF-2 (REGIER *et al.*, 2004, 2005) supporta di nuovo la relazione fra Diplura e Collembola, anche se, in alcune circostanze, il raggruppamento alternativo di Diplura+Insecta non può essere escluso e, vista l'assenza di dati per i Protura, non è possibile in questo contesto testare la validità degli Ellipura. Dalla stessa analisi emerge anche una controversa relazione di sister group fra Microcoryphia e Zygentoma, che suggerirebbe una rivisitazione del gruppo Thysanura *sensu lato*, largamente rifiutato in tempi recenti. Da notare che, anche se forse non sufficienti per rivedere la posizione correntemente accettata sulla non monofilia dei Thysanura *sensu*

lato, alcuni studi recenti sulla morfologia delle mandibole in questi gruppi hanno messo in discussione l'utilità di alcuni caratteri tradizionali a supporto della monofilia dei Dicondylia (KOCH, 2001), suggerendo una certa cautela. Tuttavia tutte le altre analisi molecolari e combinate, con la sola eccezione di alcune proposte in WHEELER *et al.* (2001), supportano la visione largamente accettata che vede i Microcoryphia come il sister group dei Dicondylia (GIRIBET *et al.*, 2004; KJER, 2004; CARAPPELLI *et al.*, 2007; REGIER *et al.*, 2010).

Contemporaneamente a questi studi incentrati sugli esapodi basali, altri autori hanno affrontato in maniera più diretta il problema della filogenesi degli artropodi focalizzando la loro attenzione sull'uso della genomica mitocondriale, con lo scopo di ottenere nuovi dati e produrre una solida ricostruzione delle relazioni a livello di classi (BOORE *et al.*, 1995, 1998; GARCIA-MACHADO *et al.*, 1999; WILSON *et al.*, 2000; HWANG *et al.*, 2001; LAVROV *et al.*, 2004; NEGRISOLO *et al.*, 2004). Notevoli sforzi sono stati fatti per includere anche rappresentanti dei gruppi di atterigoti, portando all'ottenimento di 21 genomi completi (o quasi completi) da esapodi basali. Tali mitogenomi sono stati analizzati comparando sia le sequenze primarie che il "gene order". Incidentalmente, vista la velocità con cui questi genomi aggiuntivi sono stati sequenziati, nessuna delle analisi prodotte ha incluso tutte le sequenze disponibili. Inoltre, nessuna sequenza di genomi mitocondriali da rappresentanti dei Protura è stata disponibile fino a tempi più recenti.

Nonostante alcune aspettative ottimistiche (NARDI *et al.*, 2001), le traslocazioni geniche non sembrano essere informative per le relazioni filogenetiche fra ordini. Tutte le specie di atterigoti sequenziate ad oggi mostrano differenze limitate, rispetto al pattern considerato plesiomorfo per i Pancrustacea, e nessuno dei riarrangiamenti riportati sembra essere condiviso da rappresentanti di linee evolutive diverse. E' tuttavia degno di nota che i due collemboli appartenenti alla famiglia degli Onychiuridae, per i quali si ha informazione, condividono la stessa traslocazione del gene per il tRNA-SerUCN, suggerendo che, nei Collembola, il "gene order" mitocondriale potrebbe essere informativo ad un livello tassonomico più basso.

I genomi mitocondriali completi dei collemboli *Tetradontophora bielaniensis* e *Gomphiocephalus hodgsoni*, insieme a quello dello Zygentoma *Tricholepidion gertschi*, sono stati inizialmente analizzati in NARDI *et al.* (2001, 2003a) insieme ad altre specie di artropodi per le quali la sequenza completa del genoma mitocondriale era allora disponibile. Gli autori, seguendo un approccio conservativo, analizzano le sequenze aminoacidiche dei soli quattro

PCGs più conservati (*cytochrome oxidase I-III*, e *cytochrome b*) che potevano essere allineati in maniera non ambigua. L'analisi, sia secondo un principio di maximum likelihood che Bayesiano, supporta la non monofilia degli Hexapoda (Fig. 1A). Mentre la posizione basale di *T. gertschi* all'interno degli Ectognatha risulta in accordo con la visione accreditata su base morfologica, i due collemboli appaiono collocati, insieme, al di fuori di un gruppo composto da Ectognatha+Crustacea. In questa ricostruzione, seppur la monofilia dei Pancrustacea risulta supportata, gli Hexapoda, nella loro accezione comune, risultano difiletici piuttosto che monofiletici. Questi risultati hanno sollevato un certo scetticismo, che ha portato DELSUC *et al.* (2003) a rianalizzare il data set originale di NARDI *et al.* (2003a) ricodificando i nucleotidi in purine e pirimidine con lo scopo, nelle parole dell'autore, di "estrarre un segnale storico utile" usando un modello più realistico di evoluzione delle sequenze e ridurre, allo stesso tempo, gli effetti negativi della saturazione, dell'eterogeneità nella composizione in basi e dei diversi tassi di sostituzione fra siti. L'analisi Bayesiana sviluppata da DELSUC *et al.* (2003) recupera gli Hexapoda come monofiletici (con i Collembola sister-group degli Ectognatha), anche se con basso supporto statistico. Con lo scopo di chiarire questo aspetto maggior dettaglio, NARDI *et al.* (2003b) applicando un modello di variazione dei tassi di sostituzione secondo una distribuzione  $\Gamma$ , hanno analizzato di nuovo i dati in forma di sequenze aminoacidiche. Questa ulteriore analisi produce lo stesso risultato riportato in NARDI *et al.* (2003a), con gli Hexapoda difiletici ed un valore di likelihood maggiore della ricostruzione di DELSUC *et al.* (2003), indipendentemente dai taxa inclusi. L'ipotesi della non monofilia degli Hexapoda è stata in seguito supportata da NEGRISOLO *et al.* (2004) che, utilizzando tutti i geni mitocondriali e una varietà di metodi di analisi, ottengono di nuovo i Collembola esterni ad un gruppo di Crustacea+Entognatha, anche se con supporto moderato. L'ipotesi proposta in NARDI *et al.* (2003a,b) riguardo alla posizione dei Collembola viene successivamente criticata da CAMERON *et al.* (2004) in un lavoro mirato alla descrizione del genoma mitocondriale di un ulteriore esapode basale, *Nesomachilis australica* (Microcoryphia). Tuttavia, in nessuna delle analisi proposte, utilizzando sequenze nucleotidiche ed aminoacidiche di 12/13 PCGs mitocondriali e numerosi raggruppamenti di taxa, outgroups e metodi di analisi, gli Hexapoda vengono effettivamente recuperati da questi autori come monofiletici. Il posizionamento dei Collembola risulta comunque raramente risolto e spesso soggetto ad alcuni aspetti tecnici riguardanti il trattamento dei dati, la selezione dei geni e l'outgroup

utilizzato, portando gli autori a concludere che, mentre l'aggiunta di nuove sequenze potrebbe portare a ricostruzioni filogenetiche più corroborate, i dati di genomi mitocondriali da soli potrebbero anche essere insufficienti a risolvere in maniera non ambigua le relazioni filogenetiche fra gli esapodi basali.

Il problema della monofilia degli Hexapoda è stato inoltre affrontato da GIRIBET *et al.* (2004), le cui analisi favoriscono, nella maggior parte delle combinazioni di parametri, una collocazione dei Collembola fuori dal gruppo Crustacea+Insecta s.s. L'analisi di "consensus network" proposta in seguito da Holland *et al.* (2005), indica altresì che la posizione dei Collembola nel contesto delle relazioni filogenetiche degli esapodi dipende dal marcatore molecolare applicato. Le sequenze nucleotidiche mitocondriali sembrano infatti supportare la monofilia degli Hexapoda, mentre le sequenze aminoacidiche corrispondenti ne suggeriscono la parafilia. Dati recenti basati su analisi di filogenomica (REGIER *et al.*, 2008; TIMMERMANS *et al.*, 2008; MEUSEMANN *et al.*, 2010; REGIER *et al.*, 2010), nonostante includano un numero limitato di esapodi basali, sono invece in aperto contrasto con quelli ottenuti da studi di mitogenomica, supportando la visione "tradizionale" che vede tutti gli esapodi inclusi in un taxon monofiletico (Fig. 1B). Tale conclusione viene raggiunta anche da recenti interpretazioni di analisi combinate (data set basati su caratteri morfologici, reperti fossili e sequenze molecolari) (EDGEcombe, 2010; GIRIBET & EDGEcombe, 2012).

Con lo scopo di utilizzare i dati di genomica mitocondriale per studiare la collocazione dei Diplura, seppur nel difficile contesto di relazioni a livello di ordine, CARAPPELLI *et al.* (2005) determinano la sequenza completa del genoma del dipluro *Japyx solifugus* ed analizzano la sequenza aminoacidica dei quattro geni più conservati (come in NARDI *et al.*, 2003a,b). L'analisi Bayesiana di questo data set, supportata da test statistici sugli alberi, suggerisce che anche i Diplura, come già i Collembola, potrebbero collocarsi all'esterno di un gruppo Crustacea+Ectognatha, richiamando i risultati di GIRIBET *et al.* (2004). CARAPPELLI *et al.* (2007) effettuano un'analisi comprensiva di un cospicuo numero di mitogenomi tra i Pancrustacea, includendo anche 3 specie di dipluri. I risultati ottenuti supportano la monofilia dei Diplura ed un posizionamento dell'ordine (come nel caso dei Collembola) lontano dal clade degli Ectognatha (Fig. 1A). L'analisi Bayesiana incentrata sulla filogenesi degli artropodi proposta da COOK *et al.* (2005), utilizzando tutti i PCGs mitocondriali in un data set che include anche 4 Collembola e 2 Zygentoma, suggerisce di nuovo con un certo supporto che Crustacea ed Hexapoda

potrebbero essere mutualmente parafiletici. In questo studio, entrambi i gruppi di atterigoti considerati risultano monofiletici, con i Collembola ancora vicini ad alcuni Crustacea (Malacostraca) e gli Zygentoma come sister group degli Pterygota.

Un'ulteriore analisi, basata sull'uso di sequenze ribosomali nucleari 18S e 28S per risolvere le relazioni fra Protura, Collembola e Diplura, viene effettuata da Luan *et al.* (2005) includendo una buona rappresentanza di atterigoti (10 Protura, 12 Diplura, 10 Collembola, un Microcoryphia e un Zygentoma). I risultati principali di questo studio riguardano la monofilia di Protura, Collembola e Diplura e la relazione di sister-group fra Protura e Diplura, con l'esclusione dei Collembola.

Nonostante la quantità di dati raccolti, di analisi condotte e il numero cospicuo di rappresentanti dei gruppi basali di esapodi inclusi nelle analisi, il tema della monofilia degli Hexapoda e delle relazioni fra i cinque gruppi rimane tuttora controverso e dibattuto.

Recentemente, l'analisi di filomitogenomica è stata arricchita con la sequenza dell'intero mtDNA della specie di proturo *Sinentomon erythranum* (CHEN *et al.*, 2011), appartenente all'ultimo gruppo di "atterigoti" per il quale non erano conosciute informazioni sul genoma mitocondriale. L'mtDNA di *S. erythranum* presenta un cospicuo numero di caratteristiche molecolari inusuali, non riscontrabili nella maggioranza degli Hexapoda. Difatti, oltre ad essere relativamente corto (è composto da soli 14.491 nucleotidi, caratteristica che negli artropodi è stata osservata solo in ragni ed acari; MASTA & BOORE, 2004), esso presenta un elevato contenuto (52,4%) di basi T sul filamento sul quale sono orientati la maggior parte dei geni (nell'mtDNA dei metazoi, frequentemente, i 37 geni sono codificati da entrambi i filamenti). Inoltre, 18/22 geni codificanti per RNA di trasferimento degli aminoacidi (tRNA) hanno una struttura a quadrifoglio troncata, con alcuni "bracci" ridotti o addirittura completamente assenti. L'mtDNA di *S. erythranum* presenta anche alcune rilevanti differenze in termini di «gene order» (traslocazioni di geni sullo stesso filamento nucleotidico o fra eliche diverse) rispetto al modello basale riscontrato negli esapodi. Tuttavia, la caratteristica molecolare più interessante, in termini filogenetici, è rappresentata dalla posizione di uno dei due geni codificanti per l'aminoacido Leucina (Fig. 1C). Difatti, il *trnL(uaa)* si trova localizzato tra i geni *rrnL* e *nad1*, in posizione adiacente a *trnL(uag)*. Questo contrasta con il modello basale tipico di esapodi e crostacei, dove il *trnL(uaa)* si trova fra *cox1* e *cox2*, mentre è affine alla condizione osservata in miriapodi e chelicerati e più in generale al «gene order» considerato ancestrale per gli artropodi. Infatti, mentre la trasloca-

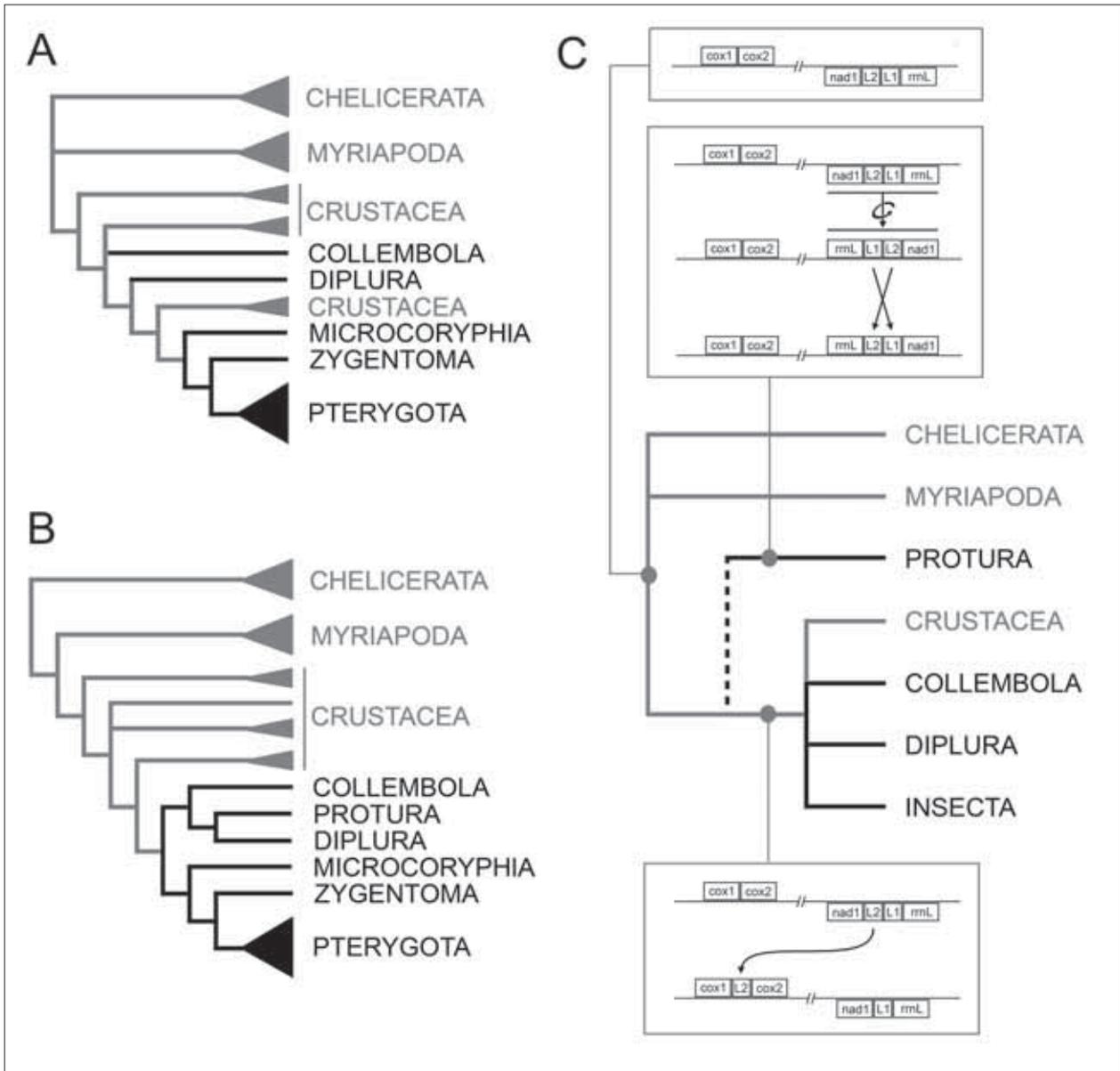


Fig. 1

Ipotesi filogenetiche alternative delle principali linee di Hexapoda (linee scure) nel contesto evolutivo degli Arthropoda. A: modificato da CARAPPELLI *et al.* (2007); B: modificato da GIRIBET & EDGEcombe 2012; C: modificato da CHEN *et al.* (2011), in basso è mostrata una possibile sequenza di cambiamenti nel “gene order”.

zione di *trnL(uaa)* (da *trnL(uag)-trnL(uaa)-rrnL* a *cox1-trnL(uaa)-cox2*) è considerata un’importante sinapomorfia dei Pancrustacea, presumibilmente apparsa nell’antenato comune di esapodi e crostacei (BOORE *et al.*, 1998), in *S. erythranum trnL(uaa)* si trova nella posizione originaria (anche se ha scambiato di posto con *trnL(uag)*), suggerendo la possibilità che i Protura potrebbero effettivamente risultare estranei ai Pancrustacea.

Purtroppo, le sequenze codificanti per proteine di *S. erythranum* (in precedenza usate per ricostruire le relazioni filogenetiche intra- ed interordinali degli esapodi basali), dato l’estremo sbilanciamento in composizione nucleotidica di gran parte di questi

geni, non possono essere usate per un’analisi filogenetica comparativa tra taxa di artropodi, in quanto danno origine ad alberi filogenetici chiaramente influenzati dal ben noto fenomeno del “long branch attraction” (CHEN *et al.*, 2011). In ogni caso, i dati relativi al «gene order» sembrano mettere in dubbio la collocazione dei proturi alla base degli esapodi e, contestualmente, la monofilia stessa di quest’ultimo taxon. Inoltre, se confermate, le conclusioni proposte da CHEN *et al.* (2011) suggerirebbero scenari alternativi rispetto alle relazioni filogenetiche tradizionali dei proturi nei confronti degli altri ordini di esapodi basali e dei principali gruppi di artropodi.

## CONCLUSIONI

Come appare in maniera evidente dalla revisione di quasi venti anni di lavoro nel campo della filogenesi molecolare applicate al problema delle relazioni fra gli esapodi basali, ancora ci sono molti punti oscuri e molti ambiti di conflitto, o inconsistenze, fra dati molecolari e morfologici, fra diversi data set molecolari e fra diversi metodi di analisi (vedi anche: BITSCH *et al.*, 2004). Tuttavia, l'accumularsi di evidenze molecolari ha, se non altro, indotto la comunità dei sistematici a rimettere in discussione e riconsiderare alcune ipotesi largamente accettate su base morfologica (HWANG *et al.*, 2001; NARDI *et al.*, 2003a; GIRIBET *et al.*, 2004).

Mentre la monofilia di ciascun ordine di atterigoti è quasi sempre ben supportata, con la possibile eccezione dei Diplura (GIRIBET *et al.*, 2001) e degli Zygentoma (GIRIBET *et al.*, 2004; KJER, 2004), le relazioni fra ordini sono ancora largamente incerte. Anche se solo pochi studi ad oggi hanno incluso rappresentanti dei Protura, e i primi genomi sono stati sequenziati solo di recente, la maggior parte delle analisi sembra supportare una loro relazione con i Diplura, che implicherebbe la dismissione degli Ellipura. Ulteriori dati di mitogenomica, da famiglie di proturi il cui mtDNA non è afflitto dai livelli di sbilanciamento nucleotidico osservati in *S. erythranum*, potrebbero aiutare a risolvere questo problema filogenetico così importante per ricostruire i "primi passi" dell'evoluzione degli Hexapoda.

In generale, un buon supporto si trova per gli Ectognatha, mentre il taxon Entognatha, già messo largamente in discussione su base morfologica, si ritrova raramente nelle analisi basate su dati molecolari. Inoltre, i dati di mitogenomica indicherebbero che alcuni gruppi di esopodi basali (quali i proturi) potrebbero anche non rappresentare linee.

Lo scenario evolutivo eventualmente risultante dalla non monofilia degli Hexapoda implicherebbe che la condizione esapode e la tagmosi tipica di questi potrebbero essersi originate indipendentemente due o più volte in linee evolutive diverse di Pancrustacea. Lo stesso si può dire per la terrestrializzazione, come discusso in NEGRISOLO *et al.* (2004), con il complesso dei numerosi adattamenti legati a questa condizione che potrebbero avere determinato l'evoluzione convergente di caratteristiche morfologiche simili.

Tuttavia, la mancanza di supporto per la monofilia degli Hexapoda in un certo set di dati (come in CAMERON *et al.*, 2004) non deve necessariamente essere interpretata come un'indicazione della non monofilia del gruppo, specialmente se non ci sono

scenari alternativi fortemente supportati (ma vedi NARDI *et al.*, 2003a, b; NEGRISOLO *et al.*, 2004; GIRIBET *et al.*, 2004) e se la maggior parte dei dati morfologici e di filogenomica effettivamente supportano la monofilia del gruppo (KRISTENSEN, 1981; BITSCH *et al.*, 2004; GIRIBET *et al.*, 2004; REGIER *et al.*, 2008; TIMMERMANS *et al.*, 2008; MEUSEMANN *et al.*, 2010; REGIER *et al.*, 2010). L'unica conclusione ragionevole che è possibile pertanto formulare oggi è che altro lavoro sarà necessario prima di raggiungere una soluzione soddisfacente del problema. A questo proposito sarà fondamentale l'utilizzo di nuovi marcatori molecolari ed un campionamento maggiore dei taxa atterigoti sia per geni nucleari che mitocondriali (GIRIBET *et al.*, 2004), oltre all'analisi ed all'approfondimento di sistemi di caratteri morfologici vecchi e nuovi. Inoltre un ruolo determinante sarà rappresentato dallo sviluppo di metodi migliori di analisi dei dati insieme ad una rivalutazione dettagliata e critica dei metodi correntemente applicati.

Con nessuna intenzione da parte nostra di affermare la superiorità di un tipo di dati sugli altri (molecolari *vs* morfologici), la disponibilità di più dati, insieme ad una migliore valutazione dell'affidabilità dei metodi di analisi applicati, non potrà che determinare un passo più in avanti nella produzione di uno scenario evolutivo più robusto per questi gruppi.

## RIASSUNTO

Le nuove tecniche di filogenesi molecolare hanno permesso di studiare e rivalutare criticamente le relazioni filogenetiche fra molti e diversi gruppi animali, inclusi gli artropodi. Questi studi hanno talvolta prodotto ricostruzioni filogenetiche che sono in conflitto con quelle basate su dati morfologici e hanno portato ad una rivalutazione e/o dismissione di ipotesi largamente accettate in passato.

In questa comunicazione si descrivono i maggiori contributi alla filogenesi degli esapodi provenienti dall'analisi molecolare, con particolare riferimento al genoma mitocondriale ed alle relazioni fra i gruppi basali degli esapodi. In particolare ci si sofferma sulle relazioni e la monofilia stessa dei cinque gruppi interessati (gli "atterigoti": Protura, Collembola, Diplura, Microcoryphia e Zygentoma), che sono uno dei temi più dibattuti nel contesto della filogenesi degli artropodi. Si identificano inoltre le aree di consenso/conflitto fra le filogenesi prodotte su base molecolare e morfologica.

## BIBLIOGRAFIA

- BALLARD J.W.O., OLSEN G.J., FAITH D.P., ODGERS W.A., ROWELL D.M., ATKINSON P.W., 1992 – *Evidence from 12S ribosomal RNA sequences that onychophorans are modified arthropods*. – *Science*, 258: 1345-1348.
- BAPTESTE E., BRINKMANN H., LEE J.A., MOORE D.V., SENSE, C.V., GORDON P., DURUFLE L., GAASTERLAND T., LOPEZ P., MULLER M., PHILIPPE H., 2002 – *The analysis*

- of 100 genes supports the grouping of three highly divergent amoebae: Dictyostelium, Entamoeba, and Mastigamoeba. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 99: 1414-1419.
- BEUTEL R.G., GORB S.N., 2001 – *Ultrastructure of attachment specializations of hexapods (Arthropoda): evolutionary patterns inferred from a revised ordinal phylogeny.* - J. Zool. Syst. Evol. Research, 39: 177-207.
- BITSCH J., 1994 – *The morphological groundplan of Hexapoda: critical review of recent concepts.* - Ann. Soc. Entomol. Fr., 30: 103-129.
- BITSCH C., BITSCH J., 199. – *Internal anatomy and phylogenetic relationships among apterygote insects clades (Hexapoda).* - Ann. Soc. Entomol. Fr. (N.S.), 34: 339-363.
- BITSCH C., BITSCH J., 2000 – *The phylogenetic interrelationships of the higher taxa of apterygote hexapods.* Zool. Scripta, 29: 131-156.
- BITSCH J., BITSCH C., BOURGOIN T., D'HAESE C.A., 2004 – *The phylogenetic position of early hexapod lineages: morphological data contradict molecular data.* - Syst. Entomol., 29:433-440.
- BOORE J.L., COLLINS T.M., STANTON D., DAHELER L.L., BROWN W.M., 1995 – *Deducing the pattern of arthropod phylogeny from mitochondrial DNA rearrangements.* – Nature, 376: 163-165.
- BOORE J.L., LAVROV D.V., BROWN W.M., 1998 – *Gene translocation links insects and crustaceans.* – Nature, 392: 667-668.
- BOORE J.L., 1999 – *Animal mitochondrial genomes.* - Nucl. Acid Res., 27: 1767-1780.
- BOURGOIN T., 1996 – *Phylogenie des Hexapodes. La recherche des synapomorphies ne fait pas toujours le cladisme!* - Bull. Soc. Fr., 121: 5-20.
- BRUSCA R.C., BRUSCA G.J., 1990 – *Invertebrates.* Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland Massachusetts.
- CAMERON S.L., MILLER K.B., D'HAESE C.A., WHITING M.F., BARKER S.C., 2004 – *Mitochondrial genome data alone are not enough to unambiguously resolve the relationships of Entognatha, Insecta and Crustacea sensu lato (Arthropoda).* – Cladistics, 20: 534-557.
- CAO Y., ADACHI J., JANKE A., PÄÄBO S., HASEGAWA M., 1994 – *Phylogenetic relationships among eutherian orders estimated from inferred sequences of mitochondrial proteins: instability of a tree based on a single gene.* - J. Mol. Evol., 39: 519-527.
- CARAPPELLI A., FRATI F., NARDI F., DALLAI R., SIMON C., 2000 – *Molecular phylogeny of the apterygoten insects based on nuclear and mitochondrial genes.* - Pedobiologia, 44: 361-373.
- CARAPPELLI A., SOTO-ADAMES F.N., SIMON C., FRATI F., NARDI F., DALLAI R., 2004 – *Secondary structure, high variability and conserved motifs for domain III of 12S rRNA in the Arthropodea (Hexapoda; Collembola).* - Insect Mol. Biol., 13: 659-670.
- CARAPPELLI A., NARDI F., DALLAI R., BOORE J.L., LIÒ P., FRATI F., 2005 – *Relationships between hexapods and crustaceans based on four mitochondrial genes. Volume 16.* - Edited by Koenemann S. & Jenner R.A. Boca Raton (FL; USA): CRC Press, Taylor and Francis Group; Crust. Issues; pp. 295-306.
- CARAPPELLI A., LIÒ P., NARDI F., VAN DER WATH E., FRATI F., 2007 – *Phylogenetic analysis of mitochondrial protein coding genes confirms the reciprocal paraphyly of Hexapoda and Crustacea.* - BMC Evol. Biol. 7 (suppl 2), S8.
- CHEN W.J., BU Y., CARAPPELLI A., DALLAI R., LI S., YIN W.Y., LUAN Y.X., 2011 – *The mitochondrial genome of Sinentomon erythranum (Arthropoda: Hexapoda: Protura): an example of highly divergent evolution.* - BMC Evol. Biol., 11: 315.
- COLGAN D.J., McLAUCHLAN A., WILSON G.D.F., LIVINGSTON S., MACARANAS J., EDGEcombe G.D., CASSIS G., GRAY M.R., 1998 – *Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution.* - Aust. J. Zool., 46: 419-437.
- COMANDI S., CARAPPELLI A., PODSIADLOWSKI L., NARDI F., FRATI F., 2009 – *The complete mitochondrial genome of Atelura formicaria (Hexapoda: Zygentoma) and the phylogenetic relationships of basal insects.* – Gene. 439: 25-34.
- COOK, C.E., SMITH, M.L., TELFORD, M.J., BASTIANELLO, A., AKAM, M., 2001 – *Hox genes and the phylogeny of the arthropods.* - Curr. Biol., 11: 759-763.
- COOK C.E., YUE Q., AKAM M., 2005 – *Mitochondrial genomes suggest that hexapods and crustaceans are mutually paraphyletic.* - Proc. R. Soc. B., 272: 1269-1304.
- CUROLE J.P., KOCHER T.D., 1999 – *Mitogenomics: digging deeper with complete mitochondrial genomes.* - Trends Ecol. Evol., 14: 394-398.
- DALLAI R., 1980 – *Considerations on Apterygota phylogeny.* - Boll. Zool., 47: 35-48.
- DALLAI R., 1989 – *Are Protura really insects?* In: Simonetta, A.M., Morris, S.C. (Eds.), *The early evolution of Metazoa and the significance of the problematic taxa.* Cambridge University Press, Cambridge, pp. 263-269.
- DALLAI R., 1994 – *Recent findings on apterygotan sperm structure.* - Acta Zool. Fennica, 195: 23-27.
- DALLAI R., AFZELIUS B., 1999 – *Accessory microtubules in insect spermatozoa: structure, function and phylogenetic significance.* In: Cagnon, C. (Ed.), *The male gamete: from basic knowledge to clinical applications.* Cache River Press, Vienna, IL, pp. 333-350.
- DALLAI R., MERCATI D., CARAPPELLI A., NARDI F., MACHIDA R., SEKIYA K., FRATI F., 2011 – *Sperm accessory microtubules suggest the placement of Diplura as the sister-group of Insecta s.s.* - Arthropod Struct. & Dev., 40: 77-92.
- DELSUC F., PHILLIPS M.J., PENNY D., 2003 – *Comment on "Hexapod Origins: Monophyletic or Paraphyletic?"* – Science, 301: 1482d.
- D'HAESE C.A., 2002 – *Were the first springtails semi-aquatic? A phylogenetic approach by means of 28S rDNA and optimization alignment.* - Proc. R. Soc. Lond. B., 269: 1143-1151.
- D'HAESE C.A., 2003 – *Morphological appraisal of Collembola phylogeny with special emphasis on Poduromorpha and a test of the aquatic origin hypothesis.* - Zool. Scri., 32: 563-586.
- EDGEcombe G.D., WILSON G.D.F., COLGAN D.J., GRAY M.R., CASSIS G., 2000 – *Arthropod cladistics: combined analysis of Histone H3 and U2 snRNA sequences and morphology.* – Cladistics, 16: 155-203.
- EDGEcombe G.D., 2010 – *Arthropod phylogeny: an overview from the perspectives of morphology, molecular data and fossil record.* . - Arthropod Struct. & Dev., 39: 74-87.
- FRIEDRICH M., TAUTZ D., 1995 – *Ribosomal DNA phylogeny of the major extant arthropod classes and the evolution of myriapods.* – Nature, 376: 165-167.
- GARCIA-MACHADO E., PEMPERA M., DENNEBOUY N., OLIVA-SUAREZ M., MOUNOLOU J.C., MONNEROT M., 1999 – *Mitochondrial genes collectively suggest the paraphyly of crustacea with respect to insecta.* - J. Mol. Evol., 49: 142-149.

- GIRIBET G., RIBEIRA C., 1998 – *The position of arthropods in the animal kingdom: a search for a reliable outgroup for internal arthropod phylogeny*. - Mol. Evol. Phylogenet., 9: 481-488.
- GIRIBET G., WHEELER W.C., 1999 – *The position of arthropods in the animal kingdom: Ecdysozoa, islands, trees and the 'parsimony ratchet'*. - Mol. Phylogen. Evol., 10: 1-5.
- GIRIBET G., RIBEIRA C., 2000 – *A review of arthropod phylogeny: New data based on ribosomal DNA sequences and direct character optimization*. - Cladistics, 16: 204-231.
- GIRIBET G., EDGECOMBE G.D., WHEELER W.C., 2001 – *Arthropod phylogeny based on eight molecular loci and morphology*. - Nature, 413: 157-161.
- GIRIBET G., EDGECOMBE G.D., CARPENTER J.M., D'HAESE C.A., WHEELER W.C., 2004 – *Is Ellipura monophyletic? A combined analysis of basal hexapod relationships with emphasis on the origin of insects*. - Org. Div. Evol., 4: 319-340.
- GIRIBET G., EDGECOMBE G.D., 2012 – *Reevaluating the arthropod tree of life*. - Annu. Rev. Entomol., 57: 167-186.
- HENNIG W., 1981 – *Insect phylogeny*. John Wiley and Sons, New York.
- HICKSON R.E., SIMON C., PERREY S.W., 2000 – *The performance of several multiple-alignment programs in relation to secondary-structure features for an rRNA sequence*. - Mol. Biol. Evol., 17: 530-539.
- HIRST S., MAULIK, S., 1926 – *On same arthropod remains from the Rhyne chert (Old Red Sandstone)*. - Geological Magazine, 63: 69-71.
- HOLLAND B.R., DELSUC F., MOULTON V., 2005 – *Visualizing conflicting evolutionary hypotheses in large collections of trees: using consensus networks to study the origins of placentals and hexapods*. - Syst. Biol., 54: 66-76.
- HWANG U.W., FRIEDRICH M., TAUTZ D., PARK C.J., KIM W., 2001 – *Mitochondrial protein phylogeny joins myriapods with chelicerates*. - Nature, 413: 154-157.
- KJER K.M., 2004 – *Aligned 18S and insect phylogeny*. - Syst. Biol., 53: 506-514.
- KLASS K.D., KRISTENSEN N.P., 2001 – *The ground plan and affinities of hexapods: recent progress and open problems*. - Ann. Soc. Entomol. Fr., 37: 265-298.
- KOCH M., 1997 – *Monophyly and phylogenetic position of the Diplura (Hexapoda)*. - Pedobiol., 41: 9-12.
- KOCH M., 2001 – *Mandibular mechanisms and the evolution of hexapods*. - Ann. Soc. Entomol. Fr., 37: 129-174.
- KRAUS O., 1997 – *Phylogenetic relationships between higher taxa of tracheate arthropods*. Arthropod Relationships, Systematic Association special volume series 55, R.A. Fortey and R.H. Thomas, Chapman & Hall, London, pp. 295-303.
- KRISTENSEN N.P., 1981 – *Phylogeny of insect orders*. - Ann. Rev. Entomol., 26: 135-157.
- KRISTENSEN N.P., 1997 – *The groundplan and basal diversification of the hexapods*. Arthropod Relationships, Systematic Association special volume series 55, R.A. Fortey and R.H. Thomas, Chapman & Hall, London, pp. 281-293.
- KUKALOVÁ-PECK J., 1987 – *New Carboniferous Diplura, Monura and Thysanura, the hexapod groundplan, and the role of thoracic side lobes in the origin of wings (Insecta)*. - Can. J. Zool., 65: 2327-2345.
- LAVROV D., BROWN W.M., BOORE J.L., 2004 – *Phylogenetic position of the Pentastomida and (pan)crustacean relationships*. - Proc. R. Soc. Lond. B., 271: 537-544.
- LUAN Y., MALLATT J.M., XIE R., YANG Y., YIN W., 2005 – *The phylogenetic positions of three basal-hexapod groups (Protura, Diplura, and Collembola) based on ribosomal RNA gene sequences*. - Mol. Biol. Evol., 22: 1579-1592.
- MACHIDA R., TAKAHASHI, I., 2003 – *Embryonic development of a proturan Baculentulus densus (Imadaté): Reference to some developmental stages (Hexapoda: Protura, Acerentomidae)*. - Proc. Arthropod Embryol. Soc. Jpn. 38, 13-17.
- MALLATT J., GAREY J.R., SHULTZ J.W., 2004 – *Ecdysozoan phylogeny and Bayesian inference: first use of nearly complete 28S and 18S rRNA gene sequences to classify the arthropods and their kin*. - Mol. Phylogen. Evol., 31: 178-191.
- MANTON S.M., 1973 – *The evolution of arthropodan locomotory mechanisms. Part 10. Locomotory habits, morphology and evolution of the hexapod classes*. - Zool. J. Linn. Soc., 51: 203-400.
- MANTON S.M., 1977 – *The Arthropoda: habits, functional morphology and evolution*. Clarendon Press, Oxford, pp. 494.
- MASTA S.E., BOORE J.L., 2004 – *The complete mitochondrial genome of the spider Habronattus oregonensis reveals rearranged and extremely truncated tRNAs*. - Mol. Biol. Evol., 21: 893-902.
- MEUSEMANN K., VON REUMONT B.M., SIMON S., ROEDING F., STRAUSS S., KÜCK, P., EBERSBERGER, I., WALZL, M., PASS G., BREUERS S., ACHTER V., VON HAESELER A., BURMESTER T., HADRYH H., WÄGELE J.W., MISOF, B., 2010 – *A phylogenomic approach to resolve the arthropod tree of life*. - Mol. Biol. Evol., 27: 2451-2464.
- NARDI F., CARAPPELLI A., FANCIULLI P.P., DALLAI R., FRATI F., 2001 – *The complete mitochondrial DNA sequence of the basal hexapod Tetrodontophora bielensis: evidence for heteroplasmy and tRNA*. - Mol. Biol. Evol., 18: 1293-1304.
- NARDI F., SPINSANTI G., BOORE J.L., CARAPPELLI A., DALLAI R., FRATI F., 2003a. – *Hexapod Origins: Monophyletic or Paraphyletic?* - Science, 299: 1887-1889.
- NARDI F., SPINSANTI G., BOORE J.L., CARAPPELLI A., DALLAI R., FRATI F., 2003b. – *Response to Comment on "Hexapod Origins: Monophyletic or Paraphyletic?"* - Science, 301: 1482e.
- NEGRISOLO E., MINELLI A., VALLE G., 2004 – *The mitochondrial genome of the house centipede Scutigera and the monophyly versus paraphyly of myriapods*. - Mol. Biol. and Evol., 21: 770-780.
- PAGE R.D.M., 2000 – *Comparative analysis of secondary structure of insect mitochondrial small subunit ribosomal RNA using maximum weighted matching*. - Nucl. Acids Res., 28: 3839-3845.
- PISANI D., POLIG L.L., LYONS-WEILER M., HEDGES S.B., 2004 – *The colonization of land animals: molecular phylogeny and divergence times among arthropods*. - BMC Biology 2:1.
- REGIER J.C., SHULTZ J.W., 1997 – *Molecular phylogeny of the major arthropod groups indicates polyphyly of crustaceans and a new hypothesis for the origin of hexapods*. - Mol. Biol. Evol., 14: 902-913.
- REGIER J.C., SHULTZ J.W., 2001 – *Elongation Factor-2: a useful gene for arthropod phylogenetics*. Mol. Phylogen. Evol., 20: 136-148.
- Regier J.C., Shultz J.W., Kambic R.E., 2004 – *Phylogeny of basal hexapod lineages and estimates of divergence times*. - Ann. Entomol. Soc. Am., 97: 411-419.
- REGIER J.C., SHULTZ J.W., KAMBIC R.E., 2005 – *Panrustacean phylogeny: hexapods are terrestrial crusta-*

- ceans and maxillopods are not monophyletic.* - Proc. R. Soc. B., 272: 395-401.
- REGIER J.C., SHULTZ J.W., GANLEY A.R.D., HUSSEY A., SHI D., BALL ZWICK, B., STAJICH J.E., CUMMINGS M.P., MARTIN J.W., CUNNINGHAM W., 2008 - *Resolving arthropod phylogeny: exploring phylogenetic signal within 41 kb of protein-coding nuclear gene sequence.* - Syst. Biol., 57: 920-938.
- REGIER J.C., SHULTZ J.W., ZWICK A., HUSSEY A., BALL B., WETZER JOEL, R., MARTIN W., CUNNINGHAM C.W., 2010 - *Arthropod relationships revealed by phylogenomic analysis of nuclear protein-coding sequences.* - Nature, 463: 1079-1083.
- SAVOLAINEN V., CHASE M.W., HOOT S.B., MORTON C.M., SOLTIS D.E., BAYER C., FAY M.F., DE BRUIJN A.Y., SULLIVAN S., QIU Y.L., 2000 - *Phylogenetics of flowering plants based on combined analysis of plastid atpB and rbcL gene sequences.* - Syst. Biol., 49: 306-362.
- SHULTZ J.W., REGIER J.C., 2000 - *Phylogenetic analysis of arthropods using two nuclear protein-encoding genes supports a crustacean + hexapod clade.* - Proc. R. Soc. Lond. B., 267: 1011-1019.
- SIMON C., FRATI F., BECKENBACH A., CRESPI B., LIU H., FLOOK P., 1994 - *Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved Polymerase Chain Reaction primers.* - Ann. Ent. Soc. of America, 87: 651-701.
- STANICZEK A.H., 2000 - *The mandible of silverfish (Insecta: Zygentoma) and mayflies (Ephemeroptera): Its morphology and phylogenetic significance.* - Zool. Anz., 239: 147-178.
- STYS P., BILINSKI S., 1990 - *Ovariole types and the phylogeny of hexapods.* - Biol. Rev., 65: 401-429.
- SWOFFORD D.L., OLSEN G.J., WADDELL P.J., HILLIS D.M., 1996 - *Phylogenetic inference.* In: Hillis D.M., Moritz C., and Mable B.K. (Eds.), Molecular systematics. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, pp. 407-514.
- TIMMERMANS M.J.T.N., ROELOFS D., MARIËN J., VAN STRAALLEN N.M., 2008 - *Revealing pancrustacean relationships: phylogenetic analysis of ribosomal protein genes places Collembola (springtails) in a monophyletic Hexapoda and reinforces the discrepancy between mitochondrial and nuclear DNA markers.* - BMC Evol. Biol., 8: 83.
- WHITING M.F., CARPENTER J.C., WHEELER Q.D., WHEELER W.C., 1997 - *The Strepsiptera problem: phylogeny of the holometabolous insect orders inferred from 18S and 28S ribosomal DNA sequences and morphology.* - Syst. Biol., 46: 1-168.
- WHEELER W.C., 1989 - *The systematics of insect ribosomal DNA.* In B. Fernholm et al. (eds.), The Hierarchy of Life. Molecules and Morphology in Phylogenetic Analysis. Amsterdam. Elsevier. 307-321.
- WHEELER W.C., WHITING M., WHEELER Q.D., CARPENTER J.M., 2001 - *The phylogeny of the extant hexapod orders.* - Cladistics, 17: 113-169.
- WHEELER W.C., GLADSTEIN D.S., DELAET J., 2002 - *POY version 3.0.* Program and documentation available at [ftp.amnh.org/pub/molecular/poy](http://ftp.amnh.org/pub/molecular/poy).
- WILSON K., CAHILL V., BALLMENT E., BENZIE J., 2000 - *The complete sequence of the mitochondrial genome of the crustacean Peneaus monodon: are malacostracan crustaceans more closely related to insects than branchiopods.* Mol. Biol. Evol. 17, 863-874.



## I SEGMENTI DEGLI ARTROPODI, TRA EVOLUZIONE E SVILUPPO

ALESSANDRO MINELLI (\*)

(\*) *Università di Padova, Via Ugo Bassi 58 B, I 35131 Padova, Italia; alessandro.minelli@unipd.it*

Lettura tenuta durante la Giornata culturale «Evoluzione ed adattamenti degli Artropodi – Contributi di base alla conoscenza degli insetti». Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 13 maggio 2011.

### *Arthropod segments between evolution and development*

Modern comparative research on the genetic control of segmentation leads to a radical revision of the traditional conception of the segment as a priori given structural unit, that in the course of evolution can only be modulated in the number or launched in divergent specialization. In many cases, as in the Diplopoda, determining the number of segments in a given arthropod depends on an arbitrary choice about what is a segment. It is to be assumed that the segmental organization has evolved several times in the Metazoa, in particular we can not speak of homology between the segments of annelids and arthropods. Even a single individual can have multiple serial structures distinct and independent of each other in terms of ontogeny and phylogeny. The mechanisms through which variation in the number of segments can be achieved by modulating development are varied and not necessarily dependent on changes in the activity of a posterior proliferative region.

KEY WORDS: segment, evo-devo, homology, development, evolvability.

### COS'È UN SEGMENTO?

I nostri Artropodi sono gli *Insecta* di Linneo, gli *ἔντομα* (entoma) di Aristotele. Mentre il nome che designa oggi il grande phylum fa riferimento alla natura articolata delle appendici di questi animali, il termine latino usato da Linneo, così come il suo preciso equivalente greco che troviamo in Aristotele, descrive l'aspetto più ovvio dell'organizzazione dell'asse principale del corpo, vale a dire la sua suddivisione in parti ripetitive, la sua natura segmentale. La restrizione postlinneana del nome *Insecta* ad una parte soltanto degli Artropodi nulla toglie all'ovvio fatto che tutti gli Artropodi sono *animalia insecta*. Di fronte a nozioni entrate già in tempi antichi a far parte delle nostre conoscenze sul mondo della natura, si potrebbe essere indotti a considerare la nozione di segmento come definitivamente acquisita e degna solo di qualche attenzione nei casi in cui l'organizzazione di un artropodo può lasciare incerti sui confini fra le successive unità segmentali che formano il corpo. Questo succede, ad esempio, nei Diplopodi, nei quali può essere ancora messo in discussione se si debbano riconoscere tanti segmenti quante sono le paia di zampe dell'animale o se non sia invece più opportuno attribuire natura di segmento a ciascuno di quegli 'anelli', più o meno completi, in cui si articola il tronco. Dei Diplopodi avremo occasione di parlare nuovamente, ma il loro caso invita

fin d'ora a soffermarci un poco sulla questione di fondo: cos'è un segmento?

Il segmento è, innanzitutto, un'unità di organizzazione morfologica e funzionale. Lo vediamo bene, per esempio, nel tronco di una scolopendra, dove possiamo riconoscere una successione di unità strutturali (in numero di 21 nelle specie delle nostre regioni) articolate fra loro, provviste di un paio di zampe ciascuna e delimitate da un tergite dorsale e da uno sternite ventrale. A questi 21 segmenti pediferi possiamo aggiungere senza incertezze una ventiduesima unità, anche se le sue appendici, anziché essere zampe locomotorie, sono invece un paio di forcipule velenifere, e anche a dispetto del fatto che a questo segmento forcipulare non corrispondono un tergite e uno sternite completi e liberi, come negli altri casi. Segmenti privi di appendici si riconoscono inoltre all'estremità posteriore del corpo, ma sul loro numero (due? tre?) regna qualche incertezza.

Se dal tronco di una scolopendra ci spostiamo a considerare il capo dello stesso animale, la nozione di segmento può ancora applicarsi, ma in un senso molto differente da quello, intuitivo, che ci ha guidato nella descrizione della regione provvista di zampe. Il capo è provvisto di tre paia di appendici (mandibole, mascelle prime, mascelle seconde), che possono suggerire l'opportunità di riconoscere, nella regione del capo in cui queste appendici sono presenti, un egual numero di segmenti, ma questa 'guida' viene meno nella metà anteriore del capo.

Ci sono tuttavia delle ragioni che ci inducono a riconoscere una natura segmentale anche a questa parte del corpo. Queste ragioni, consolidate da un'ormai lunghissima tradizione, sono in parte di natura anatomica (la presenza di un neuromero, cioè un centro nervoso pari, per ogni segmento del corpo) e in parte di natura embriologica, vista l'evidente organizzazione seriale, nell'embrione, del futuro capo dell'animale. Ne deriva la diffusa nozione secondo la quale il capo di un artropodo corrisponderebbe ad un certo numero di segmenti fusi tra loro. Nel caso degli Insetti, questi segmenti sarebbero probabilmente sei, anche se non manca chi ne vorrebbe invece riconoscere sette, attribuendo il labrum o il clypeolabrum ad un ipotetico segmento distinto da quello oculare (es., SCHMIDT-OTT *et al.*, 1994, 1995; URBACH & TECHNAU, 2003; ma vedi BITSCH & BITSCH, 2010). La nozione di 'fusione', tuttavia, risulta ambigua nella misura in cui non separa la dimensione ontogenetica da quella filogenetica (KRELL, 1992; MINELLI, 2003). Dal punto di vista dello sviluppo, sarà l'osservazione diretta a dirci se la struttura fortemente integrata delle parti che costituiscono il capo di un insetto o di un altro artropodo risulta o meno dall'integrazione strutturale (dunque, fusione in senso letterale) di unità seriali che si presentano separate e distinte in uno stadio precoce dello sviluppo. Nella dimensione filogenetica, converrebbe parlare piuttosto dell'incorporazione nel tagma cefalico di un certo numero di segmenti, ammesso di poterli riconoscere come distinti nei progenitori delle forme attuali. Lascerò fuori dalla discussione seguente l'aspetto filogenetico, per aggiungere invece alcune osservazioni sull'aspetto ontogenetico della delimitabilità e delimitazione effettiva dei segmenti.

Oggi possiamo affrontare lo studio della comparsa nell'embrione di un'organizzazione segmentale utilizzando, oltre ai metodi dell'embriologia descrittiva, anche quelli della genetica dello sviluppo. In effetti, fu proprio lo studio di alcuni mutanti di *Drosophila* con vistosi difetti nell'organizzazione segmentale (NÜSSEIN-VOLHARD & WIESCHAUS, 1980) ad aprire, trent'anni fa, la strada verso quella che sarebbe presto diventata la moderna genetica dello sviluppo, una disciplina che, a sua volta, avrebbe fornito gli strumenti più potenti per affrontare sul piano sperimentale lo studio dell'evoluzione dei meccanismi dello sviluppo. Quelle ormai classiche ricerche su *Drosophila* dimostrarono sia il coinvolgimento di numerosi geni nel dare origine alla suddivisione dell'embrione in segmenti, sia il fatto che il più precoce pattern segmentale riconoscibile nell'embrione del moscerino non corrisponde esattamente alla successione delle unità morfologiche seriali che saranno poi riconoscibili nella larva e nel-

l'adulto, bensì ad una sequenza di parasegmenti, ciascuno dei quali contribuisce per metà alla formazione di un segmento e per metà alla formazione del segmento successivo (vedi ad es. LAWRENCE, 1992). In quegli anni, comunque, l'espressione 'geni della segmentazione' diventò popolare ed ancor oggi essa ricorre con una certa frequenza, sia nella letteratura specialistica che nelle opere di carattere didattico (vedi ad esempio CARROLL *et al.*, 2004). Negli anni a noi più vicini, tuttavia, si è compreso che le funzioni in cui sono coinvolti questi geni (o, meglio, le proteine da essi codificate) non sono tali da giustificare veramente tale qualifica. Come hanno scritto HEJNOL & MARTINDALE (2008), "There are no such things like 'segmentation', 'eye', 'heart' or 'limb' genes. There are just molecules that can bind to DNA or interact with receptors, phosphorylate other molecules, etc."

#### SEGMENTI AMBIGUI

La nozione di segmento, dunque, ha per lo meno una duplice valenza: da un lato, il segmento è un'unità morfofunzionale ben riconoscibile nell'architettura corporea dell'animale; dall'altro esso sarebbe una sorta di archetipo dell'organizzazione corporea, al quale sarebbe possibile e opportuno riferire anche quelle parti del corpo in cui la morfologia esterna non rivela alcuna suddivisione degna di un *insectum*.

Origini embrionali a parte, è dunque più opportuno riferirsi all'anatomia interna, quando la morfologia esterna è poco informativa? Nel caso di animali segmentati diversi dagli Artropodi, strutture seriali degne di attenzione sono di sicuro le vertebre dei Vertebrati (limitatamente però al tronco e alla coda) oppure i sacchetti celomatici e i metanefridi degli Anellidi. In tutti e tre i casi, però, un riferimento importante è quello offerto dall'asse longitudinale principale del sistema nervoso, con la sua successione di gangli e di nervi laterali. Non è detto, tuttavia, che con questo siano risolti tutti i nostri problemi.

Prendiamo ad esempio il caso delle sanguisughe. In questi anellidi, la superficie del corpo è suddivisa in anelli il cui numero è di molto superiore a quello delle unità riconoscibili, nell'anatomia interna, utilizzando come riferimento i gangli nervosi, oppure i metanefridi, per la parte del corpo in cui si estende la loro sequenza. Fin dalla seconda metà dell'Ottocento si è consolidata la scelta di chiamare segmenti le unità riconoscibili dall'anatomia interna, riconoscendo agli anelli esterni solo il valore di suddivisioni secondarie (molto spesso, 3 oppure 5 per segmento). Per qualche tempo, tuttavia, tra gli studiosi di Irudinei si contrapposero due scuole: quella

di GRATIOLET (1862) e di WHITMAN (1886, 1892), che fissava proprio nel cuore di due paia successive di gangli nervosi il limite anteriore ed il limite posteriore, rispettivamente, di un segmento, mentre la scuola di MOORE (1898, 1900) e di CASTLE (1900) riconosceva invece a ciascuna coppia di gangli una posizione centrale all'interno del segmento. Moderni studi sullo sviluppo embrionale delle sanguisughe (vedi una sintesi in SHANKLAND & SAVAGE 1997) hanno rivelato un *cell lineage* che per successive suddivisioni di una serie di teloblasti ectodermici e mesodermici dà origine a 32 gruppi di cellule, capostipiti di altrettanti segmenti che corrispondono molto bene ai segmenti già riconosciuti dai morfologi sulla base dell'anatomia interna e sostanzialmente in registro con la cadenza segmentale indicata da MOORE e CASTLE. Ci siamo, dunque? Forse, ma non sempre. Nei Policheti del genere *Pectiniaria*, l'articolazione del corpo in segmenti sembra ben riconoscibile anche dall'aspetto esterno dell'animale, con la sua regolare successione di parapodi. C'è dunque bisogno di verificare come sono distribuiti i gangli, lungo la catena gangliare ventrale dell'animale? Forse sì, ma è proprio allora che cominciano i problemi. Se teniamo per buona la scansione segmentale suggerita dai parapodi, *Pectiniaria* avrebbe tre paia di gangli per segmento (NILSSON, 1912)...

Ma è ora di restringere definitivamente l'attenzione agli Artropodi. Questa restrizione del campo di indagine non ci garantisce, tuttavia, una tranquilla applicabilità della nozione di segmento.

Nei Crostacei Notostraci, per esempio, non vi è una corrispondenza precisa fra le paia di appendici del tronco e i segmenti in cui si articola la corrispondente regione del corpo. Ambiguità nella delimitazione dei segmenti del tronco sono molto diffuse nei Miriapodi e non si limitano alla presenza, già ricordata, di 'diplosegmenti' nel tronco dei Diplopodi. All'interno dei Chilopodi, per esempio, gli Scutigermorfi hanno un tronco provvisto di soli otto tergiti a fronte di 15 paia di zampe. Nella maggior parte dei Pauropodi troviamo sei tergiti a fronte a 9-10 paia di zampe. Nei Sinfili, il numero dei tergiti è invece superiore rispetto a quello delle paia di zampe (15-24 tergiti contro 11-12 paia di zampe). È probabile che queste discrepanze dipendano dal fatto che i meccanismi responsabili della produzione di un'organizzazione segmentale della parte dorsale dell'animale siano in qualche misura indipendenti dai meccanismi responsabili dell'organizzazione segmentale della parte ventrale. Quanto meno, questo è il risultato degli studi di JANSSEN *et al.* (2004) sul diplopodo *Glomeris marginata*.

Nell'ambito degli Insetti, non sono rare le situazioni in cui di un ipotetico segmento non rimane che

la parte dorsale o, più raramente, solo quella ventrale. Il segmento 'normale e completo' dei nostri manuali si riduce presto a semplice modello ideale, di fronte alle architetture più diverse che troviamo, ad esempio, nell'addome di moltissimi Imenotteri. Straordinaria fra tutte è l'organizzazione del complesso pterotoracico degli Odonati, dove i due mesoepimeri sembrano... dimenticarsi della loro natura di scleriti plurali, per venirsi a fondere dorsalmente lungo la linea mediana, interrompendo così la continuità fra il vistoso tergite protoracico e quanto rimane del tergite mesotoracico.

Considerare il segmento come il modulo primario, se non unico, dell'architettura del tronco di un artropodo significa ignorare sia la grande indipendenza che spesso dimostrano moduli strutturali più piccoli (un tergite, un pleurite etc.), sia la frequente formazione di moduli più estesi, alla cui costruzione concorrono due o più segmenti, oppure parti di segmenti diversi (ammesso, naturalmente, che la delimitazione dei segmenti si possa considerare non ambigua). Tornando ai Diplopodi, se è vero che gli 'anelli' o 'diplosegmenti' rappresentano ovvie unità morfofunzionali, è anche vero che le due paia di appendici di uno stesso anello o diplosegmento possono differenziarsi in modo drammaticamente diverso, come avviene nei maschi di molte specie, dove un paio ha funzione genitale (gonopodi), mentre l'altro paio conserva una normale struttura di zampa locomotoria.

#### GLI ARTROPODI E GLI ALTRI ANIMALI SEGMENTATI: OMOLOGIA TRA SEGMENTI?

Di fronte a comportamenti morfologici così diversi, alla base dei quali ci sono vicende ontogenetiche e quadri di espressione genica molto vari (quest'ultimi, peraltro, ancora assai imperfettamente conosciuti), è necessario chiedersi se tutte le unità che noi chiamiamo segmenti siano in realtà omologhe tra loro. Il problema può essere affrontato a livelli diversi.

Ci possiamo chiedere, innanzitutto, se (o fino a che punto) sia legittimo considerare omologhe le unità seriali che riconosciamo nel corpo di un artropodo, di un anellide e di un vertebrato. In secondo luogo, ci possiamo chiedere se tutte le serie di strutture ripetitive di uno stesso animale siano necessariamente parti di una stessa serie di unità segmentali. Infine, possiamo chiederci se tutti gli elementi siano strettamente omologhi tra loro all'interno di una stessa serie di segmenti in uno stesso animale.

Il primo problema è stato molto dibattuto negli ultimi vent'anni, per due diverse ragioni. Da un lato, gli studi filogenetici su base molecolare hanno messo

presto in forse l'ipotetica stretta affinità fra i due grandi gruppi di animali invertebrati segmentati, gli Anellidi e gli Artropodi, un'affinità che aveva suggerito a CUVIER (1816) di raggrupparli in una delle sue quattro divisioni (*embranchements*) del Regno Animale, quella degli Artropodi. Se gli Anellidi hanno invece affinità più strette con i Molluschi che con gli Artropodi, e quest'ultimi, da parte loro, risultano più affini ai Nematodi che agli Anellidi, si presenta subito una nuova e forse inattesa questione: i segmenti degli Artropodi sono omologhi ai segmenti degli Anellidi?

In termini di filogenesi, la questione si traduce in un'alternativa fra due possibilità: (a) i segmenti degli Anellidi e quelli degli Artropodi sono tra loro omologhi e quindi i due phyla, anche se non sono più da considerare ciascuno il più prossimo parente dell'altro, derivano comunque da un antenato segmentato, ma l'organizzazione segmentata è andata perduta, separatamente, sia nei gruppi più prossimi agli Anellidi (nei Molluschi, per esempio), sia nei gruppi più prossimi agli Artropodi (in particolare, nei Nematodi); oppure (b) l'ultimo antenato comune agli Anellidi e agli Artropodi non era segmentato, e quindi l'organizzazione segmentata si è evoluta separatamente nelle due linee evolutive.

Con questo dilemma arriviamo dritti dritti all'altro punto di partenza dal quale possiamo affrontare la questione, vale a dire allo studio dei meccanismi ontogenetici attraverso i quali si formano i segmenti negli Anellidi e negli Artropodi e, in particolare, dell'identità dei geni coinvolti nel processo, e nel modo in cui essi si esprimono. I dati fin qui raccolti in proposito sembrano escludere un'origine comune dei segmenti degli Artropodi e degli Anellidi. Va anche detto che all'interno degli Artropodi la produzione dei segmenti procede in modo abbastanza vario e spesso piuttosto diverso da quanto potrebbe suggerire *Drosophila*, troppo presto (e troppo spesso) assunta come organismo modello anche in riferimento a processi, come la produzione dei segmenti, in cui i Ditteri, e soprattutto i Ditteri Brachiceri, esemplificano invece una situazione molto derivata. Quanto è noto per *Drosophila* può essere comunque messo oggi a confronto con quanto è noto per altri Esapodi come *Schistocerca*, *Apis*, *Tribolium*, ma anche per Crostacei (*Artemia*), Chilopodi (*Lithobius*, *Strigamia*), Diplopodi (*Glomeris*) e Aracnidi (l'acaro *Archegozetes* e il ragno *Cupiennius*). Una bella sintesi sull'argomento è stata presentata da HUGHES & KAUFFMAN (2002).

A confronto con questo significativo insieme di studi su rappresentanti dei diversi cladi principali di Artropodi, le attuali conoscenze sulla genetica

dei processi che realizzano l'architettura segmentata degli Anellidi sono ancora piuttosto limitate. Una comparazione globale, tuttavia, mostra grosse difformità fra i due phyla, sia per quanto riguarda il complesso dei geni più direttamente coinvolti, sia per il fatto che negli Artropodi la suddivisione del corpo in segmenti riguarda primariamente l'ectoderma e i suoi derivati, mentre negli Anellidi il corrispondente processo riguarda in primo luogo il mesoderma (MINELLI & BORTOLETTO, 1988; HANNIBAL *et al.*, 2012). Non si può certo ignorare il ruolo che geni omologhi (ad esempio *engrailed*) hanno sia nella segmentazione degli Artropodi che in quella degli Anellidi, così come il fatto che il gene *Notch* risulta coinvolto nella formazione di nuovi segmenti sia negli Aracnidi (STOLLEWERK *et al.*, 2003) così come nei Vertebrati. Ritengo tuttavia che ciò non giustifichi la tesi di alcuni studiosi (ad esempio, DAMEN, 2007), secondo i quali basterebbero questi indizi per obbligarci a postulare l'esistenza di un antenato comune segmentato, non solo fra Anellidi e Artropodi, ma anche fra questi due phyla e i Vertebrati. In altre parole, un corpo segmentato sarebbe proprio una delle caratteristiche di Urbilateria, l'ipotetico antenato comune di tutti i Bilateri (es., KIMMEL, 1996; DE ROBERTIS, 1997; HOLLAND *et al.*, 1997; HOLLAND & HOLLAND, 1998; PALMEIRIM *et al.*, 1997; CHRIST *et al.*, 1998; BALAVOINE & ADOUTTE, 2003). Ma una simile ricostruzione non è mai risultata dall'applicazione dei rigorosi metodi comparativi della moderna filogenetica.

Nel sottolineare come una comune origine dei segmenti degli Artropodi e degli Anellidi (per non parlare dei Vertebrati) risulti oggi assai improbabile, sia per i risultati degli studi di genetica comparata dello sviluppo, sia per quanto emerge dalle ricostruzioni filogenetiche su base molecolare, è opportuno aggiungere che una serena rivisitazione della nozione di segmento, e una consapevolezza della pluralità di accezioni in cui il termine viene correntemente applicato nella descrizione o nell'interpretazione dell'architettura corporea degli Artropodi e di altri Metazoi, obbligano ad ammettere che la qualifica di segmentale potrebbe essere applicata, sia pure con le opportune qualificazioni, anche nel caso di phyla in cui alle strutture seriali riconoscibili lungo l'asse principale del corpo il termine di segmento è stato in genere negato (MINELLI & FUSCO, 2004). Alludo, per esempio, agli zoni dei Chinorinchi, ma anche alle strutture seriali di un mollusco come *Neopilina* e alle stesse proglottidi delle tenie, che pure non sono lontane, da un punto di vista organizzativo, dal rappresentare una catena di individui uniti tra loro, almeno in via temporanea.

SERIE DI SERIE

Il secondo problema (se, cioè, strutture seriali diverse di uno stesso animale si debbano sempre ritenere come aspetti diversi di un'unica serie di unità segmentali ripetute) ammette di sicuro una risposta negativa nel caso dell'anfiosso e dei Vertebrati, dove neuromeri e miomeri da un lato, e branchiomeri dall'altra, rappresentano due serie di per sé separate, che solo in via secondaria possono entrare in registro fra loro. Nel caso degli Artropodi parlano nella stessa direzione i risultati, già ricordati, delle recenti ricerche sui meccanismi con cui si realizzano le strutture seriali della metà dorsale e della metà ventrale di *Glomeris*, ed è del tutto probabile che una simile duplicità di serie sia riconoscibile negli altri miriapodi che presentano una discordanza fra scleriti tergali e unità pedifere.

La terza questione, infine, riguarda l'omologia seriale fra tutte le unità riconosciute come segmenti lungo l'asse principale del corpo di uno stesso animale. Nell'anfiosso, per esempio, le prime 5-6 paia di somiti si formano simultaneamente, mentre le successive vi si aggiungono sequenzialmente (CONKLIN, 1932). Nel caso dei Policheti, una vecchia tradizione (vedi ad es. IWANOFF, 1928) riconosceva in molti casi un primo gruppo di segmenti larvali anteriori, seguito da una lunga serie di segmenti postlarvali; una distinzione sostanzialmente negata da DOHLE (1979), ma forse troppo sbrigativamente. Nel caso degli Artropodi, vale la pena di considerare, quanto meno, la contrapposizione fra i pochissimi segmenti anteriori riconoscibili in un nauplius e quelli che si formeranno caudalmente ad essi nel corso dello sviluppo di tutti i crostacei che appunto come nauplius iniziano il loro sviluppo postembrionale (MINELLI, 2001). Una contrapposizione simile (se non addirittura esattamente sovrapponibile) si osserva nei Trilobiti, con i pochissimi segmenti anteriori che formavano il minuscolo protaspis, stadio giovanile paragonabile in certo senso al nauplius dei crostacei, e i segmenti che comparivano successivamente, attraverso i vari stadi di meraspis fino all'organizzazione definitiva dell'holaspis.

È ormai ben documentato che i meccanismi che forniscono una struttura segmentale alla parte anteriore del capo degli Insetti (il cosiddetto prosocephalon) sono fondamentalmente diversi dai processi che danno origine all'organizzazione segmentata della parte posteriore del capo, del torace e dell'addome (GROSSNIKLAUS *et al.*, 1994; VINCENT *et al.*, 1997; ROGERS & KAUFMAN, 1997; WIMMER *et al.*, 1997). Quindi, nella misura in cui una sovrapponibilità dei meccanismi di sviluppo che danno origine a due strutture può essere considerata come una ragione per considerare omologhe quest'ultime, i seg-

menti del prosocephalon non sarebbero omologhi a quelli del resto del corpo. La mancanza (cf. JÜRGENS & HARTENSTEIN, 1993, ROGERS & KAUFMAN, 1996, 1997, WIMMER *et al.*, 1997) in questa regione di qualsiasi espressione dei geni *pair-rule*, il cui ruolo nella segmentazione è stato ampiamente studiato in *Drosophila* e in altri artropodi, ha contribuito qualche tempo fa a suggerire l'opportunità di riconoscere, nell'organizzazione degli insetti, cinque tagmi, anziché i tre tradizionali, separando la metà anteriore del capo (prosocephalon) da quella posteriore (gnathocephalon), mentre - sempre sulla base dei pattern di espressione genica - converrebbe distinguere la parte anteriore dell'addome (i primi sette segmenti) come 'addome in senso stretto', in contrapposizione ad un post-addome (AKAM *et al.*, 1988).

STABILITÀ ED EVOLVABILITY DEL NUMERO SEGMENTALE

Nell'ambito degli Artropodi vi sono vasti cladi all'interno dei quali il numero di segmenti che formano il corpo è singolarmente fisso, accanto ad altri nei quali lo stesso numero varia anche fra specie assai vicine. A volte, questo numero appare conservato anche a dispetto di profonde differenze nella natura dei singoli segmenti e delle corrispondenti appendici, differenze a volte così profonde da mettere in discussione i limiti tradizionali fra le regioni (tagmata) del corpo. Pensiamo, ad esempio, ai numerosi casi in cui uno o più paia di appendici hanno assunto il significato di massillipedi, determinando un più o meno distinto passaggio del corrispondente segmento (o dei corrispondenti segmenti) da un tagma postcefalico al tagma cefalico.

In effetti, se il segmento che porta le zampe raptatorie delle mantidi o delle mantispe ha una sua complessiva identità toracica al pari di quello degli altri Dittiotteri o, rispettivamente, degli altri Planipenni, è però vero che il segmento che negli Isopodi porta un paio di massillipedi risulta largamente incorporato nel tagma cefalico piuttosto che nel più caudale pereon, e lo stesso vale per i Decapodi e per altri Malacostraci.

Anche a prescindere dalla specializzazione delle appendici, la maggiore stabilità della composizione segmentale del corpo dell'animale rispetto alla suddivisione in regioni del suo corpo è esemplificata anche dagli Omotteri Psilloidei, nei quali il confine fra capo e protorace risulta evanescente nelle ninfe, per comparire però nell'adulto.

Quanto agli Insetti nel loro complesso, dobbiamo prendere un po' le distanze dalla tradizione manualistica che assegna loro un pacchetto prefissato di 6 segmenti cefalici, 3 segmenti toracici e 11 seg-

menti addominali. Le ragioni più serie per una rivisitazione di questa nozione non risiedono tanto nelle sopra accennate incertezze circa il numero di segmenti riconoscibili nel capo (un numero che comunque è probabilmente costante in tutto il clade) o nell'esistenza di casi in cui viene in qualche modo messo in discussione il confine fra i tagmi, come nelle psille oppure negli Imenotteri Apocriti, con il loro propodeo in condizione di 'segmento toracico onorario', quanto nel fatto che il numero effettivo di segmenti addominali è assai diverso nei vari gruppi, a volte anche fra taxa filogeneticamente assai vicini e non di rado anche fra i due sessi della stessa specie. Di fronte a questa diversità, limitarsi a parlare di gradi diversi di fusione di alcuni dei segmenti originari non ci aiuta a formulare domande utili a proposito delle strade seguite dall'evoluzione morfologica dell'addome degli Insetti e, soprattutto, a riguardo delle modificazioni che hanno interessato i meccanismi con cui i segmenti vengono generati nel corso dello sviluppo. La questione è ulteriormente complicata dal fatto che in moltissimi Olometaboli il numero di segmenti addominali riconoscibili nell'adulto è inferiore a quello dei segmenti addominali presenti nella larva. Senza dimenticare la condizione, sostanzialmente opposta, dei Ditteri Blafariceridi, nei quali il corpo della larva è articolato in 'macrosegmenti' dei quali il primo corrisponde a capo più torace più primo segmento addominale e i successivi a porzioni, pressappoco bisegmentali, dell'addome.

La biologia evuzionistica dello sviluppo degli ultimi trent'anni ha fornito, come si è detto, molte informazioni utili alla comprensione dei meccanismi che generano l'organizzazione segmentata di un certo numero di Artropodi appartenenti a linee evolutive diverse (es., PATEL 1994; DAVIS & PATEL, 1999, 2002; PEEL, 2004; PEEL *et al.* 2005), ed ha anche iniziato a fornire informazioni importanti a proposito dell'evoluzione della tagmosi e, più in generale, della specificazione dell'identità dei singoli segmenti (vedi ad es. HUGHES & KAUFMAN, 2002; ERIKSSON *et al.*, 2010). Sappiamo ancora molto poco, invece, sui modi in cui interpretare in termini di modificazioni dei meccanismi di sviluppo sia la stabilità nel numero complessivo di segmenti corporei che si riscontra in alcuni cladi di Artropodi, sia i cambiamenti nel numero di segmenti che caratterizzano la storia evolutiva, sia antica che recente, degli altri cladi.

Ancora incerta, innanzitutto, è l'esistenza di un qualche grado di plasticità fenotipica, che consentirebbe variazioni nel numero di segmenti in dipendenza da fattori ambientali, a parità di genotipo. Modeste indicazioni in tal senso vengono da due recenti lavori sul chilopodo geofilomorfo *Strigamia maritima*, nel quale un aumento della temperatura

di incubazione da 10°C a 18°C determinerebbe un aumento medio nel numero di segmenti pari a 1,5 unità (VEDEL *et al.*, 2008, 2010).

A prescindere da questo caso, rimane il problema generale: come viene controllato geneticamente il numero di segmenti del corpo, e come è possibile modificare questo numero? Le nostre conoscenze sono ancora molto limitate, vi sono tuttavia elementi utili per iniziare ad affrontare il problema dell'evolubilità del numero dei segmenti negli Artropodi, vale a dire delle strade, per un cambiamento in questo carattere, che i meccanismi di sviluppo rendono più o meno probabili (HENDRIKSE *et al.*, 2007).

Per affrontare il problema è necessario, a mio avviso, partire da due premesse. In primo luogo, non c'è motivo di pensare che i cambiamenti evolutivi nel numero di segmenti siano sempre, necessariamente, il risultato di variazioni di un medesimo meccanismo, o di una medesima tappa dello sviluppo. In secondo luogo, non c'è motivo di credere che tali cambiamenti siano, o siano sempre, da attribuire alla diversa, modulabile attività di una regione proliferativa posteriore, subterminale. In concreto, mi limito qui ad accennare a due esempi di aumento nel numero di moduli segmentali.

Il primo esempio è fornito dal lungo vitino di vespa (peziolo) degli Imenotteri Sfecidi del genere *Ammophila*, che è formato in apparenza da due segmenti, ma un facile esercizio di anatomia comparata può ricondurre entrambe le unità al primo segmento libero (successivo al propodeo) dell'addome. Infatti, il 'segmento' anteriore del peziolo di *Ammophila* corrisponde alla metà sternale, richiusa dorsalmente, del segmento omologo degli altri Apocriti, mentre il 'segmento posteriore' corrisponde alla metà tergale, richiusa su se stessa ventralmente. In questo caso, uno scorrimento longitudinale della parte dorsale rispetto alla parte ventrale di un 'archetipico' segmento addominale ha creato, di fatto, un incremento nel numero delle unità segmentali (morfologiche e funzionali) che formano il corpo dell'animale.

Il secondo esempio riguarda i Chilopodi, un gruppo di Artropodi dal lungo corpo segmentato, per i quali è stato da tempo suggerito un meccanismo ontogenetico basato sulla precoce duplicazione, eventualmente ripetuta, di un piccolo numero di segmenti primari (MAYNARD SMITH, 1960; MINELLI & BORTOLETTO, 1988; MINELLI, 2000). Se questo modello è valido, ci si deve attendere che in questi Artropodi il numero complessivo dei segmenti del corpo debba variare in maniera discontinua e anche per 'salti', se il processo di raddoppio dei segmenti primari viene iterato una volta di più che nella forma d'origine, determinando una duplicazione (più o meno esatta) del numero dei segmenti. Ebbene, un incremento numerico di questa natura sembra essere

avvenuto in un genere sudamericano di Scolopendromorfi, all'interno del quale esiste una specie (*Scolopendropsis duplicata*) che può presentare 39 oppure 43 segmenti pediferi, mentre la specie più affine (*Scolopendropsis bahiensis*) ne presenta 21 oppure 23 (CHAGAS *et al.*, 2008). È da osservare che tutti gli Scolopendromorfi conosciuti all'infuori di *S. duplicata* presentano un numero di segmenti pediferi pari a 21 oppure a 23 e che il clamoroso incremento nel numero di segmenti che caratterizza questa specie non impedisce di riconoscere la sua stretta affinità con *S. bahiensis*, suggerendo una data alquanto recente per la loro separazione (MINELLI *et al.*, 2009).

#### BIBLIOGRAFIA

- AKAM M., DAWSON I., TEAR G., 1988 – *Homeotic genes and the control of segment diversity*. - Development, Suppl., 104: 123-134.
- BALAVOINE G., ADOUTTE A., 2003 – *The segmented Urbilateria: a testable scenario*. - Integr. Comp. Biol., 43: 137-147.
- BITSCH J., BITSCH C., 2010 – *The tritocerebrum and the clypeolabrum in mandibulate arthropods: segmental interpretations*. - Acta Zool (Stockholm), 91: 249-266.
- CARROLL S.B., GRENIER J.F., WEATHERBEE S.D., 2004 – *Dal DNA alla diversità – evoluzione molecolare del progetto corporeo animale*. Zanichelli, Bologna, 240 pp.
- CASTLE W.L., 1900 – *The metamerism of the Hirudinea*. - Proc. Am. Acad. Arts Sci. 35: 285-303.
- CHAGAS-JÚNIOR, A., EDGECOMBE, G.D., MINELLI, A. 2008 – *Variability in trunk segmentation in the centipede order Scolopendromorpha: a remarkable new species of Scolopendropsis Brandt (Chilopoda: Scolopendridae) from Brazil*. - Zootaxa, 1888: 36-46.
- CHRIST B., SCHMIDT C., HUANG R., WILTING J., 1998 – *Segmentation of the vertebrate body*. - Anat. Embryol., 197: 1-8.
- CONKLIN E.G., 1932 – *The embryology of the Amphioxus*. - J. Morphol., 54: 69-118.
- CUVIER G., 1816 – *Le règne animal distribué d'après son organisation, pour servir de base à l'histoire naturelle des animaux et d'introduction à l'anatomie comparée*. - Deterville, Paris, 4 voll.
- DAMEN W.G.M., 2007 – *Evolutionary conservation and divergence of the segmentation process in arthropods*. - Developmental Dynamics, 236: 1379-1391.
- DAVIS G.K., PATEL N.H., 1999 – *The origin and evolution of segmentation*. - Trends Genet., 15: 68-72.
- DAVIS G.K., PATEL N.H., 2002 – *Short, long and beyond: molecular and embryological approaches to insect segmentation*. - Annu. Rev. Entomol., 47: 669-699.
- DE ROBERTIS E.M., 1997 – *The ancestry of segmentation*. - Nature, 387: 25-26.
- DOHLE W., 1979 – *Vergleichende Entwicklungsgeschichte des Mesoderms bei Articulaten*. - Z. Zool. Syst. Evolutionsforsch., Beiheft 1: 120-140.
- ERIKSSON B.J., TAIT N.N., BUDD G.E., JANSSEN R., AKAM M., 2010 – *Head patterning and Hox gene expression in an onychophoran and its implications for the arthropod head problem*. - Dev. Genes Evol., 220: 117-122.
- GRATIOLET P., 1862 – *Recherches sur l'organisation du système vasculaire dans la sangue médicinale et l'aulastome vorace*. - Ann. Sci. Nat (Zool.), 17(4): 174-225.
- GROSSNIKLAS U., CADIGAN K.M., GEHRING W.J., 1994 – *Three maternal coordinate systems cooperate in the patterning of the Drosophila head*. - Development, 120: 3155-3171.
- HANNIBAL R.L., PRICE A.L., PATEL N.H., 2012 – *The functional relationship between ectodermal and mesodermal segmentation in the crustacean, Parhyale hawaiiensis*. - Dev. Biol., 361: 427-438.
- HEJNOL A., MARTINDALE M.Q., 2008 – *Acoel development indicates the independent evolution of the bilaterian mouth and anus*. - Nature, 456: 382-386.
- HENDRIKSE J.L., PARSONS T.E., HALLGRÍMSSON B., 2007 – *Evolvability as the proper focus of evolutionary developmental biology*. - Evol. Dev., 9: 393-401.
- HOLLAND L.Z., HOLLAND N.D., 1998 – *Developmental gene expression in amphioxus: new insights into the evolutionary origin of vertebrate brain regions, neural crest, and rostro-caudal segmentation*. - Am. Zool., 38: 647-658.
- HOLLAND L.Z., KENE M., WILLIAMS N.A., HOLLAND N.D., 1997 – *Sequence and embryonic expression of the amphioxus engrailed gene (AmphiEn): the metameric pattern of transcription resembles that of its segment-polarity homolog in Drosophila*. - Development, 124: 1723-1732.
- HUGHES C.L., KAUFMAN T.C., 2002 – *Hox genes and the evolution of the arthropod body plan*. Evol. Dev., 4: 459-499.
- IWANOFF P.P., 1928 – *Die Entwicklung der Larvalsegmente bei den Anneliden*. - Z. Morphol. Ökol. Tiere, 10: 62-161.
- JANSSEN R., PRPIC N.M., DAMEN W.G., 2004 – *Gene expression suggests decoupled dorsal and ventral segmentation in the millipede Glomeris marginata (Myriapoda: Diplopoda)*. - Dev. Biol., 268: 89-104.
- JÜRGENS G., HARTENSTEIN V. 1993 – *The terminal region of the body plan*. In: The Development of *Drosophila melanogaster*, vol. 1, ed. M. Bate & A. Martínez Arias, pp. 687-746. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- KIMMEL C.B., 1996 – *Was Urbilateria segmented?* - Trends Gen., 12: 329-331.
- KRELL F.-T., 1992 – *Verschmelzung von Antennomeren (Symphyocerie) als Regelfall bei Temnothynchus repandus Burmeister, 1847, sowie phylogenetische, taxonomische, faunistische und nomenklaturische Anmerkungen zu diversen Taxa dieser Gattung (Coleoptera. Scarabaeoidea, Melolonthidae, Dynastinae, Pentodontini)*. - Dtsch. Ent. Ztschr., 39: 295-367.
- LAWRENCE P.A., 1992 – *The making of a fly*. Blackwell, Oxford, XIII+228 pp.
- MAYNARD SMITH J., 1960 – *Continuous, quantized and modal variation*. - Proc. R. Soc. Lond., B, 152: 397-409.
- MINELLI A., 2000 – *Holomeric vs. meromeric segmentation: a tale of centipedes, leeches, and rhombomeres*. - Evol. Dev., 2: 35-48.
- MINELLI A., 2001 – *A three-phase model of arthropod segmentation*. - Dev. Genes Evol., 211: 509-521.
- MINELLI A., 2003 – *The development of animal form*. Cambridge University Press, Cambridge, XVIII+323 pp.
- MINELLI A., BORTOLETTO S., 1988 – *Myriapod metamerism and arthropod segmentation*. - Biol. J. Linn. Soc., 33: 323-343.
- MINELLI A., CHAGAS-JÚNIOR A., EDGECOMBE G.D., 2009 – *Saltational evolution of trunk segment number in centipedes*. - Evol. Dev., 11: 318-322.
- MINELLI A., FUSCO G., 2004 – *Evo-devo perspectives on segmentation: model organisms, and beyond*. - Trends Ecol. - Evol., 19: 423-429.
- MOORE J.P., 1898 – *A description of Microbdella biannulata with especial regard to the constitution of the leech somite*. - Proc. Acad. Nat. Sci. Philadelphia, 5: 50-73.
- MOORE J.P., 1900 – *Hirudinea and Oligochaeta collected in the Great Lakes region*. - Bull. Bur. Fish. 25: 153-172.

- NILSSON D., 1912 – *Beiträge zur Kenntniss des Nervensystems bei Polychaeten.* - Zool. Bijdr. Uppsala 1: 85-161.
- NÜSSLEIN-VOLHARD C., WIESCHAUS E., 1980 – *Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila.* - Nature, 287: 795-801.
- PALMEIRIM I., HENRIQUE D., ISH-HOROWICZ D., POURQUIÉ O., 1997 – *Avian hairy gene expression identifies a molecular clock linked to vertebrate segmentation and somitogenesis.* - Cell, 91: 639-648.
- PATEL N.H., 1994 – *The evolution of arthropod segmentation: insights from comparisons of gene expression patterns.* - Development, Suppl.: 201-207.
- PEEL A., 2004 – *The evolution of arthropod segmentation mechanisms.* - BioEssays, 26: 1108-1116.
- PEEL A.D., CHIPMAN A.D., AKAM M., 2005 – *Arthropod segmentation: beyond the Drosophila paradigm.* - Nature Rev. Gen., 6: 905-916.
- ROGERS B.T., KAUFMAN T.C., 1996 – *Structure of the insect head as revealed by the EN protein pattern in developing embryos.* - Development, 122: 3419-3432.
- ROGERS B.T., KAUFMAN T.C., 1997 – *Structure of the insect head in ontogeny and phylogeny: a view from Drosophila.* - Int. Rev. Cytol., 174: 1-84.
- SCHMIDT-OTT U., GONZALEZ-GAITAN M., JÄCKLE H., TECHNAU G.M., 1994 – *Number, identity, and sequence of the Drosophila head segments as revealed by neural elements and their deletion patterns in mutants.* - Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 91: 8363-8367.
- SCHMIDT-OTT U., GONZALEZ-GAITAN M., TECHNAU G.M., 1995 – *Analysis of neural elements in head-mutant Drosophila embryos suggests segmental origin of the optic lobes.* - Wilhelm Roux's Arch. Dev. Biol., 205: 31-44.
- SHANKLAND M., SAVAGE R.M., 1997 – *Annelids, the segmented worms.* In: Embryology. Constructing the organism. S.F. Gilbert & A.M. Raunio eds. Sinauer Ass., Sunderland, Ma., pp. 219-235.
- STOLLEWERK A., SCHOPPEMEIER M., DAMEN W.G.M., 2003 – *Involvement of Notch and Delta genes in spider segmentation.* - Nature, 423: 863-865.
- URBACH R., TECHNAU G.M., 2003 – *Segment polarity and DV patterning gene expression reveals segmental organization of the Drosophila brain.* Development, 130: 3607-3620.
- VEDEL V., APOSTOLOU Z., ARTHUR W., AKAM M., BRENA C., 2010 – *An early temperature-sensitive period for the plasticity of segment number in the centipede Strigamia maritima.* - Evol. Dev., 12: 347-352.
- VEDEL V., CHIPMAN A.D., AKAM M., ARTHUR W., 2008 – *Temperature dependent plasticity of segment number in an arthropod species: the centipede Strigamia maritima.* - Evol. Dev., 10: 487-492.
- VINCENT A., BLANKENSHIP J.T., WIESCHAUS E., 1997 – *Integration of the head and trunk segmentation systems controls cephalic furrow formation in Drosophila.* - Development, 124: 3747-3754.
- WHITMAN C.O., 1886 – *The leeches of Japan.* - Quart. J. Microsc. Sci., 26: 317-416.
- WHITMAN C.O., 1892 – *The metamerism of Clepsine.* In Festschrift zum 70. Geburtstag R. Leuckart's. - Engelmann, Leipzig, pp. 385-395.
- WIMMER E.A., COHEN S.M., JÄCKLE H., DESPLAN C., 1997 – *buttonhead does not contribute a combinatorial code proposed for Drosophila head development.* - Development, 124: 1509-1517.

## BIOLOGICAL AND MORPHOLOGICAL ADAPTATIONS IN THE PRE-IMAGINAL PHASES OF THE BEETLE FAMILY MELOIDAE

MARCO A. BOLOGNA (\*) - ANDREA DI GIULIO (\*)

(\*) *Dipartimento di Biologia Ambientale, Università Roma Tre, Viale G.Marconi 446, 00146 Roma, Italy; bologna@uniroma3.it*  
Lettura tenuta durante la Giornata culturale «Evoluzione ed adattamenti degli Artropodi – Contributi di base alla conoscenza degli insetti». Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 13 maggio 2011.

### *Biological and morphological adaptations in the pre-imaginal phases of the beetle family Meloidae*

The information on the diversified radiation in both morphology and biology, which occurred in the beetle family Meloidae (Coleoptera, Tenebrionoidea) at the pre-imaginal stage, is here synthetically reviewed and illustrated. During the past twenty years, the combination of an intensive research activity on larval morphology and biology, jointed to molecular phylogenetic studies, led to reconsider several previous phylogenetic hypotheses apparently stable. A new scenario on the evolutionary history of this remarkable beetle family is here presented and critically discussed.

KEY WORDS: Meloidae, hypermetaboly, larval morphology, larval biology, adaptive radiation, phylogeny

### INTRODUCTION

The Meloidae is a beetle family with about 120 genera and 3000 species, primarily distributed in temperate steppic and arid regions, and in subtropical and tropical savannas or other open habitats. These insects, commonly known as blister beetles and morphologically very heterogeneous (Fig. 1) are virtually cosmopolitan, absent only from New Zealand, Antarctica and most Polynesian islands. Adults are mostly diurnal and phytophagous, feeding on leaves and/or flower parts of several plant families.

Blister beetles are of particular interest because of their importance to applied science (biological control of grasshoppers, pharmacology, veterinary and agricultural problems) as well as their distinctive biology (hypermetamorphic development, parasitoid larval habits, defensive attributes, and diverse courtship behaviour). BOLOGNA (1991) published the most recent extensive review of meloid systematics, bionomics and biogeography. Two recent phylogenetic studies, based respectively on adult and larval morphology, and behaviour (BOLOGNA and PINTO, 2001: Fig. 2a), afterwards implemented by the addition of molecular evidences (BOLOGNA *et al.*, 2008a), slightly differ in considering four (Eleticinae; Nemognathinae; Tetraonycinae; Meloinae) or only three subfamilies greatly differenced (Eleticinae; Nemognathinae; Meloinae, including Tetraonycini). In the present review, we adopted the BOLOGNA *et al.* (2008a) classification (Fig. 2b).

Focusing on the pre-imaginal biology and morphology of the family, a pioneering contribution to the knowledge of the Meloidae biology is the gorgeous monograph made by BEAUREGARD (1890), which exhaustively treated the pharmacological, anatomical and biological characteristics of the family. Of particular significance are the extensive studies of larval biology and morphology made by Auguste Cros between 1910 and 1945, and those published by PAOLI (1932, 1937), while, after the second world war, some North American students widely improved our knowledge on larval morphology and biology of this beetle family, particularly focusing on the New World fauna (e.g. MAC SWAIN, 1956; SELANDER & WEDDLE, 1969; PINTO, 1991). Additional information on Old World taxa were published by Bologna and collaborators in several contributions (BOLOGNA, 2003; BOLOGNA and ALOSI, 1992, 1994; BOLOGNA and PINTO, 1992, 1995, 1998; PINTO and BOLOGNA, 1993; BOLOGNA and LAURENZI, 1995; BOLOGNA *et al.*, 2001; 2002; 2008b; BOLOGNA and DI GIULIO, 2002, 2003, 2006, 2008; DI GIULIO *et al.* 2002a, 2002b, 2003, 2005, 2010; TURCO *et al.*, 2006a, 2006b; DI GIULIO and BOLOGNA, 2007; SETTANNI *et al.*, 2009).

Aim of the present review is to synthesize critically the information on the diversified radiation in both morphology and biology, which occurred in this family at the pre-imaginal stage. Our knowledge on these topics has greatly improved



Fig. 1.

Morphological diversity of blister beetles. Eleticinae, Derideini: *Iselma flavipennis* (a); Nemognathinae, Nemognathini: *Zonitis immaculata* (b), *Zonitoschema* cfr. *coccinea* (c); Meloinae, Lyttini: *Lydtus sanguinipennis* (d), *Berberomeloe majalis* (e), *Lydomorphus thoracicus* (f); Meloinae, Mylabrini: *Hycleus polymorphus* (g); Meloinae, Epicautini: *Epicauta albovittata* (h); Meloinae, Meloini: *Meloe proscarabaeus* (i).

in the last twenty years, allowing at a new scenario surprisingly amending several previous hypotheses.

#### GENERAL INFORMATION ON PRE-IMAGINAL BIOLOGY OF MELOIDAE

In the subfamily Meloinae eggs are placed in the soil, while in the Tetraonycini and in Nemognathinae are laid under flowers, bracts, or in a few taxa (Horiini, some *Sitaris* Latreille, *Stenoria* Mulsant, *Allendesalazaria* Martinez de la Escalera) inside their host nests or under stones (*Tricrania* LeConte) (BOLOGNA 1991). The only studied species of the basal Eleticinae subfamily (*Eletica wahlbergi* Fahraeus), oviposits under barks by an ovipositor, which lacks in the most derived subfamilies (PINTO *et al.*, 1996), while in the southern African genus *Iselma* Haag-Rutenberg, oviposition on shrubby plants is suspected (BOLOGNA *et al.*, 2001).

No information is available on the larval food of the Eleticinae, but in the genus *Eletica* Dejean, it could consist of larvae of other insects occurring

under barks (PINTO *et al.*, 1996; BOLOGNA *et al.*, 2001). Most meloid larvae are predaceous: the Epicautini and most Mylabrini feed on grasshopper (Acridoidea) egg pods, the remaining tribes on the provisions and immature stages of various aculeate Hymenoptera, particularly wild bees (Apoidea) of different families. A few genera of Lyttini (*Australytta* Bologna) and Mylabrini (*Ceroctis* Marseul) attack other aculeate hymenopterans (Vespoidea and Sphecoidea, see BOLOGNA 1983, 1991 for a review), and larvae of few *Epicauta* Dejean are reported to feed on eggs of their own species or of other congeners (SELANDER 1981, 1982). Hypotheses about possible predation on Isoptera is discussed below.

In the typical form of meloid hypermetamorphosis, the larva passes through four distinct phases before entering the pupal stage. Development takes place in the bee nests, in the grasshopper egg-cases and in the soil, or in some Nemognathinae in wood. Each phase is characterized by a distinctive morphology and function: triungulin (T), first grub (FG), coarctate (C), and second grub (SG) (SELANDER & MATHIEU, 1964). The triungulin or

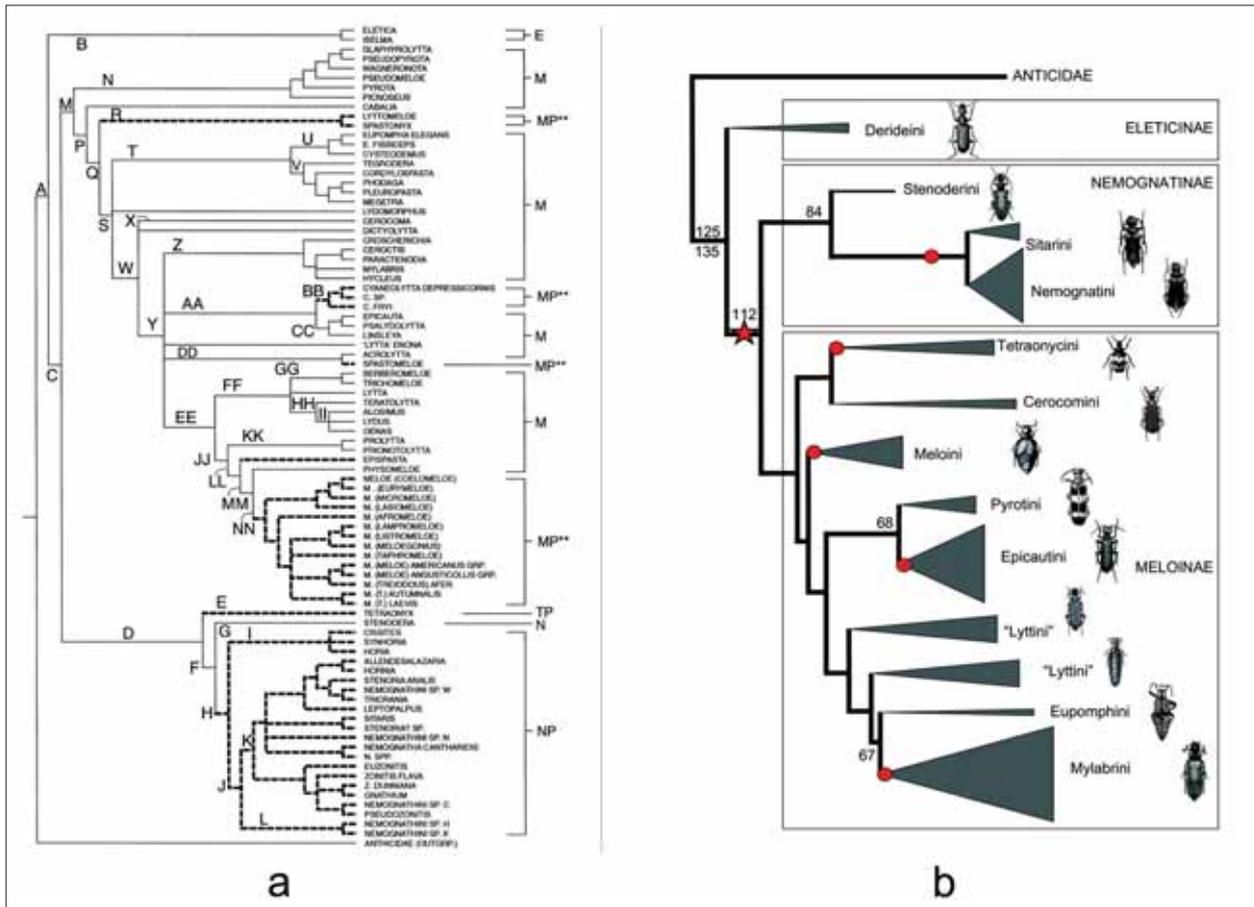


Fig. 2

(a) Cladogram from BOLOGNA and PINTO (2001), showing the repeated evolution of phoresy in Meloidae. Acronyms: E = Eleticinae, M = Meloinae, N = Nemognathinae, T = Tetraonycinae, P = phoretic genera. Phoretic lineages indicated by thickened dashed lines. (b) Classification of meloid subfamilies and tribes according to BOLOGNA *et al.* (2008).

first instar, is a campodeiform larva, well sclerotized and highly mobile, which represents the dispersing and host finding phase. The first instar larva of most Meloinae attains the food source directly, walking on the ground and looking for the host nest. Triungulins of Nemognathinae, Meloinae Tetraonycini, several Meloini and some Lyttini genera (*Meloe* Linnaeus, *Epispasta* Selander, *Lyttomeloe* Denier, *Spastomeloe* Selander, and *Spastonyx* Selander), attain the host nest by phoresy, attaching to the adult bees collecting pollen. Larval biology of the genus *Cyaneolytta* Péringuey is still unknown, but triungulins of several species of this genus are phoretic on large Coleoptera Carabidae (such as *Anthia* Weber, *Thermophilum* Basilewsky, *Cypholoba* Chaudoir), which are termitophilous, inducing the suspect of larval predation inside termite nests (BOLOGNA *et al.*, 1990; DI GIULIO *et al.*, 2003). The triungulin (T) attains the food source (honey, eggs, larvae of host) and feeds; afterwards it molts to the first grub (FG), a scarabaeiform larva, scarcely mobile, feeding on the host. After passing through four feeding

similar instars, FG typically molts to the coarctate phase (C) or hypnotheca, the inactive sixth instar, which is the most distinctive ontogenetic stage, characterized by a long diapause. The second grub (SG) follows the C and reverts to a phase similar to the FG but not feeding. This instar may prepare a pupal chamber or remains within the exuvia of the coarctate, as in *Meloe* and the Nemognathinae (CROS, 1940; SELANDER & WEDDLE, 1969). In most Nemognathinae instars VI–VII (FG) remain inside the cuticle of the previous feeding instars until metamorphosis. The pupal stage (P) is relatively short lived compared to the coarctate. Some variations on this scheme were described in the literature (SELANDER & WEDDLE, 1969; 1972)

#### NEW HYPOTHESES ON THE EVOLUTION OF LARVAL MORPHOLOGY AND BIOLOGY

Until fifteen years ago the hypermetamorphic larval development was considered a synapomorphic condition of the entire family Meloidae. In addition,

some relevant classifications (CROS, 1940, MACSWAIN, 1956; BOLOGNA, 1991), were based on the overestimation of the presence of phoretic triungulins in several taxa. The recent discovery of eleticine larvae (PINTO *et al.*, 1996; BOLOGNA *et al.*, 2001) greatly amended this scenario, some morphological studies re-evaluated the value of phoretic habits in the Meloinae tribes (BOLOGNA and PINTO, 2001: Fig. 2a), and molecular phylogenetic studies (BOLOGNA *et al.*, 2008) defined in a new way the relationships of several genera and tribes, in particular evidencing that Tetraonycini are neither a distinct subfamily nor a tribe of Nemognathinae,

but a specialized tribe of Meloinae. Molecular studies on the tribe Lyttini (BOLOGNA and PITZALIS, Unpublished), will incorporate in this tribe some genera, such as *Cyaneolytta* and *Spastonyx* Selander, which have been previously referred to Epicautini or Meloini respectively.

As discussed, Eleticinae are the basal group of Meloidae, according to both morphological (adult and larvae) and molecular evidences (PINTO *et al.*, 1996; BOLOGNA *et al.*, 2001; BOLOGNA *et al.*, 2008). First instar larvae are not typical triungulins, but are more similar to those of other Tenebrionoidea families (Fig. 3). Consequently hypermetaboly must be con-

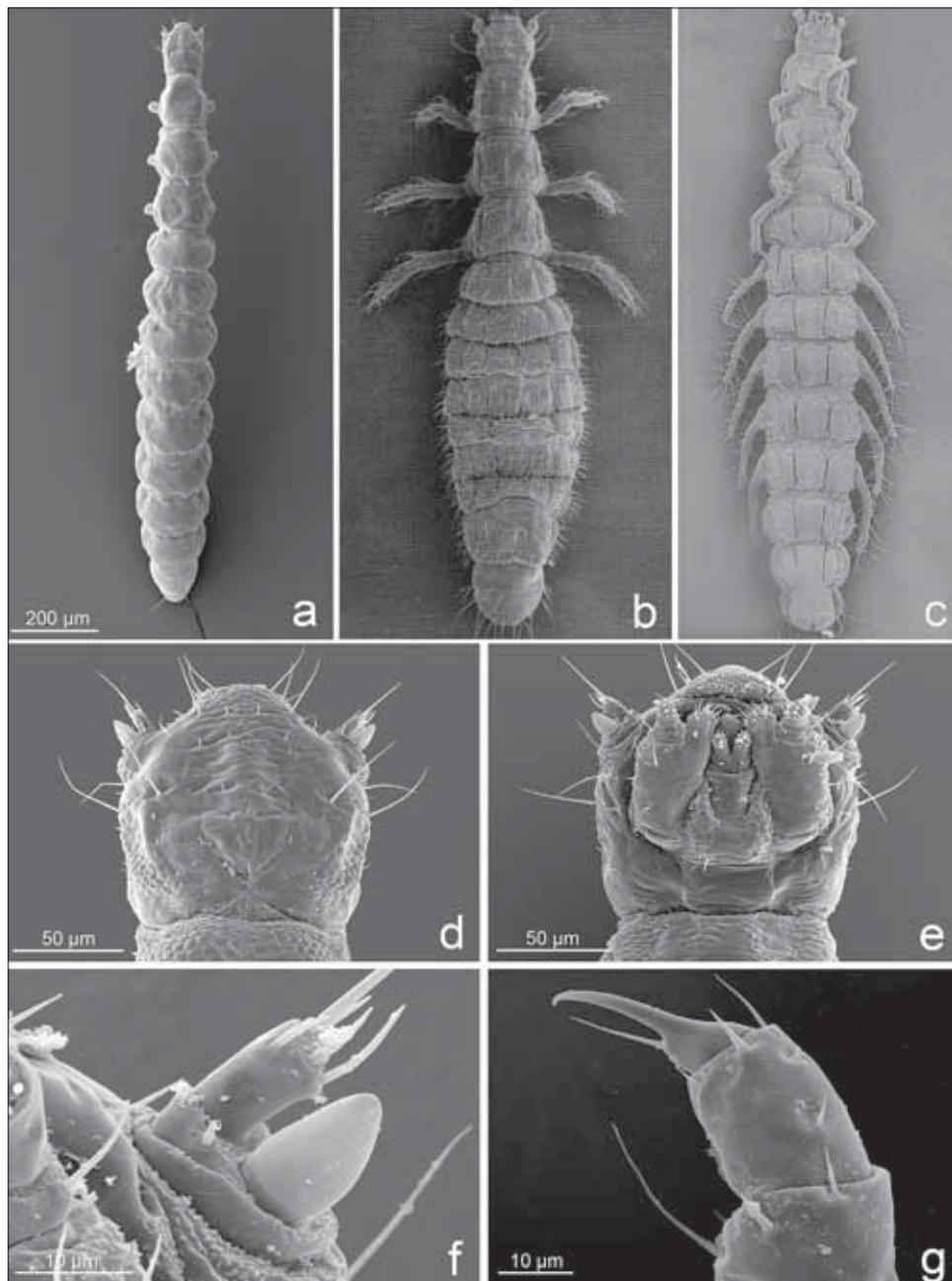


Fig. 3

First instar larvae of Eleticinae. *Iselma flavipennis*: (a) habitus, dorsal view; (d) head, dorsal view; (e) head, ventral view; (f) left antenna, ventral view; (g) right fore-leg, claw. *Eletica rubripennis*: (b) habitus, dorsal view. *Eletica wahlbergi*: (c) habitus, ventral view.

sidered a derived condition of Nemognathinae and Meloinae rather than a synapomorphy of the family. Interestingly, recent studies on the family Ripiphoridae (BOLOGNA and DI GIULIO, unpublished), evidenced a parallel situation with typical tenebrionoid primitive larvae in the two basal subfamilies, compared with the most derived subfamilies.

The evolution of parasitism and hypermetaboly supported a great radiation in larval morphology and biology. According to adult morphology, the Palearctic Nemognathinae tribe Stenoderini is the basal group of this subfamily. This basal position

is strongly supported by both molecular evidences and larval morphology (BOLOGNA *et al.*, 2002; BOLOGNA *et al.*, 2008): triungulins of the genus *Stenoderes* Eschscholtz seem to be non-phoretic and show some features similar to those of Meloinae (Fig. 4). The phoresy in all remaining three nemognathine tribes (Horiini, Nemognathini and unpublished new tribe), appears a derived condition in the subfamily. A gradient of specialization to phoretic habits and specialized parasitic biology is clearly recognizable in triungulins of these tribes (Fig. 5), especially as concerns the morphology of legs, mouthparts and abdom-

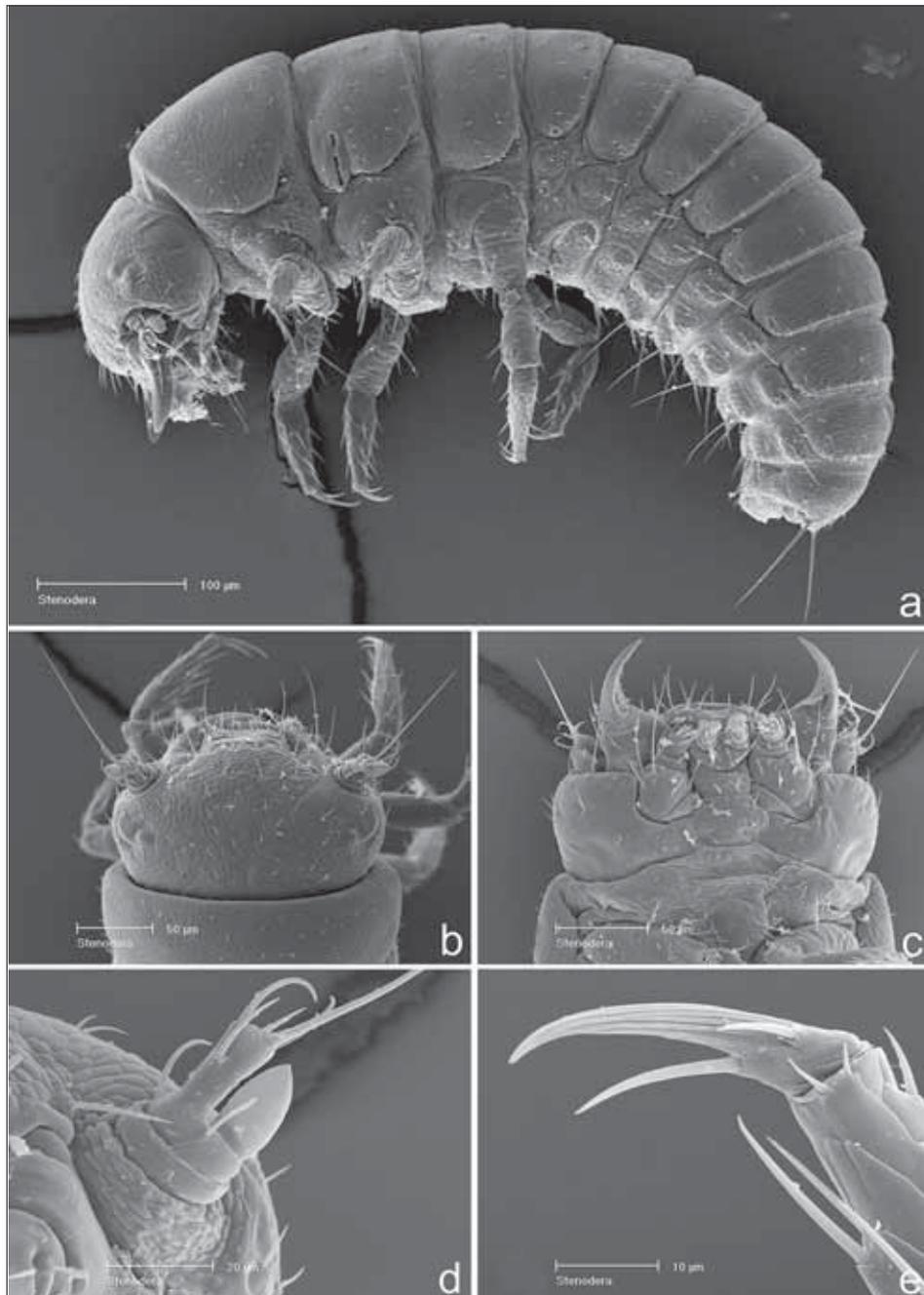


Fig. 4

First instar larvae of Nemognathinae Stenoderini. *Stenoderes puncticollis*: (a) habitus, left lateral view; (b) head, dorsal view; (c) head, ventral view; (d) left antenna, ventral view; (e) right fore-leg, claw.

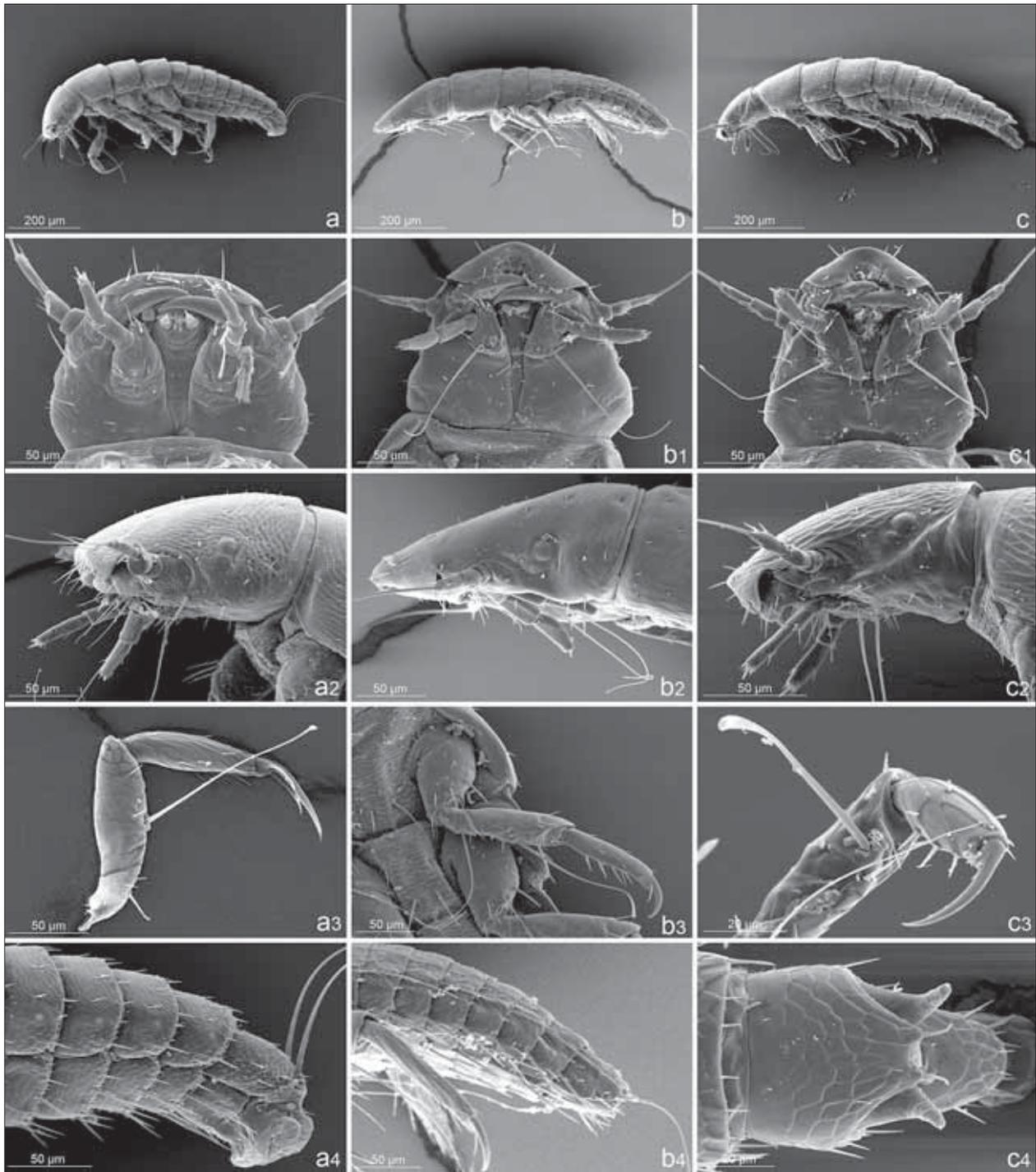


Fig. 5

First instar larvae of Nemognathinae. Unpublished new tribe: *Palaestra rufipennis* (a) habitus, left lateral view; (a1) head, ventral view; (a2) head, left lateral view; (a3) fore-leg, posterior view; (a4) apex of abdomen, left lateral view. Horiini: *Synboria testacea* (b) habitus, left lateral view; (b1) head, ventral view; (b2) head, left lateral view; (b3) fore-leg, anterior view; (b4) apex of abdomen, left lateral view. Nemognathini: *Euzonitis rubida* (c) habitus, left lateral view; (c1) head, ventral view; (c2) head, left lateral view; (c3) apex of fore-leg, posterior view; (c4) apex of abdomen, dorsal view.

inal spiracles. Some genera of Nemognathini, such as *Stenoria* Mulsant, show impressive adaptations to the phoresy, such as the evolution of a “trident” claw (claw and lateral modified setae), which totally parallels that of some *Meloe* (subgenera *Lampromeloe* Reitter, *Meloe* Linnaeus, *Treiodus* LeConte).

The evolutionary history of the most speciose and

branched subfamily Meloinae, probably is comparable to that of Nemognathinae, but with repeated and complex events of trophic and dispersal specializations. The basal condition can be considered that of a campodeiform, non-phoretic first instar larva, attaining the host nest by active movement. This plesiomorphic condition is widely spread in the

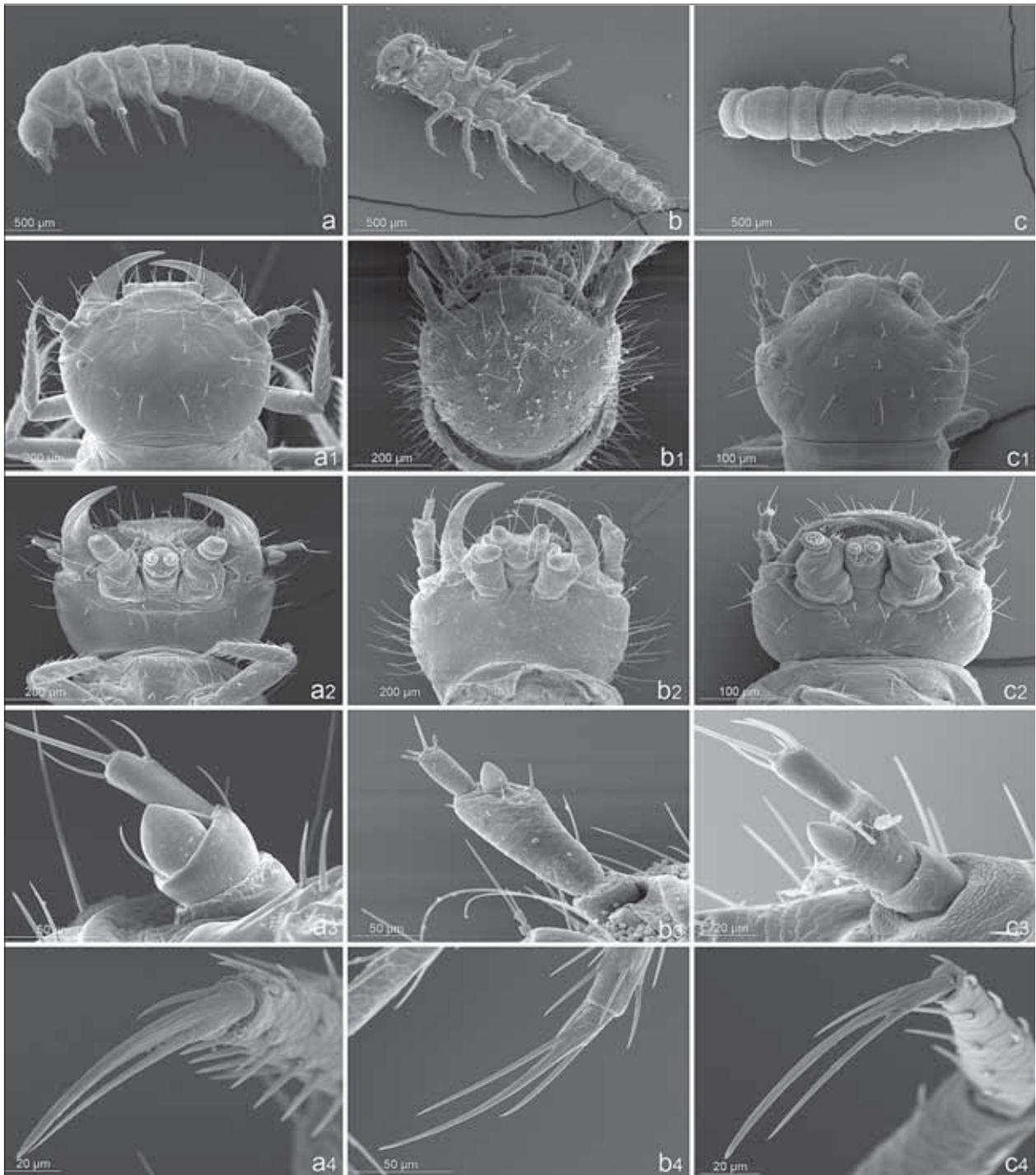


Fig. 6

First instar larvae of Meloinae. Lyttini: *Berberomeloe insignis* (a) habitus, left lateral view; (a1) head, dorsal view; (a2) head, ventral view; (a3) right antenna, ventral view; (a4) left mid-leg, claw. Mylabrini: *Actenodia chrysomelina* (b) habitus, ventral view; (b1) head, dorsal view; (b2) head, ventral view; (b3) left antenna, ventral view; (b4) fore-leg, claw. Cerocomini: *Diaphorocera chrysoprasis* (c) habitus, dorsal view; (c1) head, dorsal view; (c2) head, ventral view; (c3) left antenna, dorsal view; (c4) fore-leg, claw.

tribes Cerocomini, Lyttini (Fig. 6), Pyrotini and Eupomphini. Starting from this condition, several specializations can be evidenced, and the adaptation to phoresy apparently evolved separately at least five times in the subfamily. Among Lyttini, we recognized the extreme adaptation to phoresy on carabid beetles and the possible trophic specialization to feed

on termite eggs occurring in the genus *Cyaneolytta* (DI GIULIO *et al.*, 2003) but also the trophic adaptation to feed on Masaridae wasps by larvae of *Australytta* Bologna (BOLOGNA, 2003). In the tribe Mylabrini, almost all described species are predators on the Acridodea cocoons; probably this is a derived condition in the subfamily, but very few taxa, particu-

larly *Ceroctis*, mirror the plesiomorphic feeding habit, but feeding on Sphecidae rather than on Apoidea. In addition, according to the larval morphology, the genus *Croscherichia* Pardo Alcaide probably evolved the phoresy, still never confirmed. Another example of trophic novelty is represented by the tribe Epicautini, almost homogenously feedings on grasshopper's eggs.

Greatly diverging from the plesiomorphic condition, is the larval morphology and biology of the tribes Meloini (Fig. 7) and Tetraonycini (Fig. 8). The first includes only few genera of the New World, all parasites of Apoidea and extremely specialized to phoresy. In the past, the first instar larvae of Tetronycini represented an enigma: accord-

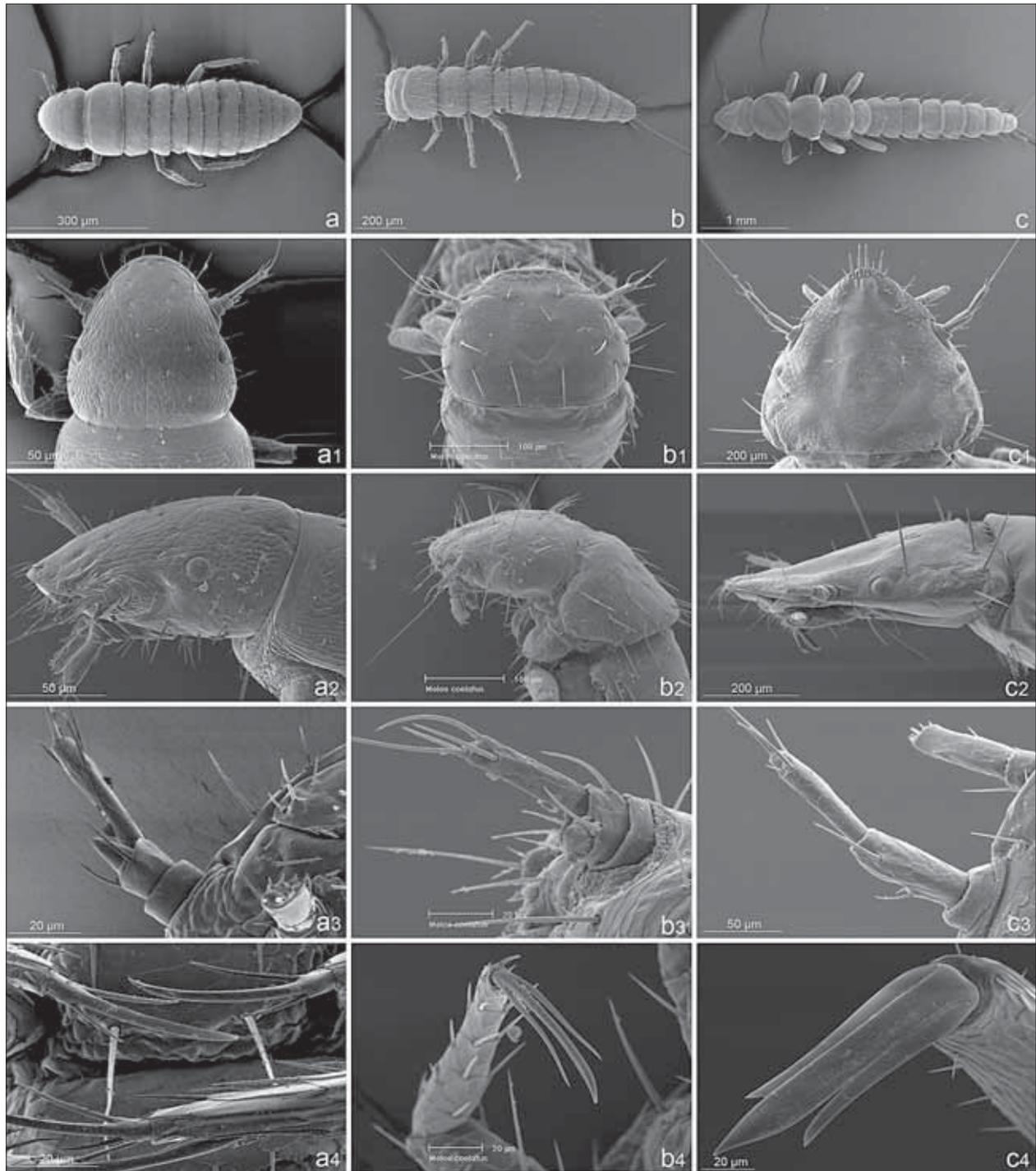


Fig. 7

First instar larvae of Meloinae. Meloini: *Meloe* (*Eurymeloe*) sp. (a) habitus, dorsal view; (a1) head, dorsal view; (a2) head, left lateral view; (a3) right antenna, ventral view; (a4) fore- and mid-legs, claws. *Meloe* (*Mesomeloe*) *coelatus*: (b) habitus, dorsal view; (b1) head, dorsal view; (b2) head, left lateral view; (b3) left antenna, dorsal view; (a4) fore-leg, claw. *Meloe* (*Lampromeloe*) *cavensis* (c) habitus, dorsal view; (c1) head, dorsal view; (b2) head, left lateral view; (b3) left antenna, dorsal view; (a4) fore-leg, claw.

ing to their morphology they were included in a distinct family or a subfamily of Meloidae (MACSWAIN, 1956), or considered as a derived tribe of Nemognathinae (SELANDER, 1991), and finally positioned as tribe of Meloinae according to adult morphology and molecular evidences (BOLOGNA *et al.*, 2008).

Finally, the tribe Meloini summarizes similar

events in its evolutionary history. The basal genus *Physomeloe* Reitter shows a non-phoretic tringulin, while the genus *Meloe* and others, such as *Epispasta* Selander (DI GIULIO *et al.*, 2005), have phoretic larva. In *Meloe* a progressive trend in specialization to phoresy is clearly recognizable from the basal subgenus *Eurymeloe* Reitter, through slightly derived subgenera such as *Taphromeloe* Reitter, to

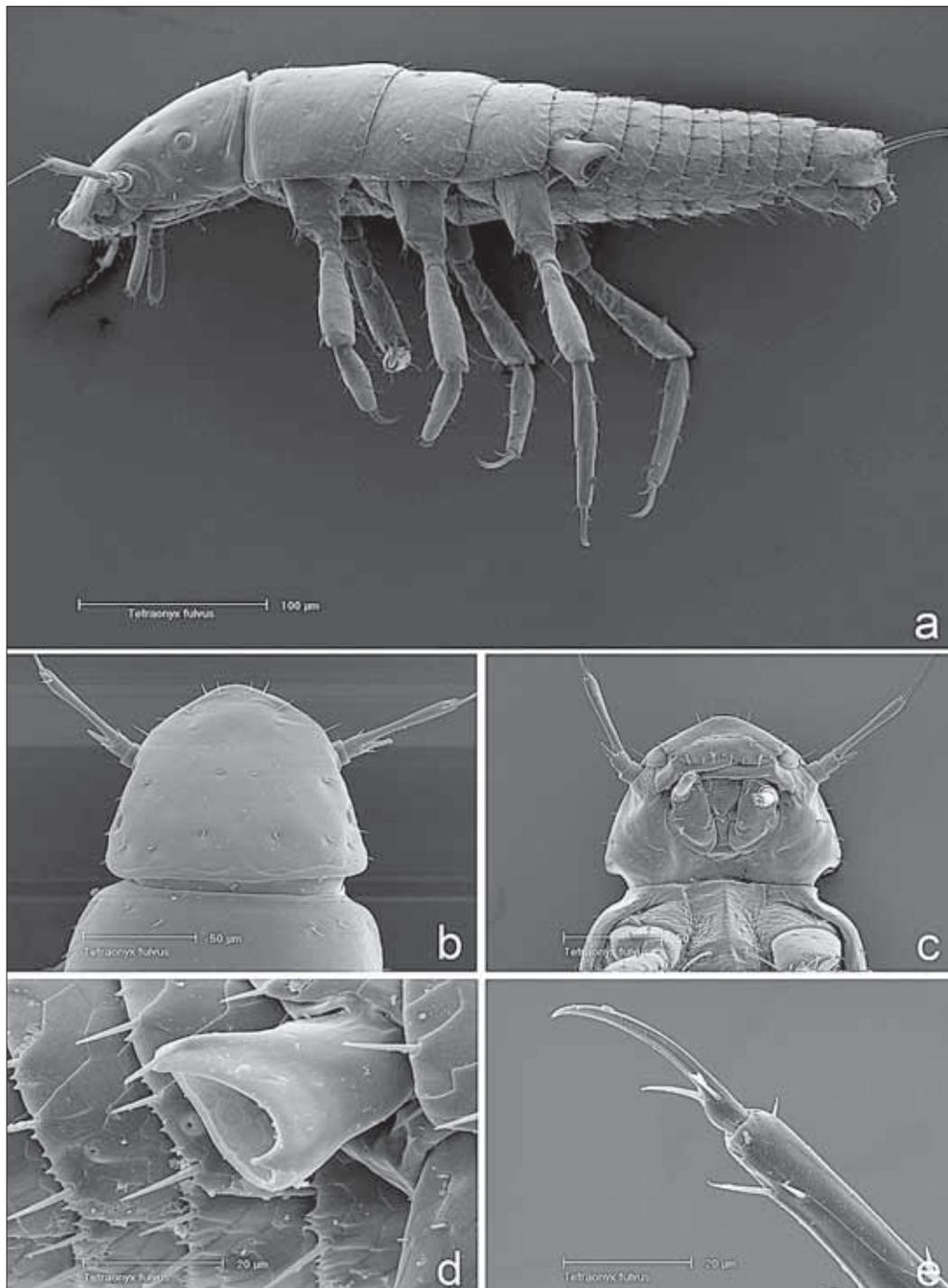


Fig. 8

First instar larvae of Tetraonycinae Tetraonycini. *Tetraonyx fulvus*: (a) habitus, left lateral view; (b) head, dorsal view; (c) head, ventral view; (d) right abdominal spiracle I; (e) right fore-leg, claw.

the extremely derived subgenera *Lampromeloe* and *Meloe* (BOLOGNA and PINTO, 1992, 1995, 1998; PINTO and BOLOGNA, 1993; BOLOGNA and ALOISI, 1994; DI GIULIO *et al.*, 2002a). Specializations concern primarily the shape of the head, with spini-form frontal setae in *Lampromeloe*, of the claws more or less trident-shaped (*Lampromeloe*, *Meloe*, *Treiodus*), of the abdominal spiracles (*Meloe-gonius*), and partially parallel the specializations evolved in all other phoretic groups, even if phylogenetically very distinct.

In conclusion the combination of an intensive research activity on larval morphology and biology, jointed to molecular phylogenetic studies led to consider a new scenario on the evolutionary history of this remarkable beetle family. However, the present knowledge is far to be complete, since many genera are still to be discovered or more deeply investigated.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

Many thanks to John D. Pinto, University of California at Riverside, and Federica Turco, Queensland Museum, Brisbane, for their continuous and long collaboration and their suggestions.

#### RIASSUNTO

##### ADATTAMENTI BIOLOGICI E MORFOLOGICI NEGLI STADI PREIMAGINALI DEI COLEOPTERA MELOIDAE

Viene proposta una nuova interpretazione filogenetica e adattativa della radiazione morfologica e biologica avvenuta negli stadi di sviluppo dei Coleoptera Meloidea (Tenebrionoidea). In questa famiglia è stato descritto da oltre due secoli il processo di sviluppo olometabolico, denominato ipermetabolismo o ipermetamorfosi, che include 7 distinte fasi, ed è strettamente legato a fenomeni di parassitismo verso altri insetti, con stadi larvali tra loro molto differenziati, sia da un punto di vista morfologico sia comportamentale e biologico. In particolare, caratteristico di questo gruppo di insetti, è lo stadio quiescente di pseudopupa, ma molto rilievo è sempre stato dato in letteratura alla specializzazione alla foresia su Apoidea, vettori che spesso sono anche ospiti, del primo stadio larvale denominato triungolino. La convergenza in alcune forme e fasi nello sviluppo ha indotto ad erronee interpretazioni di relazioni filogenetiche dei Meloidea con i Coleoptera Ripiphoridae, ma anche con gli Strepsiptera. Le indagini personalmente condotte negli ultimi 20 anni, sia sulla filogenesi (con tecniche morfologiche e molecolari) sia sulla morfo-ecologia larvale, hanno portato ad una rilettura del tutto nuova della biologia preimaginale di questi insetti. In primo luogo è stato scoperto che la sottofamiglia basale delle Eleticinae non presenta adattamenti larvali al parassitismo, ma probabilmente solo a predazione su altri insetti subcorticicoli o endofiti. A questa condizione plesiomorfa di può far seguire una radiazione di adattamenti al paras-

sitismo molto variegati, perlopiù su Apoidea, ma anche Acridoidea e forse Isoptera. Nella sottofamiglia delle Nemognathinae, a parte forse la tribù basale degli Stenoderini, di cui si conoscono le larve primarie, ma non la biologia, tutte le altre tribù presentano larve di I stadio fortemente adattate alla foresia e al parassitismo nei confronti di Apoidea. Nella sottofamiglia delle Meloinae, la foresia della larva di I stadio appare il risultato di distinti e ripetuti processi adattativi, evolutisi in almeno 6 distinte linee filogenetiche di differenti tribù. Proprio in questa famiglia è molto più variegata la morfologia del I stadio, ma anche la biologia larvale e la tipologia di ospiti.

#### REFERENCES

- BEAUREGARD H., 1890 - *Les insectes vesicants*. Félix Alcan, Paris, XVI + 544 pp., 34 pls.
- BOLOGNA M.A., 1983 - *Utilizzazione dei dati biologici nella sistematica dei Meloidea (Coleoptera)*. - Atti XII Congr. naz. Entomol., Roma 1980, 2: 21-36.
- BOLOGNA M.A., 1991 - *Coleoptera Meloidea*. - Fauna d'Italia. XXVIII. Calderini, Bologna, XIV+541 pp.
- BOLOGNA M.A., 2003 - *Australytta, a new blister beetle genus from Southern Africa (Coleoptera: Meloidea)*. - Ann. Soc. Entomol. France, 39: 139-152.
- BOLOGNA M.A., ALOISI G., 1992 - *Systematics of Lydomorphus Fairmaire 1882, with a description of the first instar larva of L. dusaulti (Coleoptera Meloidea)*. - Trop. Zool., 5: 55-71.
- BOLOGNA M.A., ALOISI G., 1994 - *Systematics and bionomics of Physomeloe Reitter, with description of the first instar larva (Coleoptera Meloidea)*. - EOS, Rev. Españ. Entomol., 69: 45-56.
- BOLOGNA M.A., DI GIULIO A., 2002 - *Review of the Southern African genus Prolytta Kaszab, with a description of the first instar larva, and bionomic and taxonomic remarks (Coleoptera, Meloidea)*. - Invert. System., 16: 177-194.
- BOLOGNA M.A., DI GIULIO A. 2003 - *Eggs and first instar larval morphology of Prionotolytta binotata (Péringuey, 1888), an endemic southern African species (Coleoptera, Meloidea)*. - Afr Entomol., 11: 199-203.
- BOLOGNA M.A., DI GIULIO A., 2006 - *Revision of the genus Teratolytta (Coleoptera: Meloidea)*. - Eur. J. Entomol., 103: 137-161.
- BOLOGNA M.A., DI GIULIO A., 2008 - *Revision of the genus Trichomeloe Reitter, with the description of new species and first instar larvae (Coleoptera: Meloidea)*. - Contrib. Zool., 77: 227-248.
- BOLOGNA M.A., LAURENZI M., 1994 - *Descriptions of the triungulins of Synhoria testacea (Fabricius) and of another undetermined African species (Coleoptera: Meloidea) with data on Horiini larvae*. - Afr. Entomol, 2: 155-162.
- BOLOGNA M.A., PINTO J.D., 1992 - *A review of Meloe (Taphromeloe), including a description of the first instar larva of M.(T.) erythrocnemus and comments on the classification of the tribe Meloini (Coleoptera: Meloidea)*. - Proc. Entomol. Soc. Washington, 94: 299-308.
- BOLOGNA M.A., PINTO J.D., 1995 - *The triungulin of two Palaearctic Meloe subgenera: Lasiomeloe Reitter and Micromeloe Reitter (Coleoptera, Meloidea), with bionomic and taxonomic notes*. - Boll. Zool., 62: 383-393.
- BOLOGNA M.A., PINTO J.D., 1998 - *A review of the Afrotropical species of Meloe (Coleoptera, Meloidea) with description of first instar larvae, a key to species and an annotated catalogue*. - Trop. Zool., 11: 19-59.
- BOLOGNA M.A., PINTO J.D., 2001 - *Phylogenetic studies of*

- the Meloidae (Coleoptera), with emphasis on the evolution of phoresy.* - Syst. Entomol., 26: 33-72.
- BOLOGNA M.A., ALOISI G., VIGNA TAGLIANTI A., 1990 – *Phoretic association of some African Cyaneolytta with Carabids, and morphology of first instar larvae in Meloini (Coleoptera, Meloidae).* - Trop. Zool., 3: 159-180.
- BOLOGNA M.A., DI GIULIO A. PINTO J.D., 2002 – *Review of the genus Stenoderia with a description of its first instar larva (Coleoptera: Meloidae).* - Europ. Journal of Entomology, 99: 299-313
- BOLOGNA M.A., DI GIULIO A., PITZALIS M., 2008b – *Systematics and biogeography of the genus Actenodia (Coleoptera: Meloidae: Mylabrini).* - Syst. Entomol., 33: 319-360.
- BOLOGNA M.A., FATTORINI S., PINTO J.D., 2001 – *Review of the primitive blister beetle genus Iselma with description of the first instar larva (Coleoptera: Tenebrionoidea: Meloidae).* - Afr. Entomol., 9: 105-129.
- BOLOGNA M.A., OLIVERIO M., PITZALIS M., MARIOTTINI P., 2008a – *Phylogeny and evolutionary history of the blister beetles (Coleoptera, Meloidae).* - Mol. Phyl. Evol., 48: 679-693.
- CROS A., 1940 – *Essai de classification des Meloides algériens.* - VI Congr. Intern. Entomol Madrid, 1935: 312-338.
- DI GIULIO A., BOLOGNA M.A., 2007 – *Description of the first instar larva of Euzonitis rubida with remarks on the systematics of the subfamily Nemognathinae (Coleoptera: Meloidae).* - Entomol. Fenn., 18: 102-109.
- DI GIULIO A., ABERLENC H.P., VIGNA TAGLIANTI A., BOLOGNA M.A., 2003 – *Definition and description of larval types of Cyaneolytta (Coleoptera Meloidae) and new records on their phoretic association with Carabidae (Coleoptera).* - Trop. Zool, 16: 165-187.
- DI GIULIO A., BOLOGNA M.A., PINTO J.D. 2002a – *Larval morphology of Meloe of the subgenus Mesomeloe: inferences on its phylogenetic position and a first instar larval key to the Meloe subgenera (Coleoptera: Meloidae).* - Ital. J. Zool., 69: 339-344.
- DI GIULIO A., PINTO J. D., BOLOGNA M. A., 2005 - *Larval morphology of the Neotropical genus Epispaeta (Coleoptera, Meloidae).* Canad. Entomol., 137: 657-671.
- DI GIULIO A., PINTO J.D., BOLOGNA M.A., 2010 – *Comparative morphology of first instar larvae of Meloidae (Coleoptera, Tenebrionoidea) from Australia.* - Acta Entomol. Mus. Nat. Prague, 50: 335-336.
- DI GIULIO A., TURCO F., BOLOGNA M.A., 2002b - *Larval morphology of the genus Cerocoma and phylogenetic implications (Coleoptera, Meloidae).* - Entomol. Fenn., 13: 105-112.
- MACSWAIN J. W., 1956 - *A classification of the first instar larvae of the Meloidae (Coleoptera),* Univ. California Publ. Entomol., 12: i-iv, 1-182.
- PINTO J. D., 1991 – *The taxonomy of North American Epicauta (Coleoptera: Meloidae), with a revision of the nominate subgenus and a survey of courtship behaviour.* - Univ. California Publ. Entomol., 110: i-ix, 1-372, 40 pls.
- PINTO J.D., BOLOGNA M.A., 1993 – *The first instar larvae of Meloe afer and M. occultus, with a clarification of antennal structure in larval Meloe (Coleoptera: Meloidae).* - Coleopt. Bull., 47: 340-348.
- PINTO J.D., BOLOGNA M.A., BOUSEMAN J.K., 1996 – *First-instar larvae, courtship and oviposition in Eleticca: amending the definition of the Meloidae (Coleoptera: Tenebrionoidea).* - Syst. Entomol., 21: 63-74.
- PAOLI G., 1932 – *Osservazioni sulla biologia del Dociostaurus maroccanus Thnb. in Italia nelle fasi gregarie e solitarie e sull'azione di alcuni Insetti parassiti.* - Nuovi Ann. Agric., 12: 627-639.
- PAOLI G., 1937 – *Studi sulle cavallette di Foggia (Dociostaurus maroccanus Thnb.) e sui loro oofagi (Ditteri-Bombiliidi e Coleotteri Meloidi) ed acari ectofagi (Eritreidi e Trombididi).* - Redia, 23: 27-202, 3 pls.
- SELANDER R.B., 1981 – *Evidence of a third type of larval prey in blister beetles (Coleoptera: Meloidae).* - J. Kansas Entomol. Soc., 54: 757-783.
- SELANDER, R.B., 1982 – *Further studies of predation on meloid egg by meloid larvae (Coleoptera),* - J. Kansas Entomol. Soc., 55: 427-441.
- SELANDER, R.B., WEDDLE R.C., 1969 – *The ontogeny of blister beetles (Coleoptera, Meloidae). II. The effects of age of triungulin larvae at feeding and temperature on development.* In: Epicauta segmenta. - Ann. Entomol. Soc. Am., 62: 27-39.
- SELANDER, R.B., WEDDLE R.C., 1972 – *The ontogeny of blister beetles (Coleoptera, Meloidae). III. Diapause termination in coarctate larvae of Epicauta segmenta.* - Ann. Entomol. Soc. Am., 65: 1-17.
- SETTANNI C., DI GIULIO A., FINOIA M.G., BOLOGNA M.A., 2009 – *Intra- and interspecific analysis of first instar larval morphology in the blister beetle genus Berberomeloe Bologna 1989 (Coleoptera: Meloidae).* - Zootaxa, 2089: 52-64.
- TURCO F., DI GIULIO A., BOLOGNA M.A. 2006a - *First-instar larval morphology in the subtribe Lydina (Coleoptera, Meloidae, Lyttini), with discussion on its systematic value.* - Deutsche Entomol. Zeits., 53: 213-222.
- TURCO F., DI GIULIO A., BOLOGNA M.A. 2006b – *The first larval description in the genus Diaphorocera (Coleoptera: Meloidae: Cerocomini): D. chrysopras Fairmaire.* - Zootaxa, 1295: 29-39.



## CEPHALIC STRUCTURES AND SPECIAL FEEDING HABITS IN LARVAE OF CECIDOMYIIDAE (INSECTA, DIPTERA): BIODIVERSITY, EVOLUTION AND ECOLOGY IN ACTION

MARIO SOLINAS (\*)

(\*) *Department of Agricultural and Environmental Sciences, Entomology, Perugia - University Borgo XX Giugno, 06122 Perugia, Italy.*  
msolinas\_35@libero.it

Lettura tenuta durante la Giornata culturale «Evoluzione ed adattamenti degli Artropodi – Contributi di base alla conoscenza degli insetti». Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 13 maggio 2011.

### *Cephalic structures and special feeding habits in larvae of Cecidomyiidae (Insecta, Diptera): biodiversity, evolution and ecology in action*

The head of larvae of Cecidomyiidae is very small, characteristically shaped, lacking eyes or ocelli, and apparently adapted mainly to perform functions such as searching for nearby food and ingesting it. The general head structure as well as the main cephalic cuticular structures such as the *hypostomal bridge*, *genal reinforcements*, *postocciput*, and especially *mandibles*, have been investigated comparatively in larvae of nine species of Cecidomyiinae grouped in three ecological categories, regardless of phylogenetic affinities, namely: **Phytophagous** (herbivores: insect pests, biological control agents on plants): *Monarthropalpus flavus* (Schrank), *Neolasioptera martelli* Nijveldt, *Fabomyia medicaginis* (Rübsaamen), **Mycophagous** (biological control agents on pathogenic fungi): *Mycodiplosis erysiphe* Rübsaamen, *M. tremulae* Kieffer, *Lasioptera berlesiana* Paoli, and **Zoophagous** (biological control agents on herbivores): *Aphidoletes aphidimyza* (Rondani), *Dicrodiplosis pseudococci* (Felt), *Feltiella acarisuga* (Vallot). All of these species show the above mentioned cephalic structures peculiarly fitting (adapted to) food characteristics and feeding habits of the species concerned. These cases are discussed as manifestations of functional biodiversity, adaptive and convergent evolution, and evolutionary ecology.

KEY WORDS: Comparative functional morphology, convergent adaptive evolution, evolutionary ecology.

### INTRODUCTION

The head of larvae of Cecidomyiidae is normally very small (Fig 1, H), characteristically shaped, lacking eyes or ocelli, and apparently adapted mainly to perform functions such as searching for nearby food and ingesting it. At rest, the head is completely retracted into an anterior distinct portion of the prothorax (Fig. 1, PR), within which the brain and the suboesophageal ganglion are located. The head capsule (Fig. 2) contains: a relatively large *tentorium* (T), supporting a conspicuous ingesting pharyngeal pump (PH), a relatively large hypopharyngeal salivary pump (Hp), two joint sockets for the two mandibles' mesad joint; a pair of well developed mandibles medially articulated, as just mentioned, on the anterior tentorial arms (Fig. 3); the muscles moving the mouth parts as well as the conspicuous dilators of the pumps; and obviously the cephalic terminations of the sensory nervous system.

In order to enable the mouth parts and the pumps to function properly, the head walls bear some strategically hardened areas which, together with the head capsule endoskeleton, give the head its required rigidity and strength (SOLINAS, 1968).

Larvae of most (probably all) Cecidomyiidae have a sucking mouth-type by which they ingest plant or animal juices. Depending on the nature of the food source and the mode of attack by the larvae to obtain liquid nutrient (i.e. through cutting plant tissue, or lapping sap from gall walls, or piercing rust-spores or mildew-conidia or the skin of an arthropod, etc.), the head must undergo two main kinds of stresses: (a) uniaxial-longitudinal-bending stresses, and (b) longitudinal-compressive stresses. Thus, depending on the intensity of those stresses, the head walls are adequately strengthened in particular by the development and hardening (sclerotization) of: a *hypostomal bridge* (Figs. 4-12, Hb), *genal reinforcements* (Gr), and *postocciput* (P).

But the most important structures involved in taking food are, obviously, the mouth parts, and especially the mandibles. The labrum, maxillae and labium are always fleshy and they function as a sucking cup; while the mandibles are always hardened and well developed, and each one consists (Figs. 2-12, MD) of a main body, rather flat laterally, on which arise: two joint-processes (a mesad, morphologically anterior, condyle, CO; and a lateral one, rather irregular in shape, Ljp), and three lobes (a frontal or

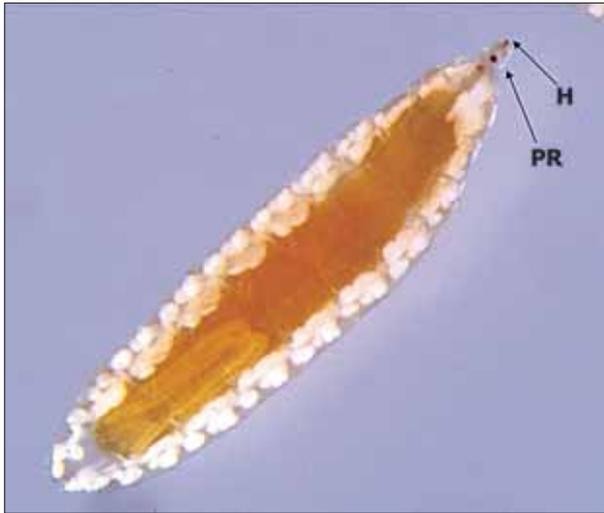


Fig. 1  
Mature larva of *Aphidoletes aphidimyza* Rondani. Fresh whole mount: H, head; PR, prothorax anterior distinct portion.

incisive lobe, IN; a dorsal lobe and a ventral lobe, which bear the tendons of the protractor/elevator and the retractor/depressor muscles respectively). The mandibles articulate by their condyle to the anterior tentorial arms (paraclypeal phragmata) forming a horse-shoe-shaped apodeme (Fig 3, T), and by the lateral joint-process (Ljp) to a pleurostomal reinforcement ("pleurostomal apodeme") so that each of the mandibles lies and moves (turning on the condyle) each one in a nearly sagittal

plane so that the incisive lobe is moved up and down (i.e., forward and backward) by muscles attached to the *postocciput* (SOLINAS, l.c.).

In relation to the feeding behaviour, the general head structure as well as the main cephalic cuticular structures such as the *hypostomal bridge* (Hb), *genal reinforcements* (Gr), *postocciput* (P), and especially *mandibles* (MD), have been investigated comparatively in larvae of nine species of the sub-family Cecidomyiinae grouped into three ecological categories, irrespective of their phylogenetic relationships and taxonomic assignments to genus, tribe, or even supertribe. These are: Phytophagous species (herbivores, potential insect pests, and biological control agents of plants), namely *Monarthropalpus flavus* (Schrank), *Neolasioptera martelli* Nijveldt, *Fabomyia medicaginis* (Rübsaamen), Mycophagous species (biological control agents of pathogenic fungi): *Mycodiplosis erysiphes* (Rübsaamen), *M. tremulae* Kieffer, *Lasioptera berlesiana* Paoli, and Zoophagous species (biological control agents of herbivores): *Aphidoletes aphidimyza* (Rondani), *Dicrodiplosis pseudococci* Felt, *Feltiella acarisuga* (Vallot).

This is a new version of an older paper of mine written in Italian and lacking Figures (SOLINAS, 1969) whose main results were presented at the XVII International Congress of Entomology (HAMBURG, 1984). My intention now is to reinterpret the results as case studies of functional biodiversity,

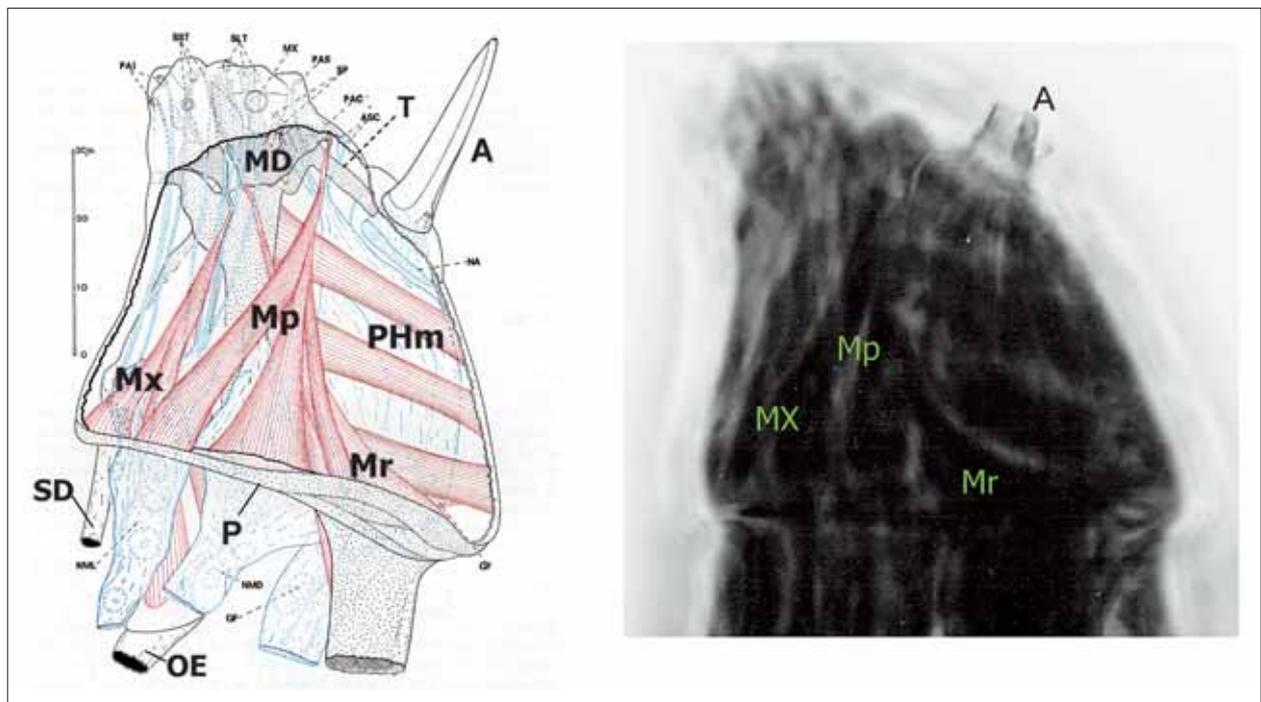


Fig. 2  
Head of mature larva of *Aphidoletes aphidimyza*. (Left, from Solinas 1968, modified) Camera lucida diagram cut open to display internal organs: MD, mandibles; Mp, mandibular protractor/elevator muscles; Mr, mandibular retractor/depressor muscles; Mx, maxillary muscles; OE oesophagus; PHm, pharyngeal dilator muscles; SD, salivary duct; T, tentorium. And Phase-contrast micrograph of same subject.

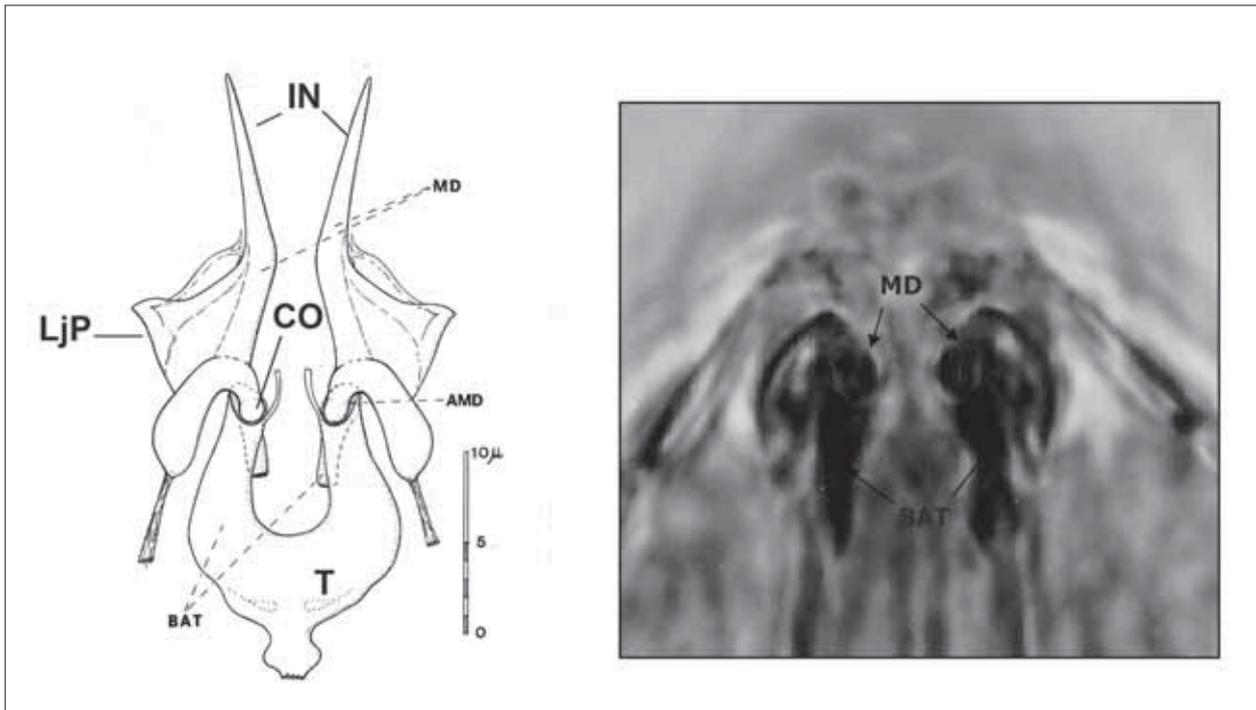


Fig. 3

(Left, from Solinas 1968, modified) Camera lucida diagram of mandibles naturally articulated on tentorium anterior arms from *Aphidoletes aphidimyza* mature larva: BAT, tentorium anterior arms; CO, mandibular condyle; LjP, lateral joint process; MD, mandibles; T, tentorium. And Phase-contrast micrograph of same subject.

convergent adaptive evolution, and/or evolutionary ecology, and at the same time and through the same subjects, wishing to make a modest contribution to a deeper understanding of the basic assertion of Edward O. Wilson in his opening lecture at the XX ICE (Firenze, 1996): «*Insect diversity is one of the most important but least understood phenomena in science today. It has profound implications for our understanding of evolution and ecology*».

#### DESCRIPTIONS

The main cephalic structures that appear to be modified as a result of adaptation to different categories of food source and related feeding behaviours are:

- a) hypostomal bridge (Hb in Figs);
- b) genal reinforcements (Gr);
- c) postocciput (P);
- d) mandibles (MD).

Obvious morphological variations have been observed also in other features such as the relative size and general shape of the head (Figs 4-12), antennal dimensions, relative size of the pharyngeal and salivary pumps, and postoccipital apodemes' extension; but their adaptive interpretation is not always obvious.

#### Phytophagous larvae

(herbivores: potential agricultural insect pests, or biological control agents on plants)

*Monarthropalpus flavus* (Schrank): supertribe Cecidomyiidi, unplaced to tribe (GAGNÉ, 2010);

*Neolasioptera martelli* Nijveldt: supertribe Lasiopteridi, tribe Alycaulini (GAGNÉ, l.c.);

*Fabomyia medicaginis* (Rübsaamen): supertribe Lasiopteridi, tribe Dasineurini (GAGNÉ, l.c.).

The larvae of these species develop in a similar environment, i.e., within plant tissues on which they feed by performing similar feeding behaviours, but there are some important differences in the food source consistency, with corresponding specific differences in the head strength of the larvae, i.e., the extent of development and consistency of the cephalic structures in question.

*Monarthropalpus flavus* is a very common species in the Palaearctic Region (popular name: Boxwood Leafminer), developing on *Buxus spp.* leaves within leaf blisters produced by the larvae themselves by feeding on quite soft mesophyll. Correspondingly we find the extent of development and consistency of the larval cephalic structures (Fig 4) as follows: a) hypostomal bridge (Hb) moderately developed and gradually hardened (sclerified) backwards;

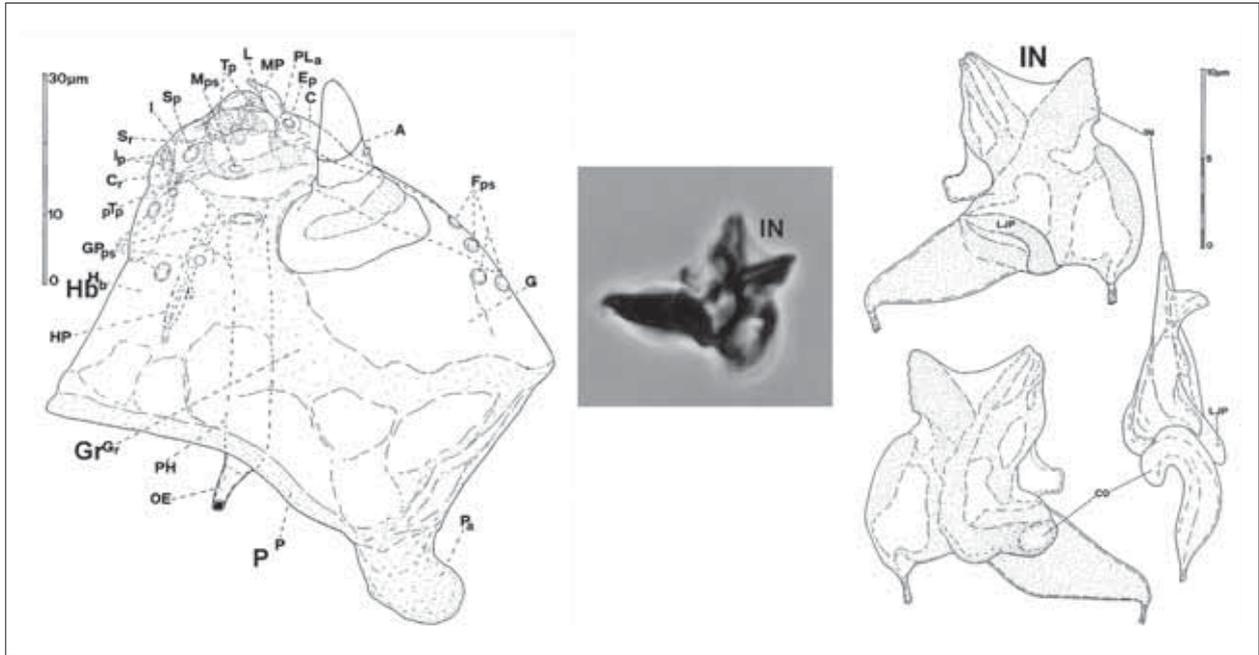


Fig. 4

*Monarthropalpus flavus* (Schrank). (Left) Camera lucida diagram of head left aspect: A, antenna; Gr, genal reinforcement; Hb, hypostomal bridge; Hp, hypopharynx; P, postocciput; Pa, postoccipital apodemes; Ph, pharynx. (Central) Phase-contrast micrograph (Zeiss III Photomicroscop, objective Ph3, Planapo 63/1.4 oel) of right mandible lateral (morphologically posterior) aspect. (Right) Camera lucida diagrams of right mandible (clockwise): lateral, dorsal and mesad aspects. IN, mandibular incisive lobe.

- b) genal reinforcements (Gr) moderately hardened, extended from the hypostomal bridge up to postocciput;
- c) postocciput (P) completely encircling the “foramen occipitalis” and moderately sclerified;
- d) mandibles (MD) well developed, having incisive lobe (IN) rather wide and showing a ventral portion quite rigid and terminating with a subtly serrate margin, and a dorsal portion quite soft and flexible.

Moreover the head capsule looks stubby and bears very short postoccipital apodemes (Pa). Pharyngeal pump (PH) and even more so the hypopharyngeal (HP), apparently scarcely developed.

*Neolasioptera martelli* larvae develop within the leaves of *Agave* sp., feeding on a resistant fibrous mesophyll, without producing any kind of gall (NIJVELDT, 1967).

The principal difference from the previous case is in the quality of the food source, as *Agave* mesophyll is harder than that of *Buxus*.

*Neolasioptera* larvae, as expected, have a head capsule that is generally stronger than in the previous species, and having (Fig. 5):

- a) hypostomal bridge (Hb) longer and harder;
- b) genal reinforcements (Gr) moderately thicker than adjacent areas, mainly extended towards the mouth parts;

- c) postocciput (P) completely encircling the “foramen occipitalis” and quite stronger;
- d) mandibles (MD) well developed, having incisive lobe (IN) lanceolate, much wider especially on the ventral portion which terminates in a sharp six-toothed margin; while the dorsal portion is soft and flexible as in the previous species, but remarkably more reduced.

Moreover the head capsule is more elongate than in *Monarthropalpus*, and bears postoccipital apodemes (Pa) almost as long as the head; and there is a remarkable development of both hypopharyngeal (salivary) (HP) and especially Pharyngeal (PH) pumps.

*Fabomyia medicaginis* larvae develop within a leaf gall that they induce on *Medicago* spp by feeding on the juices that they osmotically extract (by means of saliva) from and lap up on the gall inner walls (HEATH, 1961; SOLINAS, 1965).

Thus the larval feeding behaviour does not require special effort nor any cutting tool, and the cephalic structures in question, as expected, appear as follows (Fig. 6):

- a) hypostomal bridge (Hb) moderately developed and moderately hardened (sclerified) backwards; just as in *Monarthropalpus*;
- b) genae (G) without any reinforcement;
- c) postocciput (P) completely encircling the “fora-

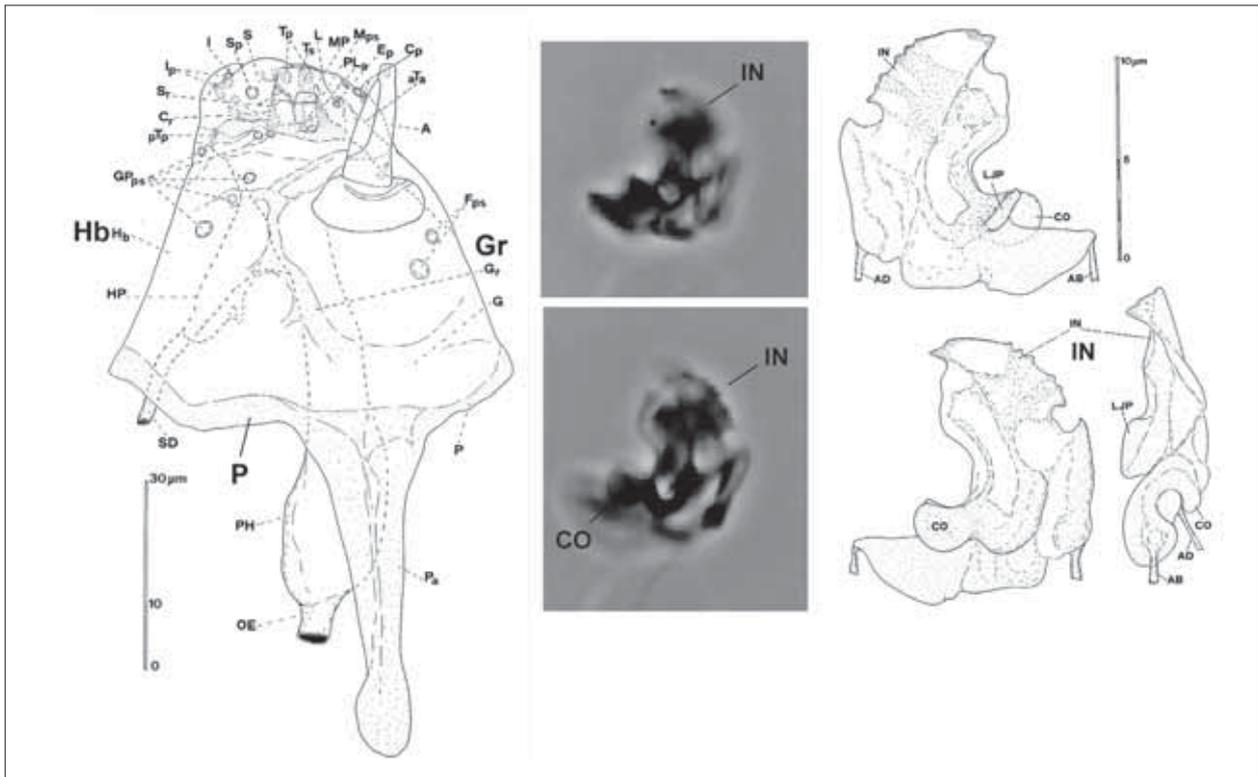


Fig. 5

*Neolasioptera martelli* Nijveldt. Camera lucida diagram of head left aspect: A, antenna; Gr, genal reinforcement; Hb, hypostomal bridge; Hp, hypopharynx; P, postocciput; Pa, postoccipital apodemes; Ph, pharynx. (Central) Phase-contrast micrograph (Zeiss III Photomicroscop, objective Ph3, Planapo 63/1.4 oel) of left mandible lateral (up) and mesad aspects. (Right) Camera lucida diagrams of left mandible (clockwise): lateral, dorsal and mesad aspects. IN, mandibular incisive lobe.

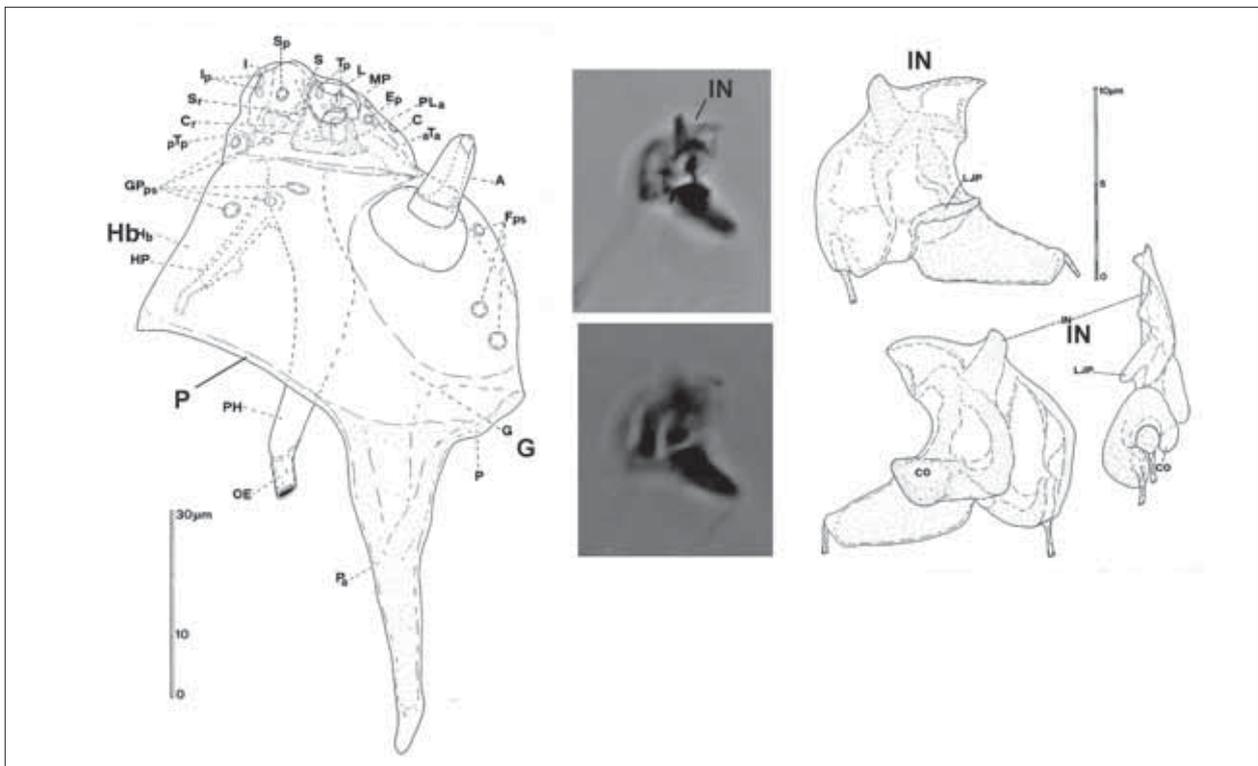


Fig. 6

*Fabomyia medicaginis* (Rübsaamen). Camera lucida diagram of head left aspect: A, antenna; G, genae; Hb, hypostomal bridge; Hp, hypopharynx; P, postocciput; Pa, postoccipital apodemes; Ph, pharynx. (Central) Phase-contrast micrograph (Zeiss III Photomicroscop, objective Ph3, Planapo 63/1.4 oel) of left mandible lateral (up) and mesad aspects. (Right) Camera lucida diagrams of left mandible (clockwise): lateral, dorsal and mesad aspects. IN, mandibular incisive lobe.

men occipitalis” and moderately sclerotized; just as in *Monarthropalpus*;

d) mandibles (MD) well developed, having incisive lobe (IN) rather wide, almost entirely soft and flexible except for an inner reinforcement ending forwards with a sort of spatula.

Moreover the head capsule looks rather stubby, moderately sclerified and bearing postoccipital apodemes (Pa) as long as the head and well sclerotized. Pharyngeal (PH) and hypopharyngeal (HP) pumps moderately developed.

### Mycophagous larvae

(potential biological control agents on phytopathological fungi)

*Mycodiplosis erysiphes* (Rübsaamen): supertribe Cecidomyiidi, tribe Mycodiplosini (GAGNÉ, l.c.);

*M. tremulae* Kieffer,

*Lasioptera berlesiana* Paoli: supertribe Lasiopteridi, tribe Lasiopterini (GAGNÉ, l.c.).

The larvae of these species although mycophagous, show important differences in specific feeding habits depending on the quality of the food

source, i.e., the two *Mycodiplosis* feed on the content of soft mildew conidia or harder rust spores, respectively, while *Lasioptera* normally feeds on juices from fungal mycelium. Consequently, as expected, we find specific differences in the head strength of the larvae (i.e. the extent of development and consistency of the cephalic structures in question), and especially in the mandibles.

*Mycodiplosis erysiphes* larvae are free living on plants attacked by mildews. They grip and pierce single conidia (one by one) to suck up the internal content.

The larval cephalic structures, as expected, appear appropriately specialized, as follows (Fig. 7):

a) hypostomal bridge (Hb) relatively short and rather strong;

b) genal reinforcements (Gr) quite strong and extended from postocciput up to the peristomal area where they appear bent ventrally and eventually connected to each other;

c) postocciput (P) completely encircling the “foramen occipitalis”, remarkably strong on both sides of the head capsule (on which mandibular muscles attach: Fig 2), and less sclerified on the rest, especially dorsally;

d) mandibles (MD) much larger than in the previ-

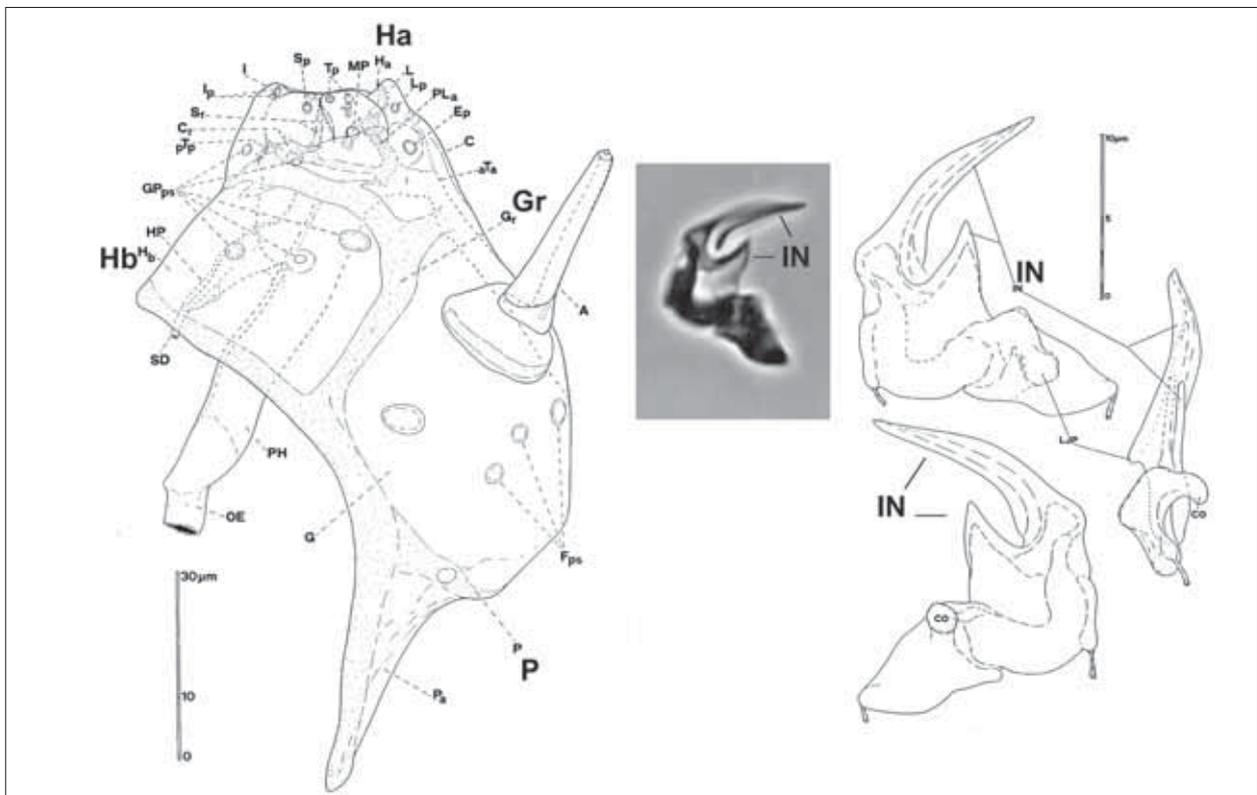


Fig 7

*Mycodiplosis erysiphes* (Rübsaamen). Camera lucida diagram of head left aspect: A, antenna; Gr, genal reinforcement; Ha, hooklike apodemes (labral?); Hb, hypostomal bridge; Hp, hypopharynx; P, postocciput; Pa, postoccipital apodemes; Ph, pharynx. (Central) Phase-contrast micrograph (Zeiss III Photomicroscop, objective Ph3, Planapo 63/1.4 oel) of left mandible lateral aspect. (Right) Camera lucida diagrams of left mandible (clockwise): lateral, dorsal and mesad aspects. IN, mandibular incisive lobe.

ous species, especially concerning the incisive lobe (IN) which is divided into two tooth-like branches, a lower one much longer and stylet-shaped, and an upper branch roughly triangular with very sharp edges, peculiarly adapted to pierce and cut mildew conidia.

Particularly remarkable is the unusual presence (may be typical of *Mycodiplosis*; see below) of a pair of internal longitudinal apodemes, on either side of the peristome and briefly projecting downwards with a hook-like (Ha) termination on either side of and just beneath the labrum. These hook-like structures may help the larval head to grip single mildew conidia against the leaf surface to be easily pierced by the mandibles.

Moreover the head capsule looks quite strong, moderately elongate and bearing postoccipital apodemes (Pa) well sclerified and about as long as half of the head.

*Mycodiplosis tremulae* larvae are free living on *Populus spp.* leaves attacked by rust fungi. They grip and pierce single spores (uredospores) to suck up

the internal content, displaying a feeding behaviour similar to the previous species.

The principal difference from the previous case consists in the obviously harder wall of the rust spores (compared with that of mildew conidia), which conceivably requires a stronger effort to be pierced.

The larval cephalic structures are, as expected, stronger as a whole, yet similar to those of the previous species, which is not surprising as both species belong to the same genus. In detail (Fig. 8), we find:

- a) hypostomal bridge (Hb) relatively short and quite strong;
- b) genal reinforcements (Gr) shaped and extended as in the previous species but obviously thicker;
- c) postocciput (P) shaped and extended just as in the previous species but obviously thicker, especially on each side on which the mandibular muscles attach;
- d) mandibles (MD) big and shaped as in the previous species, except for the incisive lobe (IN) which has the lower branch more rigid and thick-

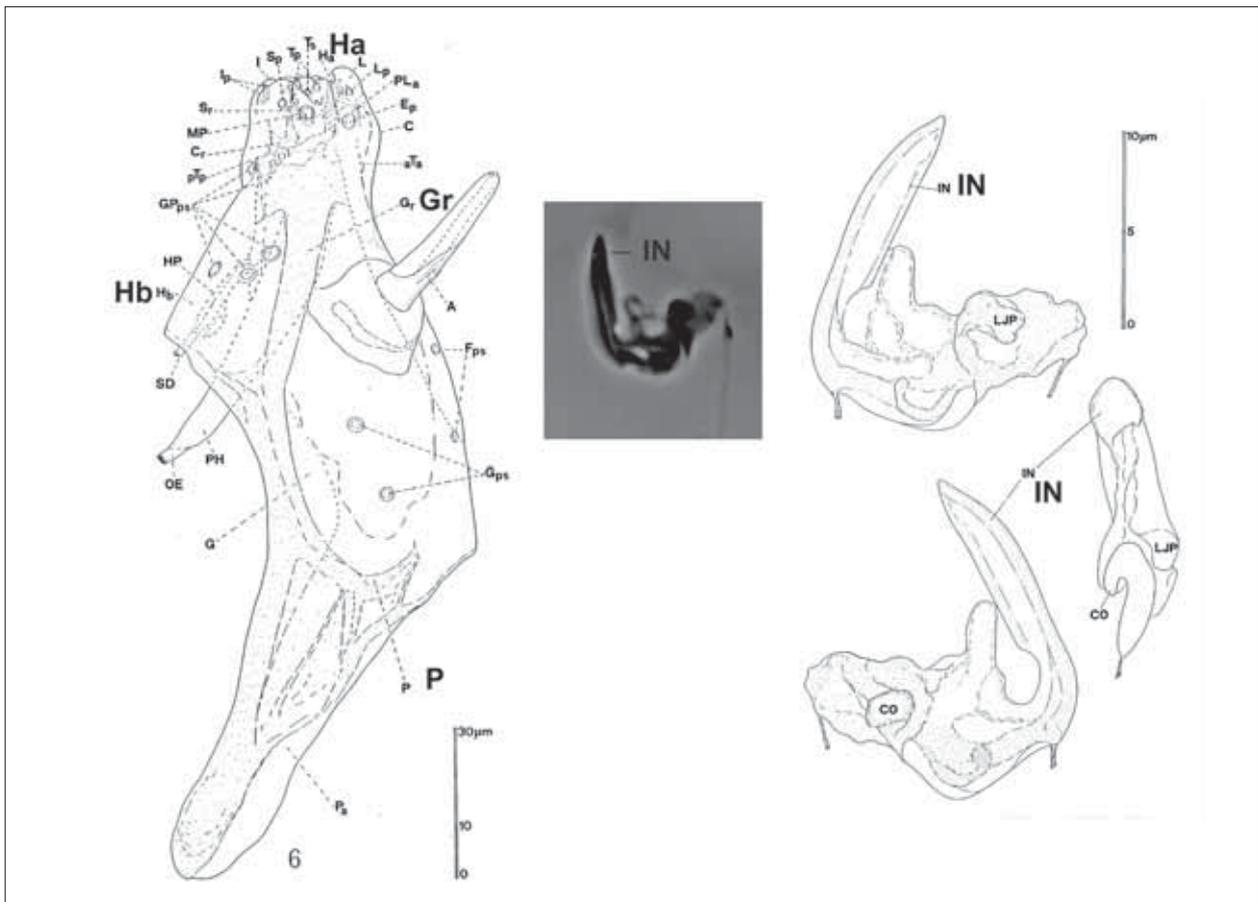


Fig- 8

*Mycodiplosis tremulae* Kieffer. Camera lucida diagram of head left aspect: A, antenna; Gr, genal reinforcement; Ha, hooklike apodemes (labral?); Hb, hypostomal bridge; Hp, hypopharynx; P, postocciput; Pa, postoccipital apodemes; Ph, pharynx. (Central) Phase-contrast micrograph (Zeiss III Photomicroscop, objective Ph3, Planapo 63/1.4 oel) of left mandible lateral aspect. (Right) Camera lucida diagrams of left mandible (clockwise): lateral, dorsal and mesad aspects. IN, mandibular incisive lobe.

er, whereas the upper branch looks irregularly shaped and rather soft;

As in the previous species, a remarkable pair of internal longitudinal apodemes are present, on either side of the peristome and shortly projecting downwards with a hook-like (Ha) termination on either side of the labrum. These hook-like structures conceivably help the larval head to grip single uredospores against the substratum (leaf surface) to be easily pierced by the mandibles.

Moreover the head capsule looks even stronger and more elongate than in *M. erysiphes*, and bears postoccipital apodemes (Pa) well sclerotized and about 2/3 as long as the head.

*Lasioptera berlesiana* larvae live and develop by piercing the invading mycelium of the phytopathogenic fungus *Sphaeropsis dalmatica* (Thüm.) Gigante, whose juices the larvae feed on within the burrows produced by *Bactrocera oleae* in olive fruits. But at the beginning of their development the *Lasioptera* larvae first prey on the egg or newly hatched larva of *Bactrocera* (or even on its own conspecifics) within the oviposition puncture of the latter (SOLINAS, 1967 and references therein).

The general and feeding behaviour of *Lasioptera* differs considerably from *Mycodiplosis*, and the extent of development and hardness of the cephalic structures in question appear quite different, especially the mandibles, as follows (Fig. 9):

- a) hypostomal bridge (Hb) hard and relatively long;
- b) genal reinforcements considerably thicker than adjacent areas, especially approaching the peristome;
- c) postocciput (P) completely encircling the “foramen occipitalis” and well sclerotized especially on either side of the head on which the mandibular muscles attach;
- d) Mandibles (MD) comparatively smaller than in the *Mycodiplosis* species, with incisive lobe (IN) completely different and rather resembling in shape that of *Neolasioptera* (see above) but having a five-toothed cutting edge and with the two median teeth remarkably projecting, thus particularly suitable also for the above mentioned predation.

Moreover the head as a whole appears rather strong and bearing postoccipital apodemes slightly shorter than the head and well sclerotized.

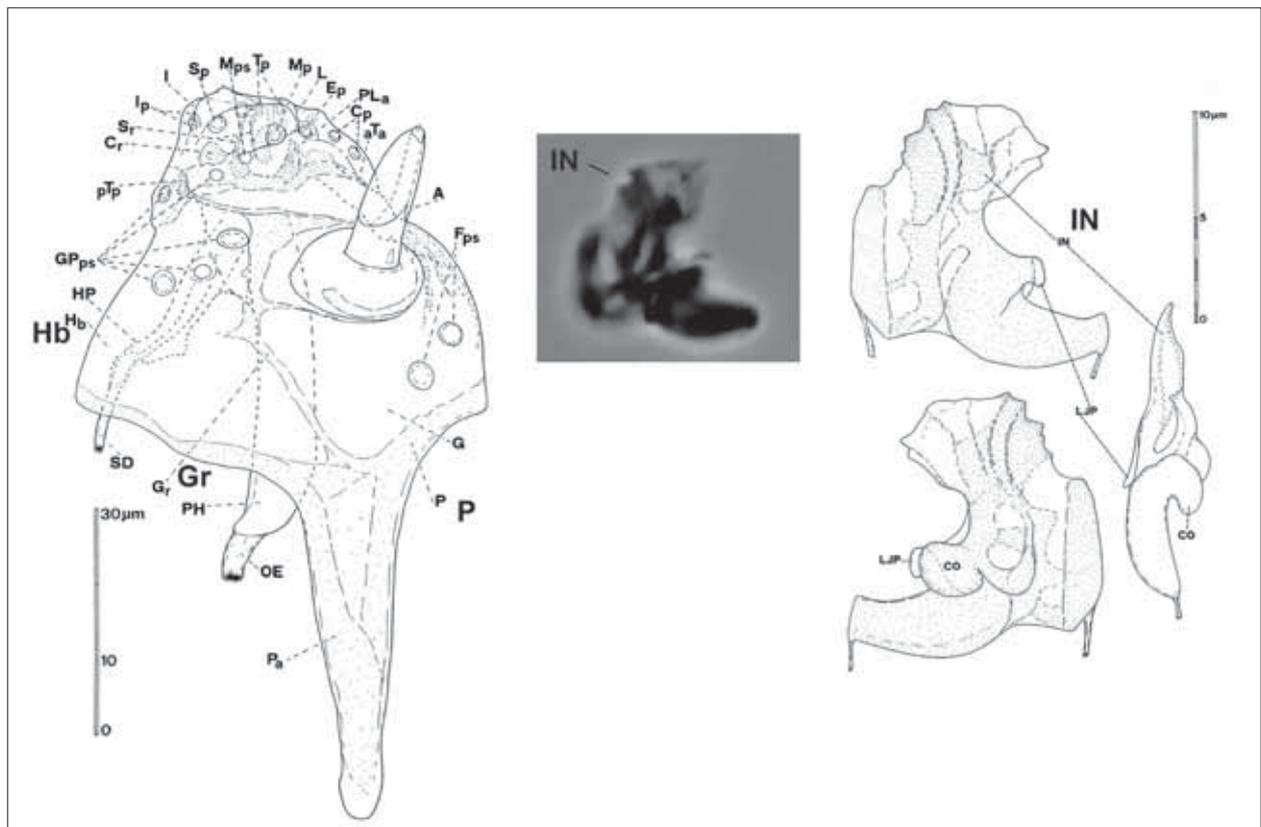


Fig. 9

*Lasioptera berlesiana* Paoli. Camera lucida diagram of head left aspect: A, antenna; Gr, genal reinforcement; Hb, hypostomal bridge; Hp, hypopharynx; P, postocciput; Pa, postoccipital apodemes; Ph, pharynx. (Central) Phase-contrast micrograph (Zeiss III Photomicroscop, objective Ph3, Planapo 63/1.4 oel) of left mandible lateral aspect. (Right) Camera lucida diagrams of left mandible (clockwise): lateral, dorsal and mesal aspects. IN, mandibular incisive lobe.

**Zoophagous larvae**

(biological control agents on arthropods)

*Aphidoletes aphidimyza* (Rondani): supertribe Cecidomyiidi, tribe Aphidoletini (GAGNÉ, l.c.);

*Dicrodiplosis pseudococci* (Felt): supertribe Cecidomyiidi, tribe Lestodiplosini (GAGNÉ, l.c.);

*Feltiella acarisuga* (Vallot): supertribe Cecidomyiidi, tribe Lestodiplosini (GAGNÉ, l.c.).

The larvae of these species are all predaceous and free-living among the colonies of their preys on which they live, ecologically speaking, as natural biological control agents. Also they display very similar feeding habits, all of them having a piercing-sucking mouth-type (Figs 10-12) by which they seize (using the fleshy outer mouth parts as a whole like a sucker) and pierce the victim (by very sharp mandibles), and violently inject into it saliva that immediately paralyzes the victim and partially digests its inner tissues to make them suitable to be sucked up.

All of these larvae show (Figs. 10-12) a head

quite strong and protrusible, helped by a pair of relatively long and rigid postoccipital apodemes (Pa); while hypopharyngeal (salivary, HP) and pharyngeal (PH) pumps are remarkably large, as expected.

There are also obvious morphological specific differences, as follows (compare Figs 10, 11, 12), but they are not easily interpretable functionally.

*Aphidoletes aphidimyza* larvae are specialist predators on many species of Aphids, widespread and also commercially marketed as biological control agents on agricultural pests.

The cephalic structures concerning feeding behaviour of this species are in detail as follows (Fig 10):

- a) hypostomal bridge (Hb) strong and comparatively long;
- b) genal reinforcements lacking;
- c) postocciput (P) completely encircling the “foramen occipitalis” and well sclerified especially on either side on which the mandibular muscles attach;

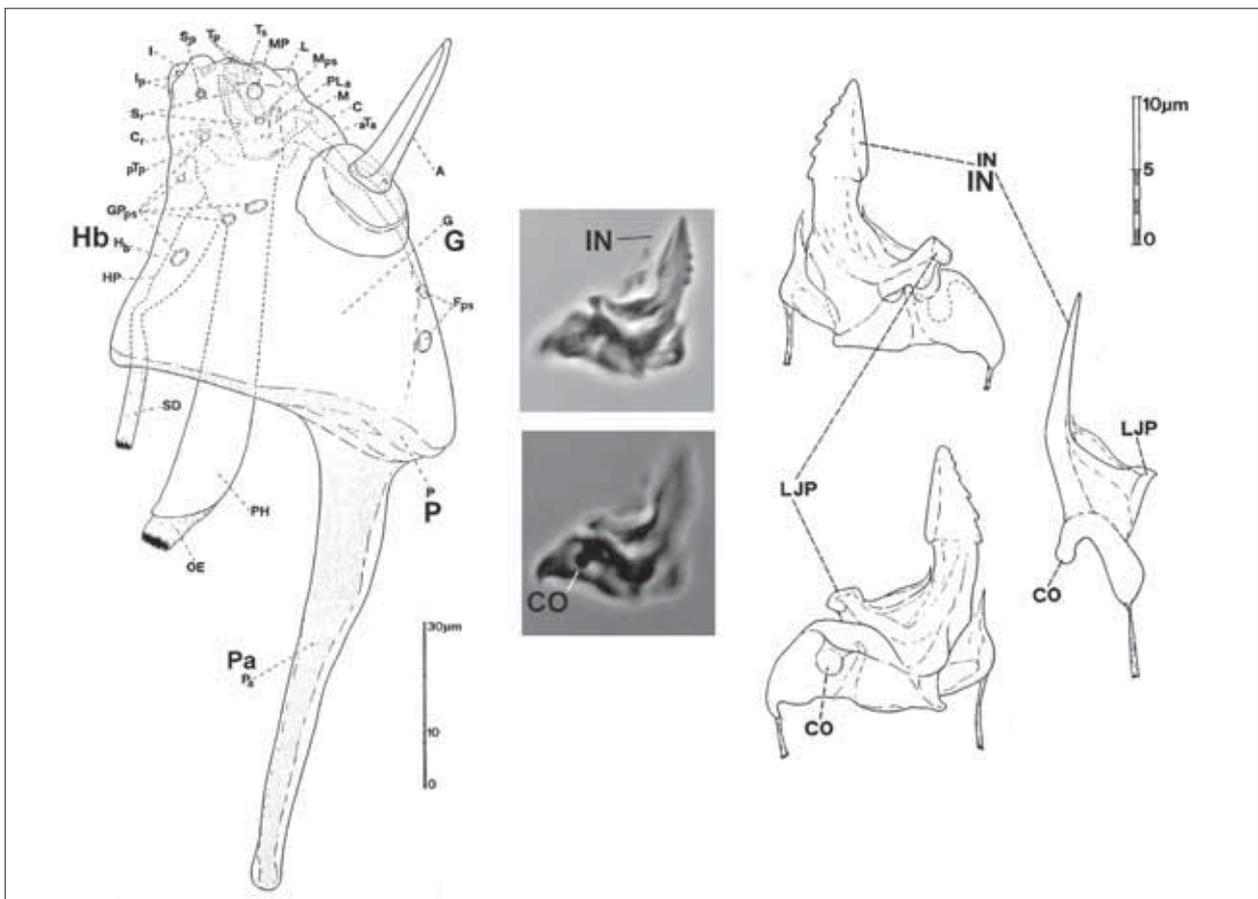


Fig. 10

*Aphidoletes aphidimyza* (Rondani). Camera lucida diagram of head left aspect: A, antenna; G, genae; Hb, hypostomal bridge; Hp, hypopharynx; P, postocciput; Pa, postoccipital apodemes; Ph, pharynx. (Central) Phase-contrast micrograph (Zeiss III Photomicroscope, objective Ph3, Planapo 63/1.4 oel) of left mandible lateral (up) and mesad aspects. (Right) Camera lucida diagrams of left mandible (clockwise): lateral, dorsal and mesad aspects. IN, mandibular incisive lobe.

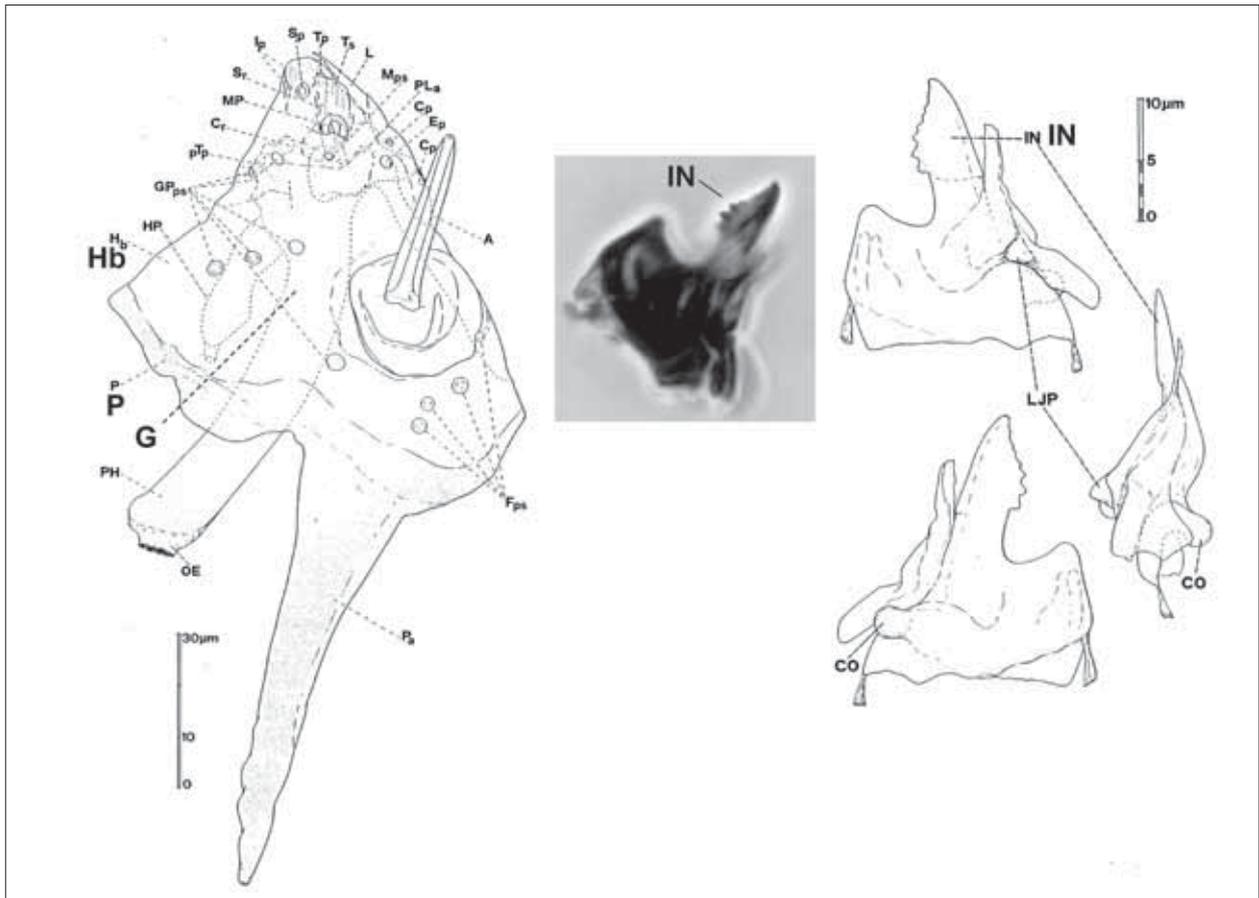


Fig. 11

*Dicrodiplosis pseudococci* (Felt). Camera lucida diagram of head left aspect: A, antenna; G, genae; Hb, hypostomal bridge; Hp, hypopharynx; P, postocciptut; Pa, postocciptal apodemes; Ph, pharynx. (Central) Phase-contrast micrograph (Zeiss III Photomicroscop, objective Ph3, Planapo 63/1.4 oel) of left mandible lateral aspect. (Right) Camera lucida diagrams of left mandible (clockwise): lateral, dorsal and mesad aspects. IN, mandibular incisive lobe.

d) Mandibles (MD) relatively big, entirely sclerotized and rather rigid, with incisive lobe (IN) lancet-like, directed forwards and having lower edge sharp and serrate (with 7-8 forwards gradually decreasing teeth).

Moreover the head as a whole appears rather strong, slightly longer than its basal diameter, and bearing postocciptal apodemes (Pa) well sclerotized and notably longer than the head itself.

*Dicrodiplosis pseudococci* larvae develop as biological control agents among colonies of *Planococcus citri* Risso (Citrus Mealybug) whose eggs (within ovisacs) they feed on by piercing and sucking them (BODENHEIMER, 1951; HARRIS, 1968).

The cephalic structures concerning feeding habits of this species are in detail as follows (Fig 11):

- a) hypostomal bridge (Hb) strong and moderately long;
- b) genal reinforcements lacking, just as in the previous species;
- c) postocciptut (P) as in the previous species;

d) Mandibles (MD) notably stronger and bigger than in the previous species, with incisive lobe (IN) similar in shape to the latter but somewhat stubbier and having the proximal teeth comparatively bigger.

Moreover the head as a whole appears rather strong, obconic, slightly longer than its basal diameter, and bearing postocciptal apodemes (Pa) well sclerotized and almost as long as the head.

*Feltiella acarisuga* larvae are specialist predators on spider mites, with a cosmopolitan distribution and are also commercially marketed as biological control agents for use against *Tetranychus spp.* They develop among colonies of the latter, whose eggs as well as juveniles or adults they feed on by piercing and sucking them (ROBERTI, 1954).

The cephalic structures concerning feeding habits of this species are in detail as follows (Fig 12):

- a) hypostomal bridge (Hb) moderately sclerotized;
- b) genal reinforcements lacking, as in both previous species;

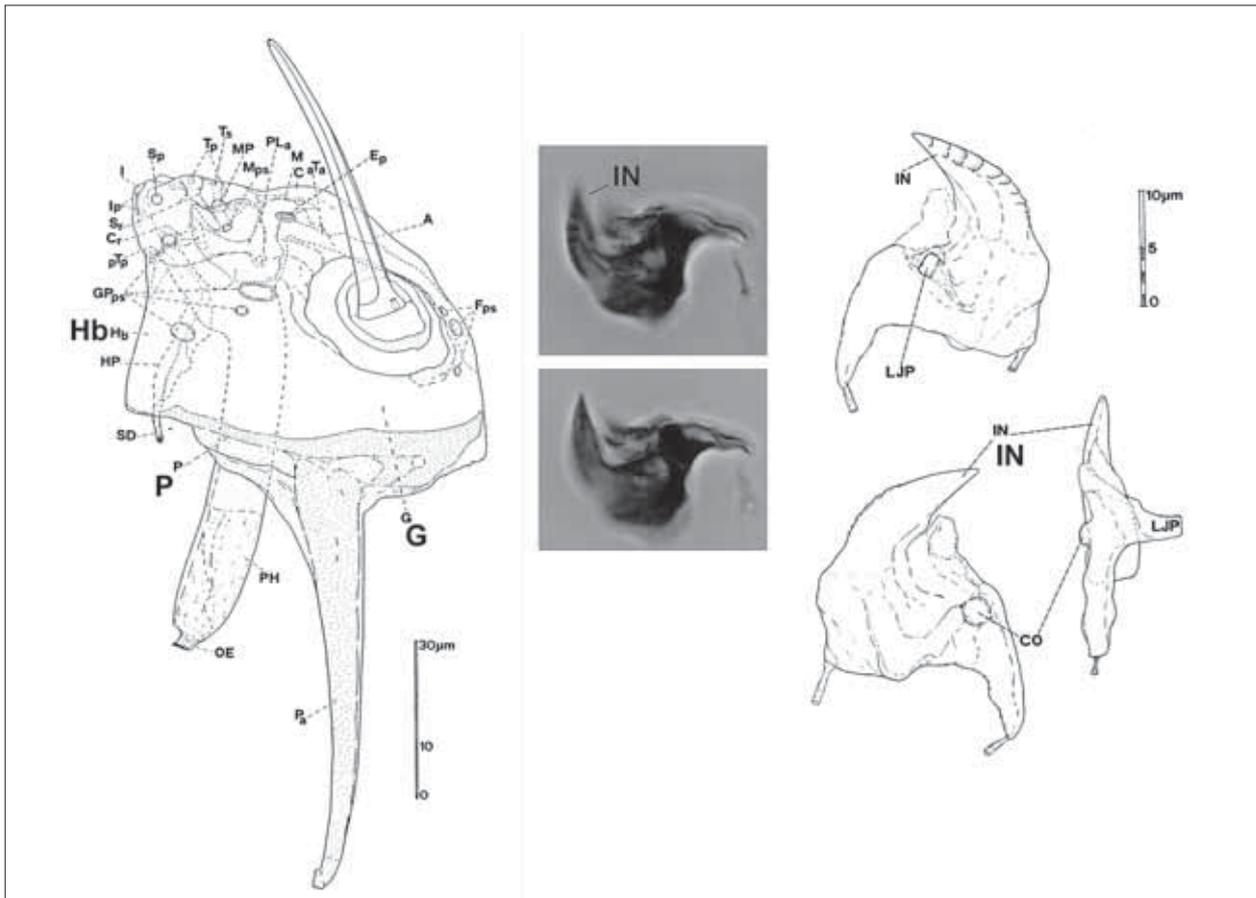


Fig. 12

*Feltiella acarisuga* (Vallot). Camera lucida diagram of head left aspect: A, antenna; G, genae; Hb, hypostomal bridge; Hp, hypopharynx; P, postocciput; Pa, postoccipital apodemes; Ph, pharynx. (Central) Phase-contrast micrograph (Zeiss III Photomicroscop, objective Ph3, Planapo 63/1.4 oel) of right mandible lateral (up) and mesad aspects. (Right) Camera lucida diagrams of right mandible (clockwise): lateral, dorsal and mesad aspects. IN, mandibular incisive lobe.

- c) postocciput (P) as in both previous species;
- d) Mandibles (MD) notably strong and big as in the previous species, but with incisive lobe (IN) somewhat different in shape and even stubbier, having upper edge straight and lower one strongly convex and serrate, and terminating with a very sharp point.

Moreover the head as a whole appears moderately strong, very stubby (notably shorter than its basal diameter), and bearing postoccipital apodemes (Pa) well sclerotized and longer than in both previous species (1+1/2 as long as the head).

## DISCUSSION

The above descriptions of the larval cephalic structures appear to be more or less strictly connected with both (a) the stresses the head is required to undergo, and (b) the task the mandibles have to accomplish in obtaining food.

In detail:

### Hypostomal bridge (Hb) and genal reinforcements

(Gr) are both more or less strong and extended depending on the high or low consistency of the food source respectively. In fact, these structures are: (a) moderately strong in *Monantrhopalpus buxi* which feeds on soft gall tissue; (b) rather strong in *Neolasioptera martelli* which feeds on fibrous plant tissue; and (c) quite weak in *Fabomyia medicaginis* that just laps up sap from the gall walls.

These structures appear relatively strong in the mycophagous species, and especially in *Mycodiplosis tremulae* which must pierce the hard wall of rust-uredospores.

Whereas in the zoophagous species the hypostomal bridge looks moderately strong and the genal longitudinal reinforcements are lacking. But this might be “the exception that proves the rule”, i.e., the remarkable sharpness of the mandible incisive lobe (IN, Figs 10, 11, 12) may considerably reduce the head effort required for the mandibles to pierce the prey skin.

The postocciput is more or less strong especially on either side of the head (where the mandibular muscles connect) according to the effort intensity

the mandibles are required to exert. So this structure is comparatively weak (less sclerotized than in all the other species considered) on either side of the head in *Fabomyia medicaginis* (Fig. 6) only.

The postoccipital apodemes do not seem to bear particular adaptations to the larval feeding behaviour; only in the zoophagous species are they obviously connected with the need for the head to be promptly retracted after having been thrust by means of blood pressure to cling to the prey.

The mandibles, and especially the incisive lobe, always display the highest degree of morphological adaptation to the larval feeding behaviour, or the quality of food source.

The hookshaped apodemes slightly projecting on either side of the labrum of both *Mycodiplosis* species (Ha, Figs 7 and 8) seem to help to grip mildew-conidia or rust-spores respectively. Moreover this feature might support the MÖHN'S (1955) suggestion that *Mycodiplosis* species are primitively mycophagous.

#### CONCLUDING REMARKS

From the above reported descriptions and discussion, what contribution might be drawn for better understanding of evolution and ecology in the light of biodiversity of insects?

The case studies presented here may be considered as simple observational examples of how natural selection prepared phytophagous species, as well as mycophagous and zoophagous ones, endowing them with appropriate tools together with suitable behaviours to be properly introduced into the homeostatic mechanisms necessary to maintain the ecosystems they belong to, through fulfilling their own ecological service within the same.

In fact, we know that herbivores (as primary consumers and demographic regulators of green plants, within natural ecosystems), as well as predators (i.e., secondary consumers, or biological control agents on herbivores) and fungus eating species (i.e., biological control agents on fungi), gradually enter the ecological successions as components of the homeostatic mechanisms that ensure ecological balance and stability necessary for the ecosystem to function properly, develop and mature up to a climax stage under the prevailing environmental conditions.

In other words, evolution and ecology always work together, remaining distinct from each other where principles are concerned, but not in the final results, which are not easily attributable to the former or the latter separately, given the inevitable interdependency between the two categories of phenomena, whereby they appear always present

and working within one other, in a reciprocal relationship, as if running towards or after each other, in order to produce together the biodiversity eventually we see and enthusiastically admire.

It is normally accepted that the evolutionary, morphological, taxonomical and ecological success achieved by insects represents the visible outcome of their impressive biological diversity, which can be detected at any organizational level: genes, molecules, organic systems, cells, organisms, ecosystems.

Ultimately, biodiversity seems to be represented by the multiple options, i.e., the most varied useful (rarely necessary) multiplicity of elements, simultaneously agents and effects of the fantasy of life itself, offered at every step of the organizational process to evolution (natural selection) as well as to ecology (ecological successions) to eventually produce what is needed for life itself to continue to go on, continuously improving, within a continuously changing biosphere.

Such wide considerations of mine maybe not very legitimately drawn from so few and limited study cases, yet I feel somewhat encouraged by the famous Plinius' assertion: "*Rerum natura nusquam magis quam in minimis tota*" (Plinius the Elder – *Naturalis Historiae*, XI).

#### ACKNOWLEDGEMENTS

I am very grateful to KEITH HARRIS, formerly Director of the CABI International Institute of Entomology and well-known applied entomologist and taxonomist, with a particular interest in Diptera Cecidomyiidae, for kindly reviewing a draft of this paper.

#### REFERENCES

- BODENHEIMER F.S., 1951 – *Citrus Entomology in the Middle East*. Junk, The Hague, The Netherlands, 663 pp.
- HARRIS K.M., 1968 – *A systematic revision and biological review of the cecidomyiid predators (Diptera: Cecidomyiidae) on world Coccoidea (Hemiptera: Homoptera)*. - Trans. R. Entom. Soc. London, vol. 119, Pt. 13, pp. 401-494.
- HEATH G.W., 1961 – *An investigation into leaf deformation in Medicago sativa caused by the gall midge Jaapiella medicaginis* Rübs. - Marcellia, supplement. vol. XXX: 185-198.
- GAGNE R.J., 2010 – *Update for a Catalog of the Cecidomyiidae (Diptera) of the world*. (File can be downloaded from: [http://ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12754100/Gagne\\_2010\\_World\\_Catalog\\_Cecidomyiidae.pdf](http://ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12754100/Gagne_2010_World_Catalog_Cecidomyiidae.pdf))
- MÖHN E., 1955 – *Beitrage zur systematik der Larven der Itonididae (=Cecidomyiidae, Diptera)*. 1. Teil: *Porricon-*

- dylinae und Itonidinae Mitteleuropas.* - Zoologica, Stuttgart, 38, pp. 129-247.
- NIJWELDT W., 1967 - *Neolasioptera martelli* sp.n., a gall midge injuring *Agave* in Mexico. - Entomologische Berichten, Deel, 27: 125-127.
- ROBERTI D., 1946 - *La Phaenobremia aphidimyza* (Rond.) (Diptera - Cecidomyiidae) predatrice di *Aphis* (Doralis) *frangulae* Koch. «Boll. Ist. Entom. Bologna», vol. XV: 233-256.
- ROBERTI D., 1954 - *I simbrionti degli Acari fitofagi.* - Boll. Entom. Agr. «Filippo Silvestri», vol. 13, pp. 285-302.
- SOLINAS M., 1965 - *Studi sui Ditteri Cecidomyiidi. II. Jaapicila medicaginis* Rübs e *Anabremia inquilina* n.sp. - Entomologica, Bari, vol. I: 211-281.
- SOLINAS M., 1967 - *Osservazioni biologiche condotte in Puglia sulla Prolasioptera berlesiana Paoli, con particolare riferimento ai rapporti simbiotici col Dacus oleae Gmel. e con la Sphaeropsis dalmatica (Thüm.) Gigante.* - Entomologica, vol. III: 129-176.
- SOLINAS M., 1968 - *Morfologia, Anatomia e organizzazione funzionale del capo della larva matura di Phaenobremia aphidimyza* (Rondani). - Entomologica, vol. IV: 7-44.
- SOLINAS M., 1969 - *Adattamenti morfologici nel capo delle larve di Ditteri Cecidomyiidi a regime dietetico specializzato.* Atti VIII Congr. Naz. It. Entomologia (Firenze, 4-7/09/1969): 70-92.
- SOLINAS M., 1984 - *Morphological adaptations of the head and mouth parts of some Cecidomyiidae larvae to their feeding behaviour.* XVII International Congress of Entomology, Hamburg (August 20-26, 1984), Abstract volume: 944.



SEDUTA PUBBLICA, FIRENZE 18 NOVEMBRE 2011

Tavola rotonda su:

STRUTTURA E FUNZIONI DEI TUBULI MALPIGHIANI DEGLI INSETTI

Coordinatori:

ROMANO DALLAI e BARBARA GIORDANA, Accademici



## GLI ORGANI ESCRETORI DEGLI INSETTI

ROMANO DALLAI (\*)

(\*) *Dipartimento di Biologia Evolutiva - Università degli Studi di Siena*

Lettura tenuta durante la Tavola rotonda «Struttura e funzioni dei Tubuli Malpighiani degli insetti» - Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 18 novembre 2011.

### *The insect excretory organs*

A general overview of the insect excretory organs is described. After a short discussion on the origin of the Malpighian Tubules, details on these organs, nephrocytes, labial kidney and rectal papillae are reported. These organs serve for osmotic and ionic regulation. Malpighian Tubules of Diptera derive early from ectodermal cells that evaginate from the primitive hindgut. In many insects *principal* and *stellate* cells are present; the former cells derive from the primordial buds, while stellate cells derive from mesenchymal population of mesodermal cells. The principal cells are numerous and mediate transepithelial active transport of cations (largely  $K^+$ ) whilst the stellate are scattered cells involved in a passive anion elimination ( $Cl^-$ ), thus producing a water passive movement. *Drosophila* and mammalian kidney development show remarkable similarities as the recruitment of the stellate cells.

Labial kidney are present in the basal Hexapods and are homologous with coxal glands of Arachnida and antennal glands of Crustaceans. As occurs in the podocytes of Vertebrate kidney, pedicels extend from the cell and contact the basal lamina. Between two adjacent pedicels, slits membranes are present. Labial kidney are probably involved in the ultrafiltration of the haemolymph and in the reabsorption of proteinaceous molecules.

Nephrocytes derive from embryonic mesoderm. They are characterized, as the podocytes of the labial kidney, by peripheral prolongations reaching the basal lamina. Also in these examples, slits or diaphragms are present between two contiguous pedicels and at their level haemolymph is filtered. An active endocytosis is also found.

The hindgut is involved in a further control of osmoregulation by special structures such as rectal papillae and rectal pads. The rectum in many insects is active in the transport of  $Cl^-$  and serves for maintaining ionic homeostasis. For this purpose cells differentiate membrane specializations as membrane stacks provided with an active ATPase and scalariform intercellular junctions. The presence of a compartment (infundibulum) beneath the cortical cells is important at the level of the rectal pads or papillae for the storage of fluids from the gut lumen. The medullary cells present in the ventral region of the infundibulum, may be involved in the ion transporting system from the infundibulum to the haemolymph and vice versa.

KEY WORDS: Malpighian Tubules, Nephrocytes, Labial Kidney, Rectal Papillae.

Il sistema escretore svolge fundamentalmente una funzione simile in tutti gli organismi multicellulari. Esso consiste nella eliminazione dei prodotti tossici, in particolare i metaboliti azotati, nel garantire l'omeostasi ed il mantenimento dell'equilibrio ionico e dell'acqua. Anche negli Insetti l'apparato escretore è impegnato in analoghe funzioni, anche se, in alcuni di essi, i Tubuli Malpighiani, gli organi specializzati per la escrezione, possono svolgere temporaneamente funzioni accessorie.

Gli Insetti, i più evoluti fra gli Artropodi, durante l'embriogenesi, vanno incontro ad una progressiva riduzione, fino alla scomparsa, della cavità celomatica tipica, circondata da una parete mesodermica. Con l'eccezione di alcuni bassi Esapodi, quali i Collemboli, i Dipluri ed i Tisanuri *sensu lato*, ancora provvisti di residui di celoma sotto forma di nefridi o reni labiali (reni cefalici), tutti gli pterigoti hanno, come risultato della scomparsa del celoma secondario, un sinceloma, più comune-

mente noto come emocele. La cavità celomatica scompare e le pareti mesodermiche si risolvono in tessuti ed organi diversi quali il vaso dorsale, il corpo grasso, i muscoli del corpo e quelli viscerali (BATE, 1993; RIECHMANN *et al.*, 1997) (Fig. 1A-D). Come conseguenza della scomparsa delle pareti mesodermiche, le strutture escrettrici metanefridiali di altri Invertebrati risultano assenti. Solo nei Chelicerati e nei Crostacei e in qualche Miriapodo persistono ancora organi con funzione escretoria che ricordano i metanefridi, quali le ghiandole coxali ed i nefridi antennali (o ghiandole antennali), anche se in questi, manca il caratteristico nefrostoma ciliato.

I principali organi escretori degli Insetti sono i seguenti: i Tubuli Malpighiani, i Reni labiali dei bassi Esapodi ed i Nefrociti. Svolgono altresì una funzione escrettrice sia cellule libere nell'emolinfa, sia l'intestino posteriore a livello dell'ileo e del retto, ove sono differenziati organi specializzati per questa

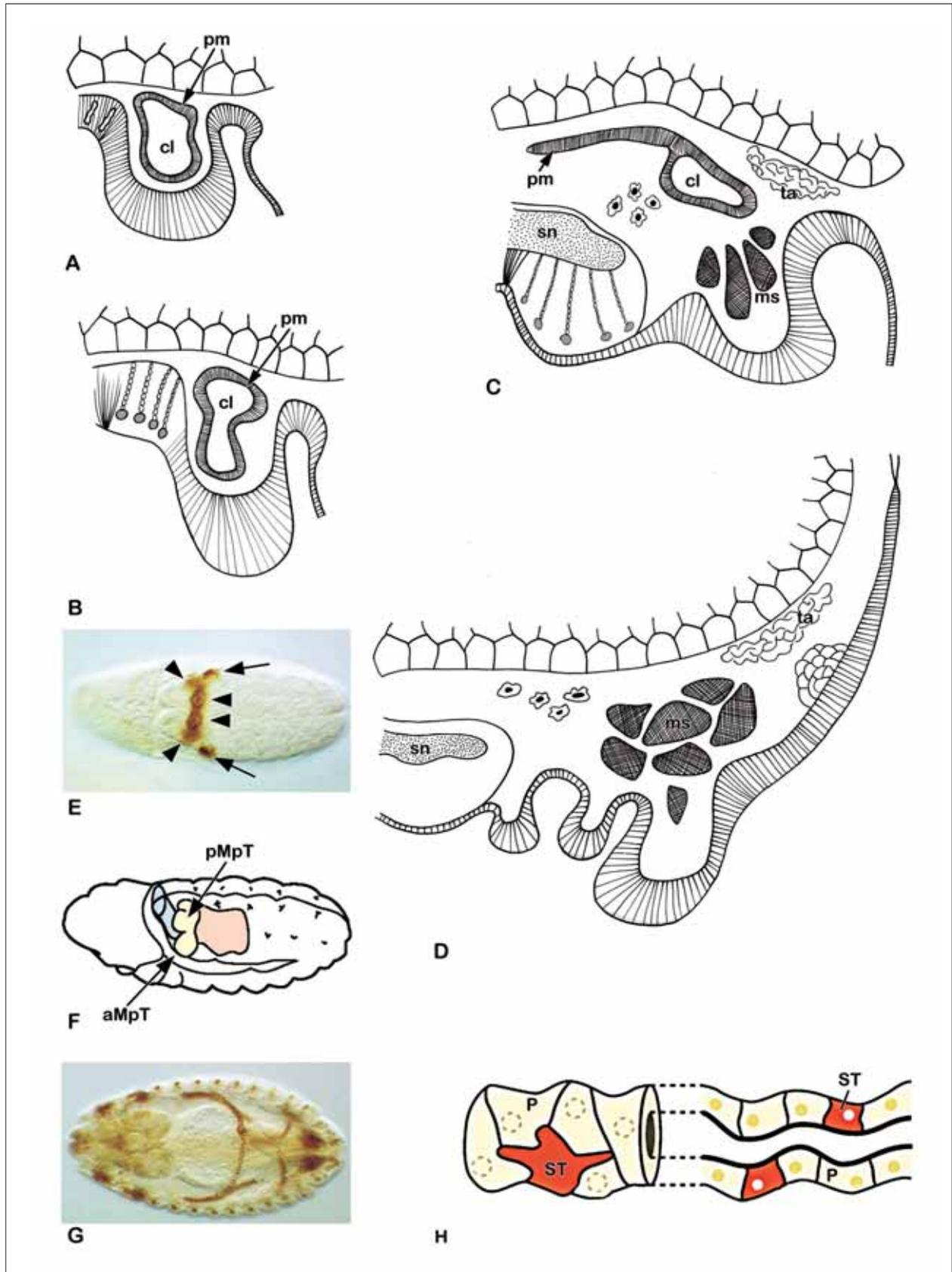


Fig. 1

A, D - Sequenza della progressiva riduzione (da 12 a 23 giorni) del celoma secondario (cl) fino alla sua scomparsa durante l'embriogenesi di *Tachycineta sp.* (Orthoptera); ms, muscoli; pm, parete mesodermica; Sn, sistema nervoso; ta, tessuto adiposo (da Anderson, 1972, modificato). E, F, G - Rappresentazione schematica dello sviluppo dei Tubuli Malpighiani in un embrione di *Drosophila*. Notare i 4 gruppi di cellule al fondo della invaginazione proctodeale (teste di freccia): da quelli centrali si formeranno i 2 tubuli posteriori (pMpT), mentre da quelli laterali si formeranno i 2 tubuli anteriori (aMpT) (da BEYENBACH *et al.*, 2010). H - Aspetto di un Tubulo Malpighiano di *Drosophila* con cellule principali (P) e cellule stellate (ST) (da BEYENBACH *et al.*, 2010).

funzione, quali le papille rettali e le “rectal pads”. Anche le cellule adipose svolgono un’attività escretrice

#### TUBULI MALPIGHIANI

Con poche eccezioni tutti gli Pterygota hanno differenziato dei Tubuli Malpighiani, così chiamati da Meckel nel 1829, ma scoperti da Malpighi come “vasa varicosa” nel 1669 (in WIGGLESWORTH, 1972).

I Tubuli Malpighiani svolgono una funzione escrettrice, che era già stata ipotizzata da HEROLD (1815) e poi confermata da Bugnatelli (1815) (in WIGGLESWORTH, 1972), che rinvenne acido urico nel liquido escreto. I Tubuli Malpighiani sono in numero variabile (2 nei Coccidi, 4 nei Tisanotteri e nei Ditteri, definiti pertanto come insetti oligonefrici, oppure possono essere numerosi come accade in vari Ortoteroidi e Imenotteri, che vengono definiti insetti polinefrici).

I Tubuli Malpighiani sono diverticoli a fondo cieco presenti alla fine dell’intestino medio o all’inizio del post intestino. Essi sboccano a livello del piloro, ma in punti diversi, così che la loro posizione ha dato origine in passato a controversie circa la loro origine embriologica. Secondo alcuni autori essi si formerebbero dall’apice della invaginazione proctodeale, a partire da cellule indifferenziate; secondo altri autori, invece, essi avrebbero un’origine endodermica, come l’intestino medio, di cui ripeterebbero la stessa struttura, con cellule microvillate. Comunemente, tuttavia, i Tubuli Malpighiani sono ritenuti avere un’origine ectodermica. In *Periplaneta americana*, studiando il tipo di giunzioni intercellulari presenti nell’epitelio dei Tubuli Malpighiani di questo Blattodeo, fu osservata la coesistenza della giunzione intercellulare di tipo *pleated septate*, tipica degli epitelii ectodermici, con la *smooth septate*, nota solamente fra le cellule dell’intestino medio che, come noto, è di origine endodermica. Il dato pertanto lasciava supporre in questo insetto un’origine mista delle cellule dei Tubuli Malpighiani (DALLAI, 1976a) (Fig. 2A-C). Lo stesso quadro relativamente alla presenza di due modelli giunzionali fu anche descritto da LACOMBE (1976) e da SKAER *et al.* (1979) in *Musca*, *Rhodnius* ed *Apis*.

I dati embriologici più recenti ottenuti su *Drosophila* (DOW e DAVIES, 2001; DENHOLM *et al.*, 2003; JUNG *et al.*, 2005; DENHOLM e SKAER, 2009; BEYENBACH *et al.*, 2010), tuttavia, non lasciano dubbi sull’origine ectodermica dei Tubuli Malpighiani in questo Dittero. Questi, infatti, prenderebbero origine, durante l’embriogenesi, da abbozzi di cellule ectodermiche presenti al fondo della invaginazione proctodeale (*hindgut primordium*) che si sviluppano

secondo un preciso programma. Tale programma prevede varie fasi: inizialmente si ha una specificazione cellulare dovuta ai geni *Kruppel* (Kr) e *cut* che agiscono in concerto, successivamente si ha la formazione della struttura tubulare del Tubulo Malpighiano. Le cellule presenti al fondo della invaginazione proctodeale mantengono la loro polarità. Le cellule centrali, proliferando, formeranno i due tubuli diretti posteriormente, mentre le altre cellule, poste lateralmente, daranno origine ai due tubuli anteriori. Quattro o cinque divisioni cellulari successive completeranno il tubulo. Molti altri geni sono implicati nella fase di sviluppo e completamento dei Tubuli Malpighiani (BEYENBACH *et al.*, 2010) (Fig. 1E-F).

I Tubuli Malpighiani di molti insetti presentano due tipi cellulari: *cellule principali* e *cellule stellate* (Fig. 1G). Durante l’allungamento del tubulo, infatti, cellule mesenchimatiche provenienti dal mesoderma si integrano con quelle numerose già presenti e che hanno dato forma al tubulo. Queste cellule, di provenienza più tardiva, per la loro forma, sono definite *cellule stellate*. Esse esprimono il fattore *TipTop* e il suo ortologo *Teashirt*, e la proteina *Hibris*. Nei mutanti per quest’ultima proteina, le cellule stellate non si integrano con quelle principali; gli embrioni sopravvivono, ma gli adulti hanno vita breve. Le cellule principali, di derivazione ectodermica, sono più numerose e sono soprattutto impegnate nel trasporto di cationi ( $K^+$ ) nel lume attraverso scambi protoni/cationi, mentre le cellule stellate determinano il movimento di acqua attraverso l’eliminazione di  $Cl^-$  e acquaporina.

Per quanto riguarda il reperimento delle cellule stellate, è stata osservata una forte somiglianza fra lo sviluppo dei Tubuli Malpighiani di *Drosophila* e lo sviluppo dei reni dei Mammiferi.

Anche l’ormone ecdisone svolge una importante funzione durante lo sviluppo dei Tubuli Malpighiani, determinando sia il numero che la regolare distribuzione delle cellule stellate lungo il tubulo. Inoltre, è stato osservato che l’espressione delle due proteine integrina e acquaporina è ridotta nel caso sia assente il segnale per l’ecdisione (GAUTAM & TAPADIA, 2010).

La ultrastruttura delle cellule epiteliali dei Tubuli Malpighiani è semplice e ricorda quella delle cellule dell’intestino medio, essendo come queste provviste di microvilli apicali. Le cellule, tuttavia, possono avere diversa struttura e distribuzione. Nel caso di *Rhodnius prolixus* il segmento distale dei tubuli presenta cellule binucleate con citoplasma ricco di formazioni cristalline, e microvilli apicali contenenti mitocondri (WIGGLESWORTH e SALPETER, 1962; BRADLEY, 1985). Questa regione è secretoria e contribuisce alla eliminazione di cloruri di  $Na^+$  e  $K^+$ , salificandoli, oltre che alla eliminazione di acqua. A

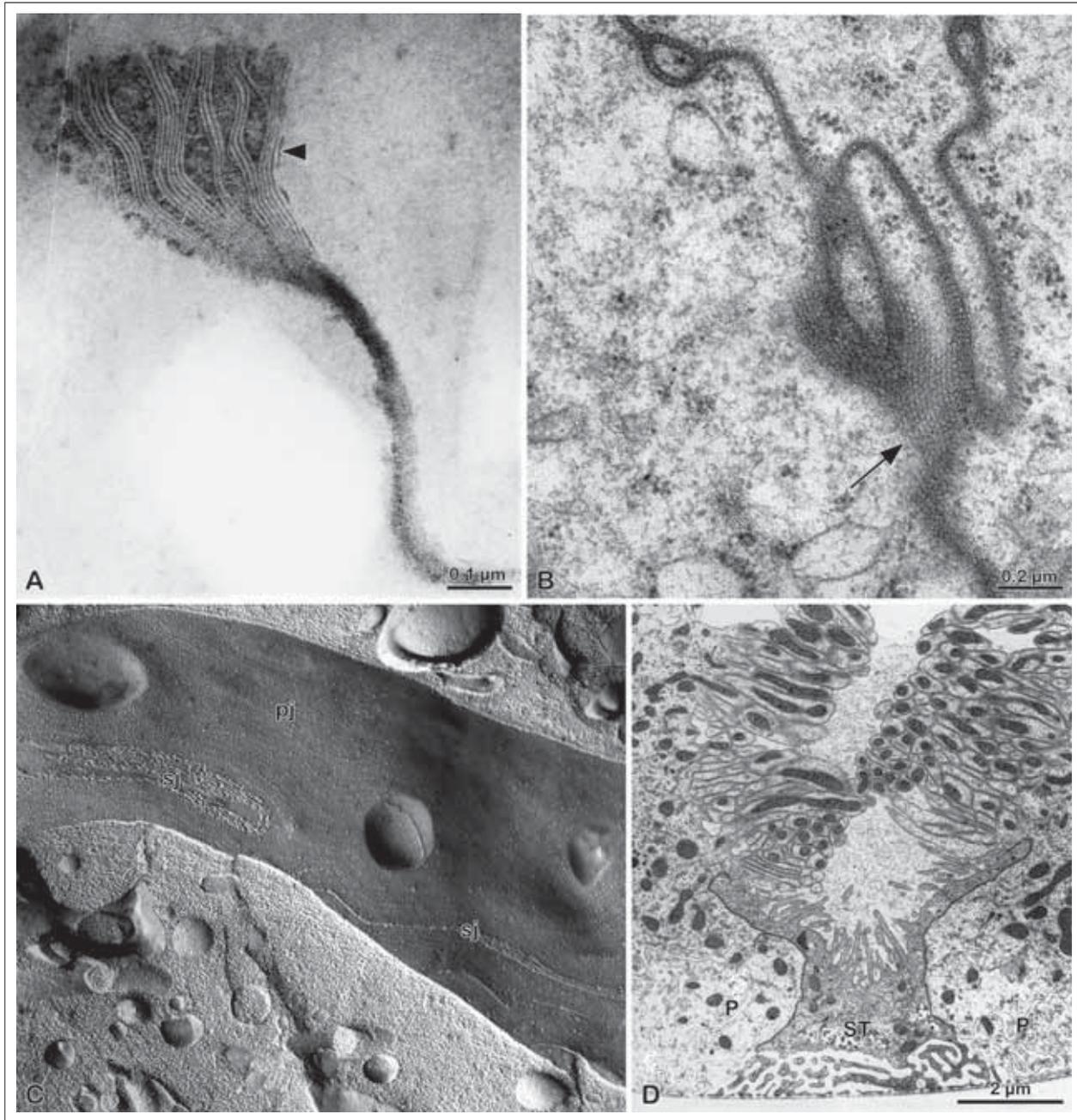


Fig. 2

A, B - Aspetto della smooth septate junction (A) e della pleated septate junction (B) dopo infiltrazione del tessuto con nitrato di lantanio. Notare l'aspetto sinuoso e continuo dei setti intercellulari della prima (testa di freccia) e quello a nido d'ape della seconda (freccia) (da DALLAI, 1976a). C - Replica ottenuta con la tecnica del freeze-fracture, per mostrare l'aspetto della membrana plasmatica fratturata, con i due modelli di giunzione intercellulare: smooth septate junction (sj) e pleated septate junction (pj), riconoscibili per le particelle intramembrana fuse nel primo tipo e distinte nel secondo (da DALLAI, 1976a). D - Sezione dell'epitelio di un Tubulo Malpighiano per mostrare le cellule principali (P) e quelle stellate (ST) (da BRADLEY, 1998, modificato).

questa regione ne segue un'altra le cui cellule non presentano inclusioni cristalline. La porzione basale dei tubuli è quella impegnata nel riassorbimento di KCl e acqua dall'urina primaria (MADDRELL, 1981) (Fig. 3A). A livello di questa regione si possono rilevare microvilli di grosse dimensioni contenenti microtubuli; per la somiglianza con strutture presenti in altri organismi, queste strutture sono state definite assopodi (BRADLEY e SATIR, 1979). Nei Ditteri,

che non presentano una regionalizzazione strutturale, ma sono uniformi sotto questo aspetto, sono state ugualmente descritte 2 tipi di cellule: *cellule principali* e *cellule stellate* (Fig. 2D); le prime sono grandi e deputate alla produzione di urina, ricche di formazioni cristalline, con microvilli provvisti di mitocondri e con una particolare specializzazione di membrana al loro apice (portasomi), strutture probabilmente coinvolte nel trasporto di ioni  $H^+$  nel

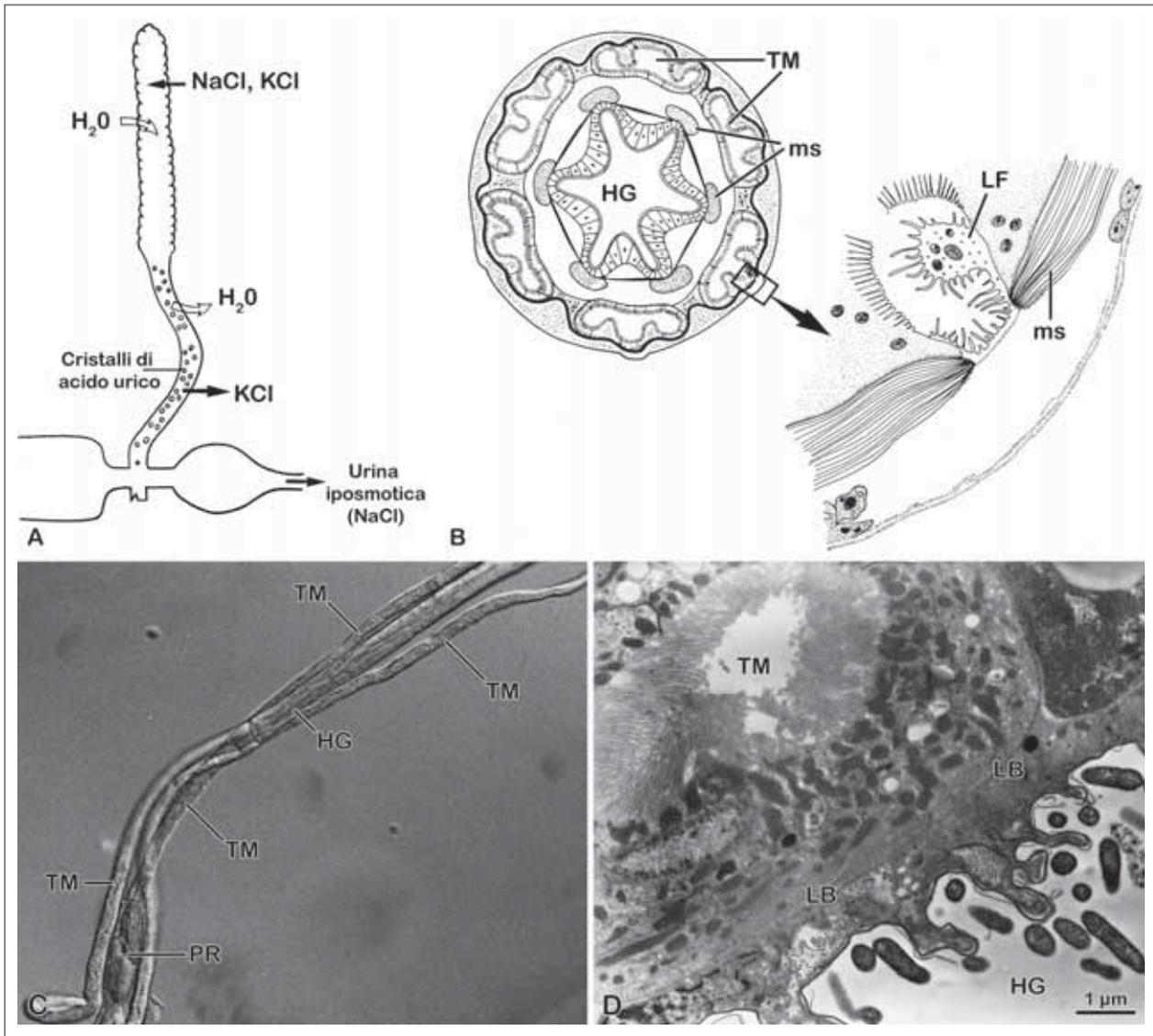


Fig. 3

A - Rappresentazione schematica di un Tubulo Malpighiano di *Rhodnius prolixus* mostrandone l'attività funzionale che si realizza ai diversi livelli (da BRADLEY, 1998). B - Disegno schematico della struttura dei criptonefridi a livello del postintestino (HG) di *Tenebrio*. Notare la disposizione dei Tubuli Malpighiani (TM) e la presenza delle cellule leptofragma (LF). ms, muscoli circolari e longitudinali (da NOBLE-NESBITT, 1998, semplificato). C - Tubuli Malpighiani (TM) e postintestino (HG) del Tisanottero *Frankliniella occidentalis* per mostrare i due tubuli posteriori aderenti al postintestino. PR, papille rettali (da DALLAI *et al.*, 1991). D - Micrografia elettronica del postintestino della specie precedente per mostrare l'adesione di un Tubulo Malpighiano posteriore (TM) all'epitelio del postintestino (HG). Una sottile lamina basale (LB) separa i due epitelii (da DALLAI *et al.*, 1991).

sistema vacuolare apicale, contenente ATPasi. Le cellule stellate sono piccole e non contengono cristalli. I loro microvilli sono corti e non presentano né mitocondri, né portosomi. Il loro ruolo sembrerebbe quello di attuare un transito passivo di ioni, oppure di svolgere funzioni di riassorbimento (PANNABECKER *et al.*, 1993).

La maggior parte degli insetti hanno Tubuli Malpighiani con diversi tipi cellulari. Nei Blattodei (*Periplaneta americana* e *Blattella germanica*), le cellule apicali di ogni Tubulo Malpighiano non contengono cristalli e i microvilli sono corti e mancano di mitocondri. La porzione centrale è secernente e contiene sia cellule principali che cellule stellate. La

parte prossimale dei tubuli presenta un solo tipo cellulare e questa regione sbocca in una ampolla.

Un esempio particolare di specializzazione dei Tubuli Malpighiani, che prevede la presenza di più tipi cellulari, riguarda i criptonefridi dei Coleotteri, Lepidotteri e Neurotteri. In *Tenebrio molitor*, la porzione distale dei tubuli presenta due tipi cellulari: grandi cellule primarie e piccole cellule leptofragma (Fig. 3B); queste ultime hanno microvilli privi di mitocondri. La regione è rivestita da uno strato di cellule che mantengono il tubulo aderente all'intestino retto e lo isolano dall'emolinfa. Le cellule del leptofragma sono in contatto con l'emolinfa, attraverso piccole fenestrate dello strato cellulare di rivestimento. I leptofragma

secernono KCl nel lume del tubulo e determinano un ritardo nel transito di acqua. Il risultato è che si produce una soluzione concentrata di KCl. Tale soluzione, ipertonica rispetto all'emolinfa, è utilizzata per il recupero di acqua per via osmotica dal lume rettale, rendendo le feci più compatte (MORDUE *et al.*, 1980; NOBLE-NESBITT, 1998).

Una semplice adesione alla regione rettale dei due Tubuli Malpighiani posteriori è presente anche nei Tisanotteri (DALLAI *et al.*, 1991) (Fig. 3C-D). A questo livello vi sono numerosi mitocondri su ambedue i versanti, quello intestinale e quello dei tubuli, separati da una sottile lamina basale. La particolare disposizione ha fatto ipotizzare un possibile transito di fluidi attraverso i due compartimenti.

#### RENI LABIALI (RENI CEFALICI)

Questi organi escretori, presenti a livello della capsula cefalica, sono noti sotto nomi diversi in vari atterigoti (FRANÇOIS, 1998), mentre mancano negli Pterygota. Essi sono omologhi alle ghiandole antenali dei Crostacei e alle ghiandole coxali degli Aracnidi (KUMMEL, 1967). I reni labiali sono presenti nei Collemboli (ALTNER, 1968) e nei Dipluri Japigidi, entrambi privi di Tubuli Malpighiani, (DALLAI e CALLAINI, 1979) (Fig. 4A-B), sono presenti nei Tisanuri (GABE, 1967; HAUPT, 1969), che tuttavia hanno Tubuli Malpighiani ridotti e contorti, e nei Dipluri Campodeidi (DALLAI e BURRONI, 1982) provvisti di corti Tubuli Malpighiani. I reni labiali mancano nei Proturi, che presentano, invece, papille malpighiane (DALLAI, 1976b) (Fig. 4C).

Tipicamente ogni rene labiale, consta di 3 parti: un sacco, un tubulo contorto ed un dotto escretore (Fig. 4D).

Il sacco ha un epitelio con cellule molto differenziate, i podociti, similmente ai nefrociti. Queste cellule sono provviste di prolungamenti ramificati, i pedicelli digitiformi, che raggiungono la lamina basale.

Fra l'apice di due pedicelli adiacenti è teso un denso setto di 4-8nm. Le cellule sono caratterizzate dalla presenza di un apparato di Golgi ben sviluppato. La lamina basale è spessa 25-40nm e circonda l'intero sacco (Fig. 4E). L'analogia strutturale di queste cellule con i podociti del rene dei Vertebrati e quella dei nefrociti ha fatto ipotizzare una analoga funzione di ultrafiltrazione, che si attuerebbe a livello della lamina basale e del setto divisorio dei pedicelli. La presenza di "coated vesicles", di lisosomi e di vescicole lisce ha fatto anche suggerire la presenza di un processo di riassorbimento di molecole proteiche ed una loro successiva degradazione ad opera dei lisosomi, con rilascio nel lume di vescicole di urina primaria per esocitosi.

Il tubulo contorto presenta un epitelio microvillato, privo di portasomi, e di invaginazioni della membrana basale, associata a numerosi mitocondri.

La porzione basale del tubulo presenta pochi, corti ed irregolari microvilli apicali.

I due tubuli contorti dei reni cefalici si riuniscono e sboccano in un dotto escretore ectodermico e pertanto con cellule rivestite apicalmente di una cuticola. Il dotto comune si apre fra il labium e l'ipofaringe nei Tisanuri *sensu lato* e nella doccia ventrale nei Collemboli e nei Dipluri; un apparato muscolare controlla l'emissione dell'urina (FRANÇOIS, 1998).

#### NEFROCITI

Queste cellule, descritte per la prima volta da KOWALEVSKY (1889) (in WIGGLESWORTH, 1972) che le definì "Storage Kidneys", sono in grado di accumulare materiali provenienti dall'emolinfa. In *Drosophila* ne esistono di 2 tipi: *nefrociti pericardiaci* o dorsali e *nefrociti periesofagei*, che formano una sorta di collana intorno all'esofago (Fig. 5A-B). In altri insetti sono stati descritti anche nefrociti liberi, nel tessuto adiposo e in altri tessuti, definiti *nefrociti disseminati*. I nefrociti derivano dal mesoderma cardiaco, che dà anche origine al cuore e alle ghiandole linfatiche produttrici degli emociti (CROSSLEY, 1972; RUGENDORFF *et al.*, 1994; MANDAL *et al.*, 2004).

I nefrociti periesofagei derivano da cellule mesodermiche presenti nel capo. La funzione principale dei nefrociti è quella di regolare la composizione dell'emolinfa attraverso una attiva filtrazione ed endocitosi. La loro caratteristica ultrastrutturale principale è quella di formare alla periferia una sorta di labirinto di lacune separate da processi digitiformi. Fra queste digitazioni sono presenti delle sottili fessure larghe circa 30nm attraversate da densi setti che funzionano come diaframmi filtranti (DALLAI *et al.*, 1994; DENHOLM e SKAER, 2009) (Fig. 5D). Ogni nefrocito è circondato da una lamina basale di aspetto lasso. L'emolinfa viene filtrata prima da questa lamina e poi dai diaframmi e finalmente subisce un processo di endocitosi. Particelle più grandi di 10-12 nm sono escluse dalla filtrazione. È interessante notare come l'organizzazione periferica dei nefrociti sia sovrapponibile a quella dei pedicelli dei podociti presenti nel rene dei vertebrati (Fig. 5C), che come è noto, svolgono ugualmente una funzione di filtrazione. Anche in queste cellule sono presenti processi digitiformi distanti circa 30-50nm; come i nefrociti, inoltre, sono rivestiti da una lamina basale carica negativamente. Si è ipotizzato che i nefrociti degli insetti possano accumulare temporaneamente tossine che poi rilascerebbero, con o senza alcuna modifica, nei Tubuli Malpighiani.

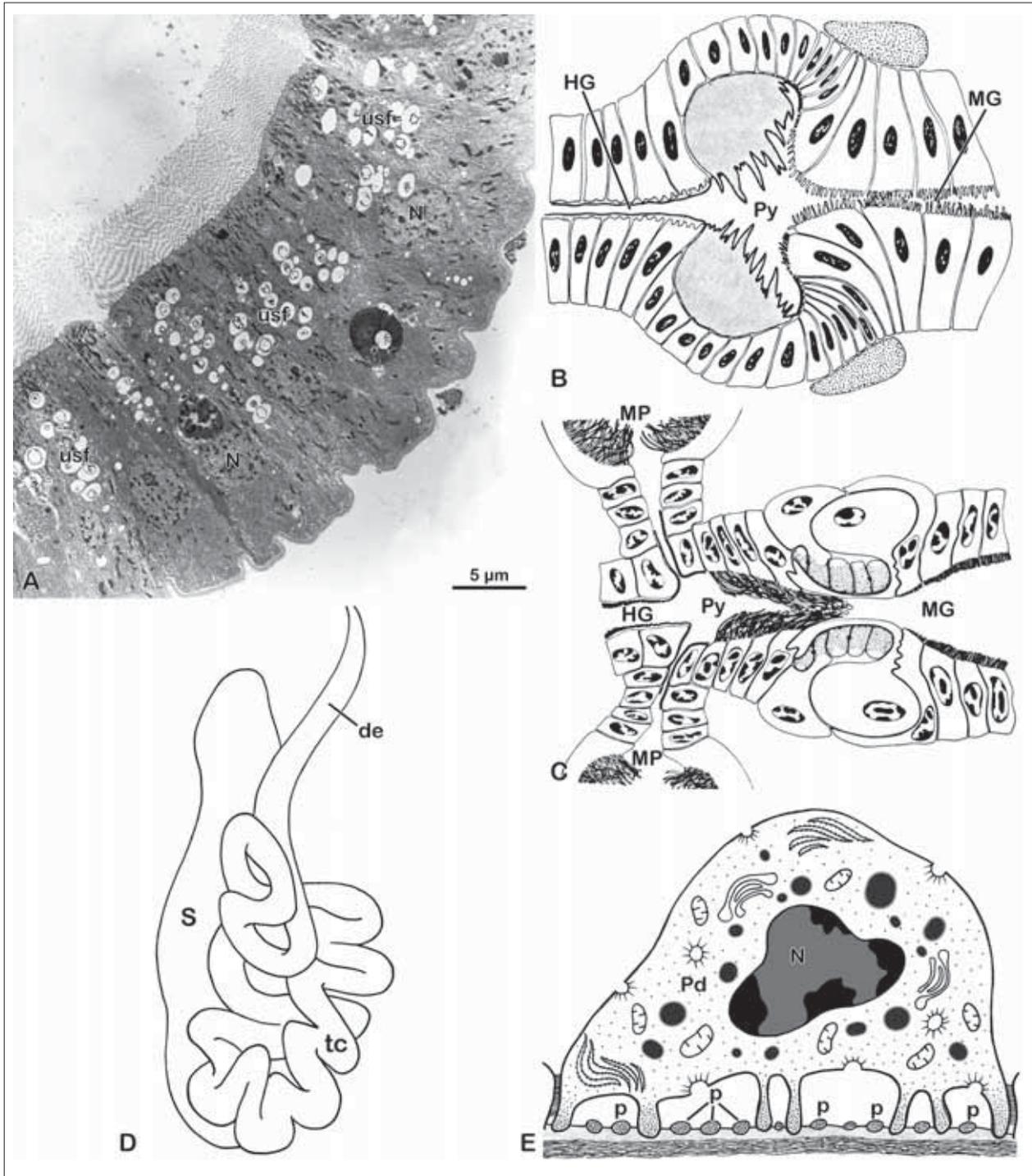


Fig. 4

A - Micrografia elettronica dell'epitelio dell'intestino medio del Collembolo *Orchesella villosa* per mostrare i numerosi urosferiti (usf) nel citoplasma; N, nuclei. B - Disegno schematico della regione pilorica (Py) di un Collembolo. I Tubuli Malpighiani sono assenti in questo gruppo di Esapodi basali; HG, intestino posteriore; MG, intestino medio (da DALLAI, 1980). C - Disegno schematico per mostrare la regione pilorica (Py) di un Proturo. HG, intestino posteriore; MG, intestino medio; MP, Papille Malpighiane (da DALLAI, 1976b). D - Disegno schematico di un rene labiale di *Campodea* sp.; de, dotto escretore; S, sacculo; tc, tubulo contorto (da FRANÇOIS, 1998, modificato). E - Rappresentazione schematica delle cellule apicali del sacculo (podociti) di un rene labiale di *Campodea* sp. N, nucleo; p, pedicelli (da FRANÇOIS, 1998, modificato).

### L'INTESTINO POSTERIORE

Il retto è il tratto intestinale in cui si verifica un ulteriore controllo della osmoregolazione (BRADLEY, 1985). In *Periplaneta americana*, questo tratto è inte-

ressato ad un intenso movimento di acqua e ioni (WALL *et al.*, 1975). In molti insetti, tuttavia, il retto non appare particolarmente attivo in queste funzioni e serve piuttosto come deposito di urina e feci, prima che questi prodotti siano espulsi all'esterno.

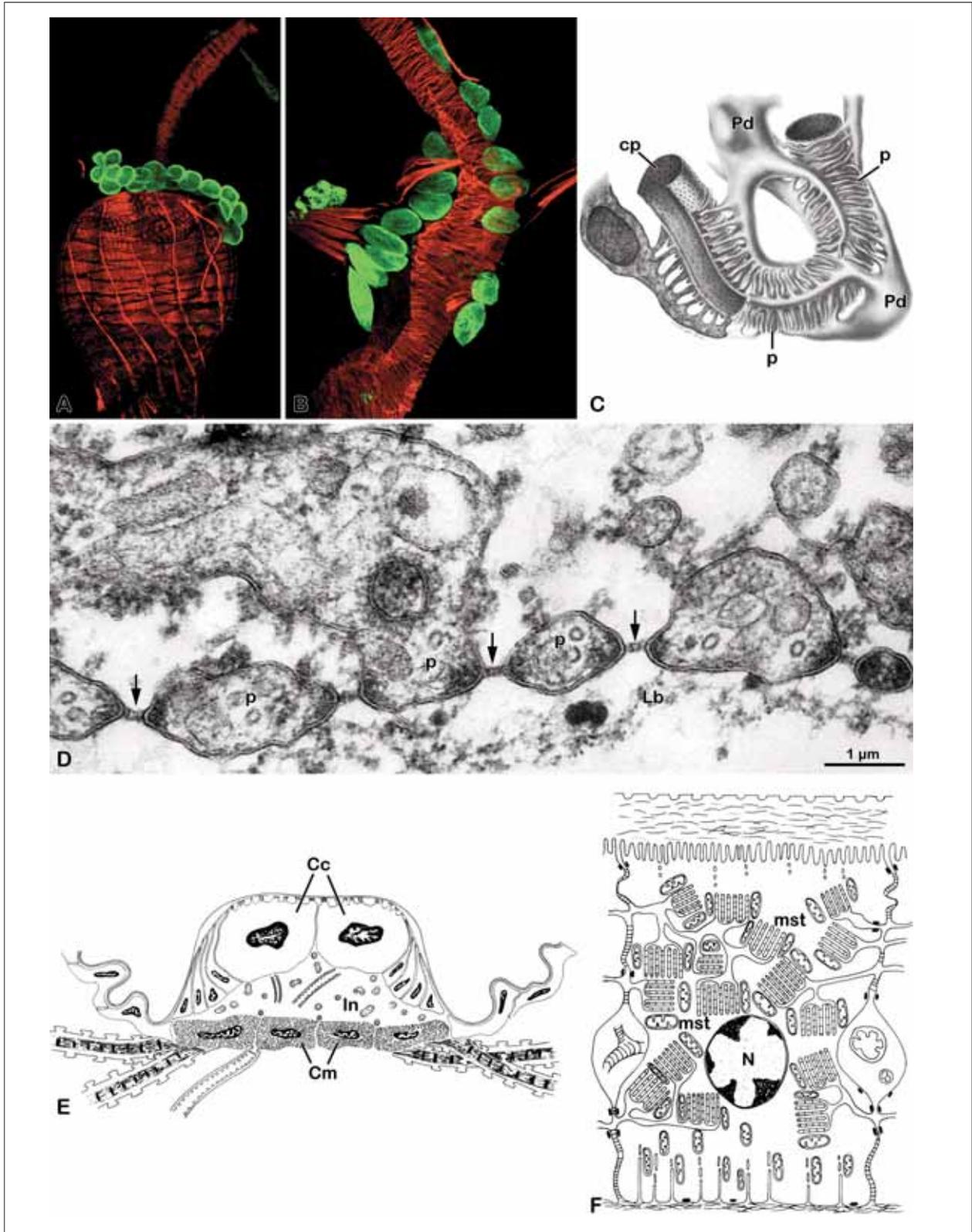


Fig. 5

A, B - Nefrociti periesofagei (A) e nefrociti pericardiaci (B), di una larva di *Drosophila* dopo trattamento con un anticorpo contro una glicoglobulina della famiglia Sticks e Stones (verde) e con falloidina per evidenziare i fasci muscolari contenenti actina (rosso) (per gentile concessione di DENHOLM e SKAER, 2009). C - Disegno schematico di podociti (Pd) con i loro numerosi pedicelli (p) nel glomerulo renale di un Vertebrato. cp, capillare fenestrato (da BLOOM e FAWCETT, 1970). D - Micrografia elettronica della regione periferica di un nefrocito di larva di *Ceratitis capitata*. Notare i pedicelli (p) fra i quali sono presenti delle fessure di filtrazione (freccie). Lb, lamina basale (da DALLAI *et al.*, 1994). E - Disegno schematico di una "rectal pad" del tricottero *Stenophylax permistus*. Notare al di sotto delle grandi cellule corticali (Cc), la cavità definita infundibulum (In), delimitata ventralmente dalle cellule medullari (Cm) (da CIANFICCONI *et al.*, 1985). F - Disegno schematico di una cellula della papilla rettale di *Ceratitis capitata*, per mostrare le particolari formazioni definite "membrane stacks" (mst) prodotte dalla associazione dei ripiegamenti della membrana plasmatica laterale con i mitocondri. A questo livello si localizza una forte attività ATPasica. (N, nucleo) (da DALLAI *et al.*, 1985).

In *Pieris brassicae* e vari Cicadidae per esempio, è la porzione più anteriore dell'intestino, l'ileo, ad essere interessata alla funzione di riassorbimento di  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  e urina prodotti dai Tubuli Malpighiani (CHEUNG e MARCHALL, 1973; Nicolson, 1976). In questi casi, le cellule epiteliali dell'ileo, di solito piccole, risultano ricche di mitocondri e la membrana plasmatica apicale appare ripetutamente invaginata e con attività ATPasica evidente.

L'organizzazione strutturale del retto è stata oggetto di molti studi, che hanno messo in luce come le variazioni osservate siano in relazione all'ambiente di vita dell'insetto e al tipo di filtrato prodotto dai Tubuli Malpighiani, nel senso che l'intestino retto è responsabile delle modificazioni finali dell'urina, prima della sua eliminazione all'esterno con le feci.

Se consideriamo quello che accade in un insetto a vita terrestre, per esempio una cavalletta, si può notare che i Tubuli Malpighiani producono un fluido isosmotico rispetto all'emolinfa, ricco di  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$  e povero di  $\text{Na}^+$ . Gli zuccheri e gli amminoacidi dell'emolinfa attraversano passivamente l'epitelio a bassa concentrazione. Molti composti organici tossici, non metabolizzabili, sono trasportati attivamente nel filtrato dei Tubuli Malpighiani. Il retto serve a mantenere l'omeostasi ionica, ed è pertanto impegnato nel recupero del  $\text{Cl}^-$  presente nel filtrato. A tale scopo il retto deve essere provvisto, nella membrana plasmatica apicale, di una pompa molto attiva per questo ione. Tale trasporto di  $\text{Cl}^-$  è indipendente dal  $\text{Na}^+$  e richiede basse concentrazioni di  $\text{K}^+$  nel lume. Questo ione sarà successivamente recuperato a livello del retto.

La ultrastruttura delle cellule apicali delle papille rettali ha evidenziato caratteristiche formazioni, le "membrane stacks", originate dalla associazione dei mitocondri presenti numerosi in questa regione ed i ripiegamenti della membrana plasmatica laterale di due cellule adiacenti (Fig. 5F); a questo livello, sono state messe in evidenza giunzioni intercellulari di tipo scalariforme ed una attiva ATPasi (BERRIDGE e GUPTA, 1968; BERRIDGE and OSCHMAN, 1972); molto verosimilmente queste specializzazioni sono la sede di un intenso trasporto ionico. Analogamente, nelle "rectal pads", i mitocondri prendono contatto con invaginazioni della membrana plasmatica laterale (OSCHMAN e WALL, 1969; DALLAI *et al.*, 1985a; 1985b). In entrambe le specializzazioni, assume molta importanza la presenza di uno spazio o lacuna (*infundibulum*), sottostante le cellule corticali della papilla o della "pad", delimitato ventralmente da uno strato di *cellule medullari* con struttura peculiare, caratterizzata da numerose invaginazioni della membrana plasmatica e da mitocondri (Fig. 5E). È stato ipotizzato che queste cellule posseggano una doppia polarità e che partecipino al processo di

osmoregolazione (CIANFICCONI *et al.*, 1985); esse potrebbero essere altresì coinvolte nel controllo ionico dei fluidi accumulati nell'infundibulo provenienti dal lume intestinale, e controllino il loro passaggio nell'emocele.

Il retto è dunque il tratto intestinale nel quale si attua il riassorbimento dei nutrienti e degli amminoacidi presenti nel lume prima della loro eliminazione all'esterno. Lo schema di filtrazione isosmotica a livello dei Tubuli Malpighiani, brevemente descritto, ed il riassorbimento selettivo nel retto, è ciò che accade in generale nel sistema escretore degli insetti. Attività particolari, diverse da quelle descritte, accadono nelle specie che vivono in ambienti diversi, ed in particolare in quelle che abitano acque salmastre iperosmotiche, come per esempio accade in specie del genere *Aedes*.

#### BIBLIOGRAFIA

- ALTNER H., 1968 - *Die ultrastruktur der Labialnephridien von Onychiurus quadricellatus (Collembola)*. - Journal Ultrastructure Research, 24: 349-366.
- BATE M., 1993 - *The mesoderm and its derivatives*. In: The Development of *Drosophila melanogaster*. M. Bates M. e Martinez-Arias A. (eds.). Cold Spring Harbor Lab. Plainview, N.Y., pp 1013-1090
- BERRIDGE M.J., GUPTA B.L., 1968 - *Fine structural localization of adenosine triphosphatase in the rectum of Calliphora*. - Journal of Cell Science, 3: 17-32.
- BERRIDGE M.G., OSCHMAN J.L., 1972 - *Transporting Epithelia*. Academic Press, N.Y., 91pp.
- BEYENBACH K.W., SKAER H., DOW J.A.T., 2010 - *The Developmental, Molecular, and Transport Biology of Malpighi Tubules*. - Annual Review of Entomology, 55: 351-374.
- BRADLEY T.J., SATIR P., 1979 - *Insect axopods*. - Journal of Cell Science, 35: 165-175.
- BRADLEY T.J., 1985 - *The Excretory System: Structure and Physiology*. In: Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology, Kerkut G.A and Gilbert L.I. (eds) vol. 4, pp.421-465.
- BRADLEY T.J., 1998 - *Malpighian Tubules*. In: Microscopic Anatomy of Invertebrates, Harrison F.W. and Locke M (eds.) vol.11B Insecta, Wiley-Liss Inc., pp.809-829.
- CHEUNG W.W.K., MARCHALL, A.T., 1973 - *Water and ion regulation in cicadas in relation to xylem feeding*. - Journal of Insect Physiology, 19: 1801-1816.
- CIANFICCONI F., CORALLINI SORCETTI C., MORETTI G., DALLAI R., 1985 - *Ultrastructural organization of the rectal pads in adult Stenophylax permistus McL. (Trichoptera)*. - Bollettino di Zoologia, 52: 375-391.
- CROSSLEY A.C., 1972 - *The ultrastructure and function of pericardial cells and other nephrocytes in an insect Calliphora erythrocephala*. - Tissue and Cell, 4: 529-560.
- DALLAI R., CALLAINI G., 1979 - *Comparative analysis of the Collembola pyloric region (Insecta, Apterygota)*. - Monitore Zoologico Italiano, 13: 45-66.
- DALLAI R., 1976a - *Septate and continuous junctions associated in the same epithelium*. - Journal Submicroscopic Cytology, 8: 163-174
- DALLAI R., 1976b - *Fine structure of the pyloric region and Malpighian papillae of Protura. (Insecta, Apterygota)*. - Journal of Morphology, 150: 727-762.

- DALLAI R., 1980 – *Considerations on Apterygota phylogeny*. - Bollettino di Zoologia, 47: 25-48.
- DALLAI R., BURRONI D., 1982 – *Fine structure of the pyloric region and Malpighian papillae of Diplura*. - Memorie della Società Entomologica Italiana, 60: 125-135.
- DALLAI R., MORETTI G., CIANFICCONI F., CORALLINI SORCETTI C., 1985 – *Freeze-fracture study of the rectal pads in Stenophylax permistus McL. (Trichoptera)*. - Bollettino di Zoologia, 52: 407-420.
- DALLAI R., SALVATICI P., FANCIULLI P.P., VEGNI TALLURI, M., 1985B – *Membrane specializations in the rectal papillae of Ceratitis capitata (Diptera)*. - Bollettino di Zoologia, 52: 195-202.
- DALLAI R., RIPARBELLI G., CALLAINI G., 1994 – *The cytoskeleton of the ventral nephrocytes of Ceratitis capitata larva*. - Cell and Tissue Research, 275: 529-536.
- DALLAI R., DEL BENE G., MARCHINI D., 1991 – *The ultrastructure of Malpighian Tubules and hindgut of Frankliniella occidentalis (Pergande) (Thysanoptera, Thripidae)*. - International Journal of Insect Morphology and Embryology, 20: 223-233.
- DENHOLM B., SKAER H., 2009 – *Bringing together components of the fly renal system*. - Current Opinion in Genetics and Development, 19: 526-532.
- DENHOLM B., SUDARSAN V., PASALODOS-SANCHEZ S., ARTERO R., LAWRENCE P., MADDRELL S., BAYLIES M., SKAER H., 2003 – *Dual origin of the renal tubules in Drosophila: mesodermal cells integrate and polarize to establish secretory function*. - Current Biology, 13: 1052-1057.
- DOW J.A.T., DAVIES S.A., 2001 – *The Drosophila melanogaster Malpighian tubule*. - Advances of Insect Physiology, 28: 1-83.
- FRANÇOIS J., 1998, – *Labial Kidney*. In: Microscopic Anatomy of Invertebrates, Harrison F.W. and Locke M. (Eds) vol. 11B Insecta, Wiley-Liss Inc., pp.831-840.
- GABE M., 1967 – *Donné histologiques sur le rein céphalique des Thysanoures (Insectes Aptérygotes)*. - Annales de la Société Entomologique Française, 3: 681-713.
- GAUTAM N.K., TAPADIA M.G., 2010 – *Ecdysone signalling is required for proper organization and fluid secretion of stellate cells in the Malpighian tubules of Drosophila melanogaster*. - International Journal of Developmental Biology, 54: 635-642.
- HAUPT J., 1969 – *Zur Feinstruktur der Labialniere des silberfischens Lepisma saccharina (Thysanura, Insecta)*. - Zoologische Beiträge, 15: 139-170.
- JUNG A.C., DENHOLM B., SKAER H., AFFOLTER M., 2005 – *Renal tubule development in Drosophila: a closer look at the cellular level*. - Journal of the American Society of Nephrology, 16: 322-328.
- KUMMEL G., 1967 – *Die Podozytien*. - Zoologische Beiträge, 13: 245-263.
- LACOMBE M., 1976 – *Zonula continua*. In: Mitteldarm und den Malpighischen gefassten von Honigbienen (Insecta, Hymenoptera). - Zoomorphologie, 85: 17-22.
- MADDRELL S.H.P., 1981 – *The functional design of the insect excretory system*. - Journal of Experimental Biology, 90: 1-15.
- MANDAL L., BANERJEE U., HARTENSTEIN V., 2004 – *Evidence for a fruit fly hemangioblast and similarities between lymph-glands haematopoiesis in fruit fly and mammal aorta-gonadal-mesonephros mesoderm*. - Nature Genetics, 36: 1019-1023.
- MORDUE W., GOLDSWORTHY G.J., BRADY J., BLANEY W.M., 1980 – *Insect Physiology*. - Blackwell Scientific Publications, Oxford, 108 pp.
- NICOLSON S.W., 1976 – *Diuresis in the cabbage white butterfly, Pieris brassicae: water and ion regulation and the role of the hindgut*. - Journal of Insect Physiology, 22: 1623-1630.
- NOBLE-NESBITT J., 1998 – *Hindgut with Rectum*. In: Microscopic Anatomy of Invertebrates; Harrison F.W. and Locke M. (eds.) vol.11B, Insecta Wiley-Liss Inc. pp 759-808.
- OSCHMAN J.L., WALL B.J., 1969 – *The structure of the rectal pads of Periplaneta Americana L. with regard to fluid transport*. - Journal of Morphology, 127: 475-510.
- PANNABECKER T.L., HAYES T.K., BEYENBACH, K.W., 1993 – *Regulation of epithelial shunt conductance by peptide leucokinin*. - Journal of Membrane Biology, 132: 63-76.
- RIECHMANN V., IRION U., WILSON, R., GROSSKORTENHAUS R., LEPTIN M. 1997 – *Control of cell fates and segmentation in the Drosophila mesoderm*. - Development, 124: 2915-2922.
- RUGENDORFF A., YOUNOSSI-HARTENSTEIN A., HARTENSTEIN V., 1994 – *Embryonic origin and differentiation of the Drosophila heart*. Roux's Archives of Developmental Biology, 266-280.
- SKAER H., HARRISON J.B., LEE W.M., 1979 – *Topographical variations in the structure of the smooth septate junction*. - Journal of Cell Science, 37: 373-389.
- WALL B.J., OSCHMAN J.L., SCHMIDT B.A., 1975 – *Morphology and function of Malpighian tubules and associated structures in the cockroach, Periplaneta americana* - Journal of Morphology, 146: 265-306.
- WEAVERS H., PRIETRO-SANCHE S., GRAWE F., GARCIA-LOPEZ A., ARTERO R., WILSCH-BRAUNINGER M., RUIZ-GÓMEZ M., SKAER H., DENHOLM B., 2009 – *The insect nephrocyte is a podocyte-like cell with filtration slit diaphragm*. - Nature, 457: 322-326.
- WIGGLESWORTH W.B., 1972 – *The principles of Insect Physiology*. 7<sup>th</sup> ed., London Chapman and Hall, 827 pp.
- Wigglesworth W.B., Salpeter M.M., 1962 – *Histology of the Malpighian tubules of Rhodnius prolixus Stal (Hemiptera)*. - Journal of Insect Physiology, 8: 299-307.

## LO STUDIO DEL RUOLO DEI TUBULI MALPIGHIANI

BARBARA GIORDANA (\*)

(\*) DiPSA, Università degli Studi di Milano, via Celoria 2, 20133 Milano

Lettura tenuta durante la Tavola rotonda «Struttura e funzioni dei Tubuli Malpighiani degli insetti» - Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 18 novembre 2011.

### *Functional studies on the roles of Malpighian Tubules*

From the first studies on the secretions collected from the Malpighian Tubules and the determination of their composition, to the isolation of the tubule *in vitro* in the "Ramsay assay", their microperfusion for correct electrophysiological measurements, to the recent genomic, transcriptomic and proteomic studies, for a deeper understanding of already known functions and for the discovery of new unexpected roles.

KEY WORDS: epithelial physiology, Malpighian Tubules *in vitro*, ion and water transport measurements, electrophysiology, functional genomics and integrative physiology.

Come verrà illustrato dagli interventi che seguiranno, i Tubuli Malpighiani sono stati identificati già dalle prime indagini come strutture epiteliali deputate alla regolazione ionica ed osmotica dei liquidi intracorporei dell'insetto e come organo escretore: studi successivi e recentissimi approcci sperimentali hanno però permesso di evidenziare molte nuove competenze.

Le successive relazioni mostreranno gli straordinari risultati ottenuti e i modelli cellulari e molecolari che descrivono alcuni dei ruoli, vecchi e nuovi, di questo epitelio. Qui si accennerà brevemente all'evoluzione delle tecniche sperimentali che hanno fornito i dati funzionali, che nel tempo hanno portato all'elaborazione dei complessi modelli ora proposti.

L'avvento della microscopia elettronica nella seconda metà del secolo scorso aveva fornito, a partire dagli anni '50, una notevole mole di informazioni sulla struttura delle membrane biologiche e degli epitelii in generale, ponendo ai fisiologi interessati a queste strutture nuovi interrogativi e creando l'esigenza di nuove tecniche per chiarire la loro funzione, come sede degli scambi di ioni e molecole tra l'ambiente interno dell'organismo e il mondo esterno. Le basi teoriche e sperimentali per lo studio della fisiologia del trasporto transepiteliale sono state poste all'inizio degli anni '50 del secolo scorso da Hans Ussing all'Università di Copenhagen (LARSEN, 2002). Ussing utilizzò la pelle di rana come epitelio modello, ed elaborò i fondamenti teorici per lo studio sperimentale del trasporto di ioni, chiarendo per primo le proprietà del trasporto attivo transepiteliale di sodio, un

processo praticamente ubiquitario mediato da quella che fu allora definita una "pompa" (USSING e ZERHAN, 1951), solo più tardi identificata con la sodio/potassio ATPasi. Ussing inventò un apparato sperimentale che ebbe grande fortuna, ed è tuttora largamente usato, definito convenzionalmente "Ussing chamber": sia la definizione di Ussing chamber che gli scopi per cui può essere utilizzata si ritrovano in Wikipedia, insieme con una foto dell'inventore. L'apparato, ora facilmente acquistabile, è costituito da due emicamere in mezzo alle quali viene interposto il tessuto epiteliale che si vuole studiare. Le soluzioni fisiologiche che bagnano i due lati dell'epitelio, di composizione variabile a seconda della provenienza del tessuto e del tipo di sperimentazione, sono collegate a una opportuna strumentazione elettrofisiologica per la misura della differenza di potenziale elettrico transepiteliale, e della corrente generata dal movimento degli ioni che attraversano l'epitelio. Il passaggio di ioni e molecole attraverso l'epitelio isolato può essere monitorato con una marcatura con radioisotopi o sonde fluorescenti.

Ussing è considerato il padre della fisiologia dei trasporti transepiteliali (LARSEN, 2002), ma negli stessi anni, un contributo fondamentale alla conoscenza dei meccanismi di trasporto di elettroliti e di acqua, così come delle complesse regolazioni ormonali cui questi movimenti sono soggetti, veniva sviluppato nella Unit of Insect Physiology (Zoology Department, Cambridge University, U. K.) diretta da Sir Vincent Wigglesworth, il padre della moderna fisiologia degli insetti, grazie alla messa a punto di un preparato sperimentale molto

ingegnoso per la sperimentazione su una struttura tubulare di minime dimensioni come sono appunto i Tubuli del Malpighi. Lo studio della funzione dei tubuli a Cambridge era stato iniziato prima della II guerra mondiale proprio da Wigglesworth (WIGGLESWORTH, 1931 a, b, c). Successivamente, Wigglesworth dedicò la maggior parte del suo impegno scientifico allo studio degli ormoni che regolano la metamorfosi, ma mantenne il suo interesse per i Tubuli Malpighiani, pubblicando una prima descrizione al TEM della morfologia fine dell'epitelio tubulare e del ruolo dei tubuli nella escrezione di acido urico (WIGGLESWORTH e SALPETER, 1962).

Presso la Unit of Insect Physiology, che nel corso degli anni ha ospitato per periodi di studio molti insigni entomologi, la sperimentazione sui Tubuli Malpighiani fu attivamente proseguita da J. Arthur Ramsay, che nel 1954 pubblicò un lavoro in cui presentava una brillante soluzione tecnica per il loro studio funzionale: l'apparato sperimentale descritto (RAMSAY, 1954) era costituito da un recipiente in vetro con la base ricoperta da uno strato di cera, in cui veniva versata paraffina liquida a ricoprire una goccia di liquido, costituito nel lavoro originale da emolinfa di *Carausius morosus*, il fasmide da cui provenivano i tubuli in studio. Il tubulo dissezionato dall'insetto era immerso nella goccia di emolinfa e la sua parte aperta prossimale, corrispondente allo sbocco a livello della giunzione tra intestino medio e posteriore, era immersa nella paraffina. Via via che il tubulo secerneva fluido, si formava una goccia di secreto di dimensioni crescenti al capo aperto: la quantità di fluido prodotto nel tempo veniva calcolata misurando al microscopio binoculare il raggio della goccia sferica che si formava e che aumentava via via di dimensione. La composizione ionica del fluido secreto poteva essere continuamente determinata rimuovendone piccole quantità. Ramsay ritenne necessario introdurre anche una piccola bolla di ossigeno in prossimità del liquido che bagnava il tessuto per garantirne l'ossigenazione, condizione che successivamente si rivelò inutile e che fu quindi abbandonata. Sperimentazioni successive (MADDRELL, 1969) chiarirono anche che non era necessario inserire il tubulo in emolinfa e che l'organo manteneva una buona sopravvivenza se immerso in soluzioni fisiologiche di opportuna composizione.

Un decennio più tardi, questa tecnica fu utilizzata, sempre a Cambridge, anche da Michael J. Berridge (1964), che negli anni a venire diventerà molto noto per i suoi successivi studi sul ruolo dell'inositolo trifosfato e del calcio come secondi messaggeri intracellulari (BERRIDGE, 2005). Ber-

ridge applicò la medesima tecnica anche a un'altra struttura epiteliale di minime dimensioni, i tubuli che formano le ghiandole salivari, avviando lo studio della regolazione ormonale della secrezione e delle vie intracellulari di trasmissione del segnale (BERRIDGE, 1968).

Nella recentissima fotografia visibile nel sito <http://www6.ufrgs.br/laprotox/en/what-we-do/research-lines/ureases-non-catalytic-properties/insecticidal-activity-0>, il "Ramsay assay" è applicato allo studio di un Tubulo Malpighiano dell'emittero *Rhodnius prolixus*, insetto ematofago in cui, dopo un pasto di sangue, i tubuli sono in grado di aumentare di più di 1000 volte la velocità di secrezione, così da riuscire a smaltire rapidamente l'ingente quantità di fluido ingerito con il pasto. Questi tubuli di grandi dimensioni furono oggetto di studio già nel 1931 da parte di WIGGLESWORTH (1931 a, b, c,) e in seguito, sempre a Cambridge, da parte di Simon H. Maddrell, che ha pubblicato fino a oggi numerosissimi lavori sulla identificazione funzionale dei meccanismi coinvolti nella secrezione di acqua e ioni e, specialmente, sulla complessa regolazione ormonale che modula la quantità di fluido prodotto (MADDRELL, 2003, 2009). MADDRELL (1969) perfezionò l'apparato sperimentale di Ramsay, rendendolo più simile a quello attualmente in uso, in modo da rendere più facile l'osservazione e la misura della secrezione di fluido in più tubuli, o in porzioni di tubuli, sperimentando su numerosi tubuli (fino a 20) contemporaneamente. Utilizzando soluzioni fisiologiche con composizioni ioniche opportunamente modificate e vari tipi di inibitori classici, Maddrell dimostrò funzionalmente nel lavoro citato che il fluido secreto in seguito a stimolazione da parte di un ormone diuretico, era isosmotico e che la sua composizione ionica suggeriva la presenza nell'epitelio di specifici trasportatori.

Ben presto vennero anche sviluppate, prima da Berridge (BERRIDGE e PRINCE, 1972) e poi da Maddrell (O'DONNELL e MADDRELL, 1984), tecniche opportune per misurare la differenza di potenziale elettrico generato dall'epitelio tubulare, tecniche in seguito riesaminate e perfezionate da ISAACSON e NICOLSON (1989). I fondamenti teorici e il complesso sistema sperimentale per le misure elettrofisiologiche attualmente in uso in diversi laboratori, è stato però elaborato più recentemente da Klaus Beyenbach e il suo gruppo alla Cornell University (Ithaca, USA), nel corso delle loro numerose ricerche sui movimenti ionici e di fluido, e sugli ormoni e i neuropeptidi che controllano la secrezione, nei Tubuli Malpighiani di *Aedes aegypti* (PANNABECKER *et al.*, 1992; YU e BEYENBACH, 2002; WU e BEYENBACH, 2003;

BEYENBACH, 2003; BEYENBACH e PIERMARINI, 2011). Nella sua Review del 2003, Beyenbach sottolinea l'attualità del "Ramsay assay" per una esatta determinazione *in vitro* della quantità e della composizione del fluido secreto dal tubulo, ed evidenzia l'importanza della microperfezione del tubulo per ottenere corrette misure elettrofisiologiche (come già anticipato da ISAACSON e NICOLSON nel 1989). Le strumentazioni necessarie per la raccolta dei dati, e il modello dell'attività funzionale dell'epitelio risultante dall'elaborazione dei risultati ottenuti, sono chiaramente schematizzati in una figura riportata nel lavoro di YU e BEYENBACH (2002), in cui è messa bene in evidenza l'importanza per il ruolo funzionale del tubulo dei due tipi cellulari che formano l'epitelio di *Aedes aegypti*, le cellule principali e le cellule stellate. Il preparato sperimentale prevede che il tratto di tubulo di interesse venga dissezionato e che le due estremità vengano fatte aderire a due micropipette, attraverso le quali fluisce la soluzione che perfonde il lume del tubulo. All'interno di una delle due pipette è presente l'elettrodo che serve per misurare la differenza di potenziale elettrico transepiteliale, e un secondo elettrodo che permette di iniettare corrente elettrica, per determinare la resistenza elettrica totale del tessuto. Un microelettrodo convenzionale impala una cellula principale e permette di misurare il voltaggio sia a livello della membrana plasmatica apicale che basolaterale, e di valutare le rispettive resistenze. Parallelamente, viene calcolata anche la resistenza della via paracellulare, costituita dal complesso giunzionale tra le cellule epiteliali adiacenti. Tutte le misure sono determinate rispetto al microelettrodo di terra posto nel fluido peritubulare, in cui è immerso il tubulo microperfuso. I dati raccolti permettono l'elaborazione del circuito elettrico equivalente della secrezione transepiteliale degli elettroliti coinvolti nel trasporto transepiteliale.

I numerosi risultati ottenuti con l'approccio elettrofisiologico hanno portato a una descrizione accurata dei movimenti ionici che hanno luogo a livello della membrana plasmatica rivolta verso l'emolinfa o verso il lume tubulare, alla identificazione del diverso ruolo svolto dalle cellule principali, dalle cellule stellate e dalle giunzioni settate nella permeazione degli ioni, e alla comprensione del rapido modificarsi degli eventi cellulari che portano a un ampio incremento della secrezione tubulare in presenza di neuropeptidi e ormoni diuretici (BEYENBACH, 2003; BEYENBACH e PIERMARINI, 2011).

Julian Dow entra nel laboratorio di Maddrell a Cambridge nel 1977 e, pur collaborando con lui

fino a tempi relativamente recenti (DOW *et al.*, 1994), prosegue autonomamente la ricerca sui Tubuli Malpighiani all'Università di Glasgow (U. K.), applicando oltre alle tecniche tradizionali fin qui viste, i nuovi approcci sperimentali che seguono all'era della genomica: la trascrittomica, la proteomica e la metabolomica. Con la collega Shireen Davies, Dow sottolinea nei suoi scritti (DOW e DAVIES, 1999, 2003, 2006; DOW, 2007), e dimostra nelle sue recenti sperimentazioni (DOW e DAVIES, 2006;), la sostanziale convergenza tra gli strumenti della genomica funzionale, che mira alla comprensione della funzione di ogni gene presente nel genoma, e gli scopi della "integrative physiology", intesa come lo studio di come i prodotti genici sono tra loro coordinati in cellule e tessuti per svolgere precise funzioni integrate nell'intero organismo.

Sia l'approccio sperimentale *in vitro* tradizionale a livello di organo, tessuto, cellula e molecola, che lo studio della funzione attraverso il silenziamento o la modificazione del gene, hanno portato, come descritto nei contributi che seguono, a una più profonda comprensione del ruolo già noto svolto dai Tubuli Malpighiani (BEYENBACH *et al.*, 2009, 2011; DOW e DAVIES, 2006; BEYENBACH *et al.*, 2010), e alla identificazione di nuovi inaspettati compiti (MCGETTIGHAN *et al.*, 2005; DOW e DAVIES, 2006; CHAHINE e O'DONNELL, 2011; LABBÈ *et al.*, 2011).

#### RIASSUNTO

Dai primi studi sul volume e la composizione del fluido prodotto a livello della porzione distale del Tubulo Malpighiano, al suo isolamento *in vitro* nel "Ramsay assay", alla microperfezione tubulare e l'applicazione di corrette misure elettrofisiologiche, fino ai recenti studi trascrittomici e proteomici che hanno portato a una più profonda comprensione del ruolo omeostatico ed escretorio del tubulo e alla scoperta di nuove inaspettate funzioni.

#### BIBLIOGRAFIA

- BERRIDGE M.J., 1965 - *The physiology of excretion in the cotton stainer Dysdercus fasciatus Signoret. III. Nitrogen excretion and ionic regulation.* - J. Exp. Biol., 43: 535-52.
- BERRIDGE M.J., 2005 - *Unlocking the secrets of cell signaling.* - Annu. Rev. Physiol. 67: 1-21.
- BERRIDGE M.J., PATEL N.G., 1968 - *Insect salivary glands: stimulation of fluid secretion by 5-hydroxytryptamine and cyclic AMP.* - Science, 162: 462-63.
- BERRIDGE M.J., PRINCE W.T., 1972 - *Transepithelial potential changes during stimulation of isolated salivary glands with 5-hydroxytryptamine and cyclic AMP.* - J. Exp. Biol., 56: 139-153.
- BEYENBACH K.W., 2003 - *Transport mechanisms of diuresis in Malpighian tubules of insects.* - J. Exp. Biol., 206: 3845-3856.
- BEYENBACH K.W., SKAER H., DOW J.A.T., 2010 - *The*

- developmental, molecular and transport biology of Malpighian tubules.* - Annu. Rev. Entomol., 55: 351-374.
- BEYENBACH K.W., BAUMGART S., LAU K., PIERMARINI P.M., ZHANG, S., 2009 - *Signaling to the apical membrane and to the paracellular pathway: changes in the cytosolic proteome of Aedes Malpighian tubules.* - J. Exp. Biol., 212: 329-340.
- BEYENBACH K.W., PIERMARINI P.M., 2011 - *Transcellular and paracellular pathways of transepithelial fluid secretion in Malpighian (renal) tubules of the yellow fever mosquito Aedes aegypti.* - Acta Physiologica, 202: 387-407.
- CHAHINE S., O'DONNELL M.J., 2011 - *Interactions between detoxification mechanisms and excretion in Malpighian tubules of Drosophila melanogaster.* - J. Exp. Biol., 214: 462-468.
- DOW J.A.T, DAVIES S.A., 1999 - *The Drosophila Malpighian tubule: an epithelial model for integrative physiology.* - Comp Biochem Physiol., A124: S49-S49.
- DOW J.A.T, DAVIES S.A., 2003 - *Integrative physiology and functional genomics of epithelial function in a genetic model organism.* - Physiol. Rev., 83: 687-729.
- DOW J.A.T., 2007 - *Integrative physiology, functional genomics and the phenotype gap: a guide for comparative physiologists.* - J. Exp. Biol., 210: 1632-1640.
- DOW J.A.T., DAVIES S.A., 2006 - *The Malpighian tubule: rapid insights from postgenomic biology.* - J. Insect Physiol., 52: 365-378.
- DOW J.A.T., MADDRELL S. H. P., GÖRTZ A., SKAER N.V., BROGAN S., KAISER, K., 1994 - *The Malpighian tubules of Drosophila melanogaster: a novel phenotype for studies of fluid secretion and its control.* - J. Exp. Biol., 197: 421-428.
- ISAACSON L., NICOLSON S., 1989 - *A reappraisal of the oil-gap technique for the measurement of transtubular potentials in insect epithelia.* - J. exp. Biol., 141: 429-440.
- LABBÉ R., CAVENEY S., DONLY C., 2011 - *Expression of multidrug resistance proteins is localized principally to the Malpighian tubules in larvae of the cabbage looper moth, Trichoplusia ni.* - J. Exp. Biol., 214: 937-944.
- LARSEN E.H., 2002 - *H. H. Ussing - scientific work: contemporary significance and perspectives.* - Biochim. Biophys. Acta, 1566: 2-12.
- MADDRELL S.H.P., 1963 - *Excretion in the blood-sucking bug Rhodnius prolixus Stal. I. The control of diuresis.* - J. Exp. Biol., 40: 247-256.
- MADDRELL S.H.P., 2009 - *Insect homeostasis: past and future.* - J. Exp. Biol., 212: 446-451.
- MCGETTIGAN J., MCLENNAN R.K.J., BRODERICK K.E., KEAN L., ALLAN A.K., CABRERO P., REGULSKI M.R., POLLOCK V.P., GOULD G.W., DAVIES S.A., DOW J.A.T., 2005- *Insect renal tubules constitute a cell-autonomous immune system that protects the organism against bacterial infection.* - Insect Biochem. Mol. Biol. 35, 741-754.
- O'DONNELL J.M., MADDRELL S.H.P., 1984 - *In vitro techniques for studies of Malpighian tubules.* In: Measurement of Ion Transport and Metabolic Rate in Insects. (ed. T.J. Bradley, T.A. Miller), pp. 5-18. New York: Springer-Verlag.
- PANNABECKER, T.L., ANESHANSLEY, D.J., BEYENBACH, K.W., 1992 - *Unique electrophysiological effects of dinitrophenol in Malpighian tubules.* - Am. J. Physiol. 263: R609-R614.
- RAMSAY J.A., 1954 - *Active transport of water by the Malpighian tubules of the stick insect, Dixippus morosus (Orthoptera; Phasmidae).* - J. Exp. Biol., 31: 104-113.
- USSING H. H., ZERAHN K., 1951 - *Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin.* - Acta Physiol. Scand. 23: 110-127.
- WIGGLESWORTH V.B., 1931a-*The physiology of excretion in a blood-sucking insect Rhodnius prolixus (Hemiptera, Reduviidae). I. Composition of the urine.* - J. Exp. Biol. 8: 411-427.
- WIGGLESWORTH V.B., 1931b- *The physiology of excretion in a blood-sucking insect Rhodnius prolixus (Hemiptera, Reduviidae). II. Anatomy and histology of the excretory system.* - J. Exp. Biol., 8: 428-441.
- WIGGLESWORTH V.B., 1931c - *The physiology of excretion in a blood-sucking insect Rhodnius prolixus (Hemiptera, Reduviidae). III. The mechanism of uric acid excretion.* - J. Exp. Biol., 8: 443-451.
- WIGGLESWORTH V.B., SALPETER M.M., 1962 - *Histology of the Malpighian tubules in Rhodnius prolixus Stal. (Hemiptera).* - J. Insect Physiol., 8: 299-230.
- WU D.S., BEYENBACH K.W., 2003 - *The dependence of electrical transport pathways in Malpighian tubules on ATP.* - J. Exp. Biol., 206: 233-243
- YU M.J., BEYENBACH K.W., 2002 - *Leucokinin activates Ca<sup>2+</sup>-dependent signal pathway in principal cells of Aedes aegypti Malpighian tubules.* - Am J. Physiol. 283: F499-F508.

## I TUBULI MALPIGHIANI NEI PROCESSI DI DETOSSIFICAZIONE E DIFESA

MORENA CASARTELLI (\*)

(\*) *Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Milano, via Celoria 26, 20133 Milano; morena.casartelli@unimi.it*  
Lettura tenuta durante la Tavola rotonda «Struttura e funzioni dei Tubuli Malpighiani degli insetti» - Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 18 novembre 2011.

### *Role of Malpighian Tubules in detoxification processes and immunity*

The Malpighian tubules and the rectum form the key excretory and osmoregulatory organs of the insect. Recently, functional genomic studies performed in *Drosophila melanogaster* have uncovered new tubules functions. Microarray analysis shows that organic solutes transporters dominate tubule transcriptome, a clear indication that this organ has the ability to excrete a wide range of organic solutes and xenobiotics. Moreover, the tubule expresses very high levels of cytochrome P450s and glutathione-S-transferases. These evidences are a clear indication that the tubule plays a major role in metabolism and detoxification of both endogenous organic solutes and xenobiotics, such as insecticides.

In addition, the tubules are involved in the immune response. This organ is capable of sensing bacterial challenge and mounting an effective killing response by secretion of antimicrobial peptides, entirely independent of the fat body, the canonical immune tissue.

KEY WORDS: Malpighian Tubules; *Drosophila*; excretion of organic solutes; detoxification; antimicrobial peptides.

Negli insetti i Tubuli Malpighiani, insieme all'intestino posteriore, rappresentano le strutture deputate all'osmoregolazione e all'escrezione. I meccanismi di trasporto coinvolti nella produzione dell'urina primaria e quelli responsabili del riassorbimento di acqua, ioni e altri soluti a livello del retto sono stati ben caratterizzati così come la loro regolazione ad opera di specifici neuropeptidi (BEYENBACH e PIERMARINI, 2011; BEYENBACH *et al.*, 2010; BEYENBACH *et al.*, 2009; YU e BEYENBACH, 2004).

Recentemente è emerso che i Tubuli Malpighiani svolgono altre funzioni oltre a quelle tradizionalmente attribuite a questo organo. Essi hanno infatti un ruolo importante anche nei processi di detossificazione e nella risposta immunitaria. Il coinvolgimento dei tubuli in questi processi è emerso soprattutto grazie a studi di genomica funzionale. In tali ricerche è stato utilizzato come organismo modello *Drosophila melanogaster*, insetto che per differenti ragioni, alcune delle quali qui di seguito elencate, rappresenta un ottimo animale modello per questo tipo di indagini. 1) Il suo genoma è stato completamente sequenziato. Disporre di un genoma interamente sequenziato offre molti vantaggi se si considera che la genomica funzionale si basa sulla trascrittomica e sulla proteomica. Le analisi mediante microarray per esaminare il profilo di espressione di un gene o per identificare una proteina sulla base di una breve sequenza, sono operazioni relativamente

semplici e rapide se si dispone di un genoma interamente sequenziato. 2) Gli approfonditi studi di genetica eseguiti in questo insetto hanno permesso di avere oggi a disposizione circa 20.000 mutanti, un numero impressionante se si considera che il suo genoma contiene circa 14.000 geni. Gli enormi progressi nella manipolazione genica di questo insetto permettono oggi di silenziare o overesprimere uno specifico gene esclusivamente in un determinato tessuto o addirittura in un determinato tipo cellulare presente in un tessuto. 3) Infine, i risultati ottenuti in *D. melanogaster* sono generalmente validi anche per altre specie di insetto, condizione fondamentale perché un organismo possa essere considerato un valido modello.

Come la genomica funzionale ha permesso di chiarire il coinvolgimento dei Tubuli Malpighiani nei processi di detossificazione? Mediante microarray è stato possibile stabilire quali geni presentano elevati livelli di espressione in questo organo e quali hanno un elevato fattore di arricchimento, indice del fatto che svolgono uno specifico ruolo nei tubuli (WANG *et al.*, 2004; DOW e DAVIES, 2006). Tra i 50 geni maggiormente espressi figurano, come atteso, molti geni costitutivi (housekeeping genes), ossia geni che vengono attivamente trascritti e tradotti ad un livello relativamente elevato e che codificano per proteine ed enzimi fondamentali per la vita di ogni cellula. Ma se non si considera questa categoria, i geni più rappresentati tra i primi 50 codificano per traspor-

tatori di soluti organici. Questa categoria di proteine è particolarmente rappresentata anche nella top 50 dei geni che presentano un elevato fattore di arricchimento. Il coinvolgimento dei Tubuli Malpighiani nell'escrezione di soluti organici non è un dato sorprendente perché è noto da tempo che questo organo è coinvolto nell'eliminazione di metaboliti secondari e di sostanze tossiche. Gli studi funzionali volti a chiarire il meccanismo coinvolto sono però scarsi, perché i gruppi di ricerca interessati allo studio di questo organo hanno maggiormente concentrato l'attenzione sul trasporto di ioni e acqua. Per questa ragione i dati emersi dagli studi di genomica funzionale sono particolarmente interessanti e fanno riflettere sulla possibilità che la clearance dei soluti organici potrebbe in realtà essere uno dei ruoli più importanti svolto dai tubuli. Occorre anche tenere presente che queste strutture formano l'urina primaria, un liquido isosmotico che solo grazie all'intervento del retto può raggiungere una osmolarità differente da quella dell'emolinfa. Nei processi di osmoregolazione la formazione dell'urina primaria rappresenta quindi solo la prima tappa, mentre è indispensabile per l'eliminazione dei soluti organici. Lo scarso interesse nei confronti dell'escrezione dei soluti organici è dipeso anche dal fatto che storicamente tale processo è stato considerato un meccanismo dipendente esclusivamente dal movimento di liquido attraverso l'epitelio dei tubuli, considerato un epitelio "leaky", ossia un epitelio con una via paracellulare particolarmente permeabile, attraverso cui potevano quindi permeare, insieme all'acqua, anche composti organici. Si riteneva che tali sostanze potessero muoversi per diffusione passiva attraverso questa via di permeazione, avendo sempre a disposizione un gradiente favorevole per il loro movimento dall'emolinfa al lume del tubulo, dove la loro concentrazione era costantemente mantenuta bassa dal continuo fluire di liquido lungo il lume del tubulo stesso. Oggi però questa teoria non è più valida. Ciò dipende dal fatto che sono state identificate differenti famiglie di trasportatori che mediano un trasporto attivo di soluti organici, che tali trasportatori sono stati recentemente caratterizzati dal punto di vista funzionale nei Tubuli Malpighiani (LINTON e O'DONNELL, 2000; TORRIE *et al.*, 2004; O'DONNELL, 2009) e che, come precedentemente descritto, presentano elevati livelli di espressione in questo organo. Inoltre, come dimostrato da BAYENBACH (2003 a, b), i Tubuli Malpighiani sono in realtà un epitelio "tight", ossia un epitelio con una via paracellulare poco permeabile, sebbene con valori della resistenza transepiteliale piuttosto bassi, caratteristica propria degli epitelii "leaky".

Tali valori di resistenza non sono da imputare ad una elevata permeabilità attraverso la via paracellulare, ma dipendono dall'attività della pompa protonica espressa sulla membrana apicale delle cellule epiteliali del tubulo che estrude, con estrema efficienza e con grande dispendio di ATP,  $H^+$  nel lume tubulare. Ciò che rende questo epitelio a bassa resistenza non è quindi un'elevata permeabilità della via paracellulare, ma è l'elevata permeabilità ionica attraverso la via transcellulare, in cui domina l'attività della pompa protonica. La presenza di specifici trasportatori per i soluti organici nell'epitelio dei tubuli assicura una clearance più efficace di un'ampia gamma di metaboliti e xenobiotici rispetto a quella che si avrebbe se l'unico meccanismo coinvolto fosse la diffusione attraverso la via paracellulare. Inoltre, la scarsa permeabilità di questa via di permeazione riduce il possibile flusso di queste sostanze nella direzione contraria, ossia dal lume all'emolinfa, e la presenza di specifici trasportatori permette, mediante la regolazione della loro espressione, un fine controllo della funzionalità dell'epitelio. Grazie agli studi di genomica funzionale è stato anche possibile stabilire quali sono i trasportatori per soluti organici espressi ad elevati livelli nei Tubuli Malpighiani. Tra questi vanno ricordate le proteine di trasporto appartenenti alla superfamiglia ATP-Binding Cassette, alla classe dei trasportatori per i cationi organici, a quella dei trasportatori per gli anioni organici e alla classe dei *Multidrug efflux transporters*. Questi trasportatori hanno una bassa specificità di substrato, possono legare e traslocare attraverso le membrane molecole anioniche, cationiche o neutre, e spesso le differenti classi mostrano una parziale sovrapposizione nella specificità di substrato. Tra i ligandi di queste proteine possiamo ricordare ormoni, nucleotidi ciclici, prodotti del metabolismo secondario, ma anche xenobiotici. Molti di questi trasportatori sono coinvolti nell'escrezione di sostanze tossiche, inclusi gli insetticidi, e sono particolarmente interessanti perché possibili responsabili di fenomeni di resistenza (DOW e DAVIES, 2006; LESPINE *et al.*, 2006; LABBÉ *et al.*, 2011) e perché possono rappresentare un possibile target per il controllo degli insetti.

La presenza nei Tubuli Malpighiani di trasportatori per i soluti organici ha permesso di chiarire la resistenza dei tubuli stessi all'ouabaina (TORRIE *et al.*, 2004), un glicoside di origine vegetale, che blocca la  $Na^+/K^+$  ATPasi, a cui risultano insensibili molti tessuti epiteliali degli insetti. La pompa  $Na^+/K^+$  ATPasi è un trasportatore espresso ad alti livelli nella membrana basolaterale delle cellule principali del tubulo e ha un importante ruolo nella funzionalità di questo organo. Infatti, sebbe-

ne una mutazione letale in uno dei due alleli che codifica per la subunità alfa di questo trasportatore non determini effetti significativi sulla velocità di secrezione basale, la presenza di una sola copia funzionale del gene causa una importante riduzione della risposta del tubulo in seguito a stimolazione con neuropeptidi diuretici. Come precedentemente sottolineato, la pompa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasi espressa nei Tubuli Malpighiani è insensibile all'ouabaina e quindi la funzionalità di questo organo non viene alterata da questo metabolita delle piante altamente tossico. È stato dimostrato che la resistenza alla ouabaina nei tubuli di *Drosophila* è determinata dalla sua attiva escrezione ad opera di proteine di trasporto appartenenti alla classe dei trasportatori per gli anioni organici (OATP, Organic Acid Transporter Proteins) (TORRIE *et al.*, 2004). Come precedentemente sottolineato, questi trasportatori, nonostante il nome, hanno una bassa specificità di substrato e traslocano substrati anionici, cationici e neutri. L'evidenza che i Tubuli Malpighiani abbiano meccanismi attivi di escrezione potenzialmente in grado di eliminare una ampia gamma di soluti organici, incluse sostanze potenzialmente tossiche, rende centrale il ruolo dei tubuli nei processi di detossificazione. Inoltre, in questo organo sono espressi ad alti livelli e mostrano un importante fattore di arricchimento anche geni che codificano per enzimi coinvolti nelle fasi I e II dei meccanismi di detossificazione (WANG *et al.*, 2004; DOW e DAVIES, 2006). Tra questi vanno ricordati geni che codificano per enzimi appartenenti alla famiglia dei citocromo P450, coinvolti nella fase I, e geni che codificano per differenti glutatione-transferasi, enzimi detossificanti di fase II. Considerando che i Tubuli Malpighiani formano l'urina primaria, essi rappresentano il tessuto ideale per monitorare la "qualità" dell'emolinfa e per svolgere quindi un'efficace attività di detossificazione mediante la metabolizzazione delle molecole tossiche e la loro eliminazione per escrezione, che rappresenta la fase III del processo di detossificazione.

Le potenziali capacità detossificanti dei Tubuli Malpighiani hanno suscitato particolare interesse anche perché in molti insetti la resistenza agli insetticidi è stata attribuita all'overespressione di enzimi coinvolti nei processi di detossificazione dagli xenobiotici (FEYEREISEN, 1995). In *Drosophila melanogaster* numerosi citocromo P450 e glutatione-transferasi sono coinvolti nella resistenza al DDT e a insetticidi di nuova generazione, come i neonicotinoidi o i piretroidi (FEYEREISEN, 1995, 1999; DABORN *et al.*, 2002; BOGWITZ *et al.*, 2005). Quindi accanto al corpo grasso, organo tradizionalmente considerato responsabile dei pro-

cessi di detossificazione, anche i Tubuli Malpighiani sembrano svolgere un ruolo importante. In un recente lavoro è stata monitorata, in differenti tessuti di *Drosophila*, l'espressione del gene *Cyp6g1* che codifica per un citocromo P450 (YANG *et al.*, 2007). Questo enzima è espresso in differenti tessuti (corpo grasso, intestino medio, ghiandole salivari, cuticola), ma presenta livelli di espressione particolarmente elevati nei Tubuli Malpighiani. Inoltre, il silenziamento di questo gene esclusivamente nelle cellule principali del tubulo, rende l'insetto molto più sensibile al DDT, e la sua overespressione in queste cellule conferisce all'insetto una maggiore capacità di sopravvivenza dopo trattamento con l'insetticida. Al contrario, il silenziamento del gene in altri tessuti, come ad esempio il corpo grasso, non determina variazioni della sensibilità dell'insetto al DDT. Questi dati indicano che, sebbene il gene *Cyp6g1* sia espresso in differenti tessuti, la manipolazione dei livelli di espressione esclusivamente nei Tubuli Malpighiani influenza la sopravvivenza dell'insetto, altra evidenza che attribuisce a questo organo una funzione primaria nei processi di detossificazione.

Sebbene sia noto da tempo che i Tubuli Malpighiani degli insetti siano in grado di eliminare le molecole tossiche e che esposizioni a tali sostanze, sia naturali che di sintesi, siano associate ad un aumento dell'attività degli enzimi detossificanti, solo recentemente in *D. melanogaster* è stata dimostrata una stretta connessione tra il metabolismo delle sostanze tossiche mediata dagli enzimi detossificanti e i processi di escrezione (CHAHINE e O'DONNELL, 2011). In particolare, la somministrazione orale di sostanze tossiche determina nei Tubuli Malpighiani una alterazione nell'espressione di geni che codificano per enzimi detossificanti e un contemporaneo aumento dell'attività dei trasportatori per i soluti organici. In questo organo avviene quindi una fine regolazione che permette di ottimizzare l'eliminazione delle sostanze tossiche.

Come sottolineato in precedenza, è stato recentemente dimostrato che i Tubuli Malpighiani svolgono un ruolo importante anche nella risposta immunitaria. Negli insetti la prima linea di difesa è rappresentata dai tessuti epiteliali in diretto contatto con l'ambiente esterno (epidermide e intestino). Questi epitelii non rappresentano solo una barriera fisica, ma sono anche capaci di produrre peptidi antimicrobici e quindi hanno un ruolo attivo nella risposta immunitaria. I patogeni che riescono comunque a superare queste barriere epiteliali devono poi fronteggiare nell'emolinfa le reazioni di difesa cellulari (STRAND, 2008) ed umorali (IMLER e BULET, 2005). Le prime includono la fagocitosi e l'incapsulamento, le seconde

prevedono l'attivazione di cascate proteolitiche che, nei tessuti immuno-competenti (corpo grasso ed emociti), portano all'attivazione di pathway intracellulari del segnale che attivano la produzione di peptidi antimicrobici. Uno di questi pathway, denominato Imd, viene attivato in risposta ad una infezione di batteri Gram-negativi e di alcuni Gram-positivi e porta alla produzione di differenti peptidi antimicrobici, tra cui la diptericina. Il gruppo di ricerca guidato dal prof. J.A.T. Dow ha recentemente dimostrato che i Tubuli Malpighiani di *D. melanogaster* rappresentano un tessuto immuno-competente in grado di rilevare un attacco batterico e di mediare in modo indipendente un'efficace risposta immunitaria (MCGETTIGAN *et al.*, 2005). I tubuli di *Drosophila* esprimono costitutivamente bassi livelli di numerosi peptidi antimicrobici, senza nessun arricchimento rispetto ad altri tessuti. Questo è in linea con il principio che i tessuti epiteliali possono rispondere ad un attacco da parte di patogeni con un aumento della produzione di questi peptidi (TZOU *et al.*, 2000), la cui principale sede di produzione è tuttavia il corpo grasso. In presenza di un attacco batterico, la risposta immunitaria mediata dai tubuli è però estremamente efficace e potente. Mediante RT-PCR è stato dimostrato che i principali geni associati al pathway Imd sono espressi nei tubuli e che tale organo è in grado di legare e internalizzare a livello della membrana basale delle cellule principali un lipopolisaccaride (LPS) espresso sulla parete di *Escherichia coli* (MCGETTIGAN *et al.*, 2005). Inoltre, sebbene le soluzioni in cui sono stati incubati i Tubuli Malpighiani isolati in assenza di LPS siano in grado di determinare un certo grado di mortalità in colture batteriche, le soluzioni in cui sono stati incubati i tubuli in presenza del liposaccaride causano un significativo aumento di tale mortalità (MCGETTIGAN *et al.*, 2005). Questa risposta riflette una espressione costitutiva di peptidi antimicrobici, che aumenta però in modo significativo quando il tessuto è esposto a lipopolisaccaridi di origine batterica. Utilizzando una linea transgenica di *Drosophila* che esprime peptidi antimicrobici in associazione con la proteina fluorescente GFP (Green Fluorescent Protein), è stato osservato che effettivamente la produzione di diptericina, uno dei peptidi antimicrobici la cui produzione è sotto il controllo del pathway Imd, aumenta quando i Tubuli Malpighiani isolati vengono incubati in presenza di LPS. Questi dati sono stati confermati da analisi mediante PCR quantitativa dell'espressione del gene che codifica per la diptericina in tubuli isolati e incubati in assenza e presenza di LPS (MCGETTIGAN *et al.*, 2005). È stato anche valutato *in vivo* l'effetto sui

Tubuli Malpighiani di iniezioni di LPS nell'emocele: l'espressione di diptericina in queste condizioni sperimentali è maggiore rispetto a quella osservata nei Tubuli Malpighiani isolati e incubati in presenza del liposaccaride (MCGETTIGAN *et al.*, 2005). Ciò indica che i Tubuli Malpighiani sono in grado di percepire e rispondere ad un attacco batterico in modo autonomo, ma che la comunicazione tra differenti tessuti dell'insetto può potenziare la risposta di questo organo.

In insetto il monossido di azoto (NO) rappresenta un'importante molecola segnale coinvolta nella risposta immunitaria, e in particolare nell'induzione della produzione di peptidi antimicrobici nel corpo grasso e negli emociti (FOLEY e O'FARRELL, 2003; NAPPI *et al.*, 2000). MCGETTIGAN e collaboratori (2005) hanno dimostrato che tale molecola è coinvolta anche nella risposta immunitaria mediata dai Tubuli Malpighiani: tubuli isolati da *Drosophila* e incubati con LPS presentano un'augmentata attività dell'enzima ossido nitrico sintasi (NOS) e un aumento dell'attività dell'enzima nei tubuli si verifica anche *in vivo*, in seguito ad iniezioni di LPS nell'emocele. Inoltre, l'overespressione del gene che codifica per NOS nei Tubuli Malpighiani determina, in presenza di LPS, un drastico aumento dell'espressione del peptide antimicrobico diptericina ed è sufficiente, evidenza ancora più importante, a conferire un effetto protettivo all'intero animale nei confronti di una infezione batterica.

I Tubuli Malpighiani sono stati descritti per la prima volta circa 400 anni fa e, a partire dalla metà del secolo scorso, sono stati oggetto di intensi studi che hanno permesso di chiarire l'importante ruolo svolto da questo organo nei processi di osmoregolazione ed escrezione. Grazie all'avvento dell'era post-genomica possiamo oggi ampliare le conoscenze sulle funzioni dei Tubuli Malpighiani, e aprire così nuovi orizzonti di ricerca per comprendere fino in fondo la fisiologia di questo organo.

#### RIASSUNTO

Negli insetti i Tubuli Malpighiani e il retto rappresentano le strutture deputate all'osmoregolazione e all'escrezione. Recentemente, grazie a studi di genomica funzionale eseguiti in *Drosophila melanogaster*, è emerso che i tubuli svolgono altre funzioni oltre a quelle tradizionalmente attribuite a questo organo. Mediante microarray, è stato possibile stabilire che tra i geni maggiormente espressi figurano quelli che codificano per trasportatori di soluti organici e per enzimi appartenenti alle famiglie dei citocromo P450 e delle glutatione-transferasi. Queste evidenze, confermate anche da dati funzionali, indicano che i Tubuli Malpighiani sono in grado di eliminare un'ampia gamma di soluti organici, tra cui xenobiotici come gli insetticidi, e di svolgere un'importante ruolo nei processi di

detossificazione. Recentemente è stato dimostrato che i Tubuli Malpighiani svolgono un ruolo importante anche nella risposta immunitaria. Essi rappresentano un tessuto immuno-competente in grado di rilevare un attacco batterico e di mediare, in modo indipendente dal corpo grasso, un'efficace risposta immunitaria.

#### BIBLIOGRAFIA

- BEYENBACH K.W., 2003a – *Regulation of tight junction permeability with switch-like speed*. - Current Opinion in Nephrology and Hypertension, 12: 543-550.
- BEYENBACH K.W., 2003b – *Transport mechanisms of diuresis in Malpighian tubules of insects*. - Journal of Experimental Biology, 206: 3845-3856.
- BEYENBACH K.W., BAUMGART S., LAU K., PIERMARINI P.M., ZHANG, S., 2009 – *Signaling to the apical membrane and to the paracellular pathway: changes in the cytosolic proteome of Aedes Malpighian tubules*. - The Journal of experimental Biology, 212: 329-340.
- BEYENBACH K.W., PIERMARINI P.M., 2011 – *Transcellular and paracellular pathways of transepithelial fluid secretion in Malpighian (renal) tubules of the yellow fever mosquito Aedes aegypti*. Acta Physiologica, 202: 387-407.
- BEYENBACH K.W., SKAER H., DOW J.A.T., 2010 – *The developmental, molecular, and transport biology of Malpighian tubules*. - Annual Review of Entomology, 55: 351-374.
- BOGWITZ M.R., CHUNG H., MAGOC L., RIGBY S., WONG W., O'KEEFE M., MCKENZIE J.A., BATTERHAM P., DABORN P.J., 2005 – *Cyp12a4 confers lufenuron resistance in a natural population of Drosophila melanogaster*. - Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102: 12807-12812.
- CHAHINE S., O'DONNELL M.J., 2011 – *Interactions between detoxification mechanisms and excretion in Malpighian tubules of Drosophila melanogaster*. The Journal of Experimental Biology, 214: 462-468.
- DABORN P.J., YEN J.L., BOGWITZ M.R., LE GOFF G., FEIL E., JEFFERS S., TIJET N., PERRY T., HECKEL D., BATTERHAM P., FEYEREISEN R., WILSON T.G., FFRENCH-CONSTANT R.H., 2002 – *A single P450 allele associated with insecticide resistance in Drosophila*. - Science, 297: 2253-2256.
- DOW J.A.T., DAVIES S.A., 2006 – *The Malpighian tubule: rapid insights from post-genomic biology*. - Journal of Insect Physiology 52: 365-378.
- FEYEREISEN R., 1995 – *Molecular biology of insecticide resistance*. Toxicology Letters 82-83: 83-90.
- FEYEREISEN R., 1999 – *Insect P450 enzymes*. - Annual Review of Entomology, 44: 507-533.
- FOLEY E., O'FARRELL P.H., 2003 – *Nitric oxide contributes to induction of innate immune responses to gram-negative bacteria in Drosophila*. - Genes and Devopment., 17: 115-125.
- IMLER J.L., BULET, P., 2005 – *Antimicrobial peptides in Drosophila, structures, activities and gene regulation*. In: Mechanisms of Epithelial Defense (eds. D. Kabelitz & J.M. Schroder), vol. 86, pp. 1-21. Karger, Basel.
- LABBÉ R., CAVENEY S., DONLY C., 2011 – *Expression of multidrug resistance proteins is localized principally to the Malpighian tubules in larvae of the cabbage looper moth, Trichoplusia ni*. - The Journal of Experimental Biology, 214: 937-944.
- LESPINE A., DUPUY J., ORLOWSKI S., NAGY T., GLAVINAS H., KRAJCSI P., ALVINERIE M., 2006 – *Interaction of ivermectin with multidrug resistance proteins (MRP1, 2 and 3)*. - Chemico-Biological Interactions 159: 169-179.
- LINTON S.M., O'DONNELL M.J., 2000 – *Novel aspects of the transport of organic anions by the Malpighian tubules of Drosophila melanogaster*. - Journal of Experimental Biology, 203: 3575-3584.
- MCGETTIGAN J., MCLENNAN R.K.J., BRODERICK K.E., KEAN L., ALLAN A.K., CABRERO P., REGULSKI M.R., POLLOCK V.P., GOULD G.W., DAVIES S.A., DOW J.A.T., 2005 – *Insect renal tubules constitute a cell-autonomous immune system that protects the organism against bacterial infection*. - Insect Biochemistry and Molecular Biology, 35: 741-754.
- NAPPI A.J., VASS E., FREY F., CARTON Y., 2000 – *Nitric oxide involvement in Drosophila immunity*. - Nitric Oxide, 4: 423-430
- O'DONNELL M.L., 2009 – *Too much of a good thing: how insects cope with excess ions or toxins in the diet*. - The Journal of Experimental Biology, 212: 363-372.
- STAND M.R., 2008 – *The insect cellular immune response*. - Insect Science, 15: 1-14.
- TORRIE L.S., RADFORD J.C., SOUTHALL T.D., KEAN L., DINSMORE A.J., DAVIES S.A., DOW J.A.T., 2004 – *Resolution of the insect ouabain paradox*. - Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101: 13689-13693.
- WANG J., KEAN L., YANG J., ALLAN A.K., DAVIES S.A., HERZYK P., DOW J.A.T., 2004 – *Function-informed transcriptome analysis of Drosophila renal tubule*. - Genome Biology, 5: R69.1-R69.21.
- YANG J., MCCART C., WOODS D.J., TERHZAZ S., GREENWOOD K.G., FFRENCH-CONSTANT R.H., DOW J.A.T., 2007 – *A Drosophila systems approach to xenobiotic metabolism*. - Physiological Genomics, 30: 223-231.
- YU M.J., BEYENBACH K.W., 2004 – *Effects of leucokinin-VIII on Aedes Malpighian tubule segments lacking stellate cells*. - The Journal of Experimental Biology, 207: 519-526.



## STRUTTURE CELLULARI E MOLECOLARI DEI TUBULI MALPIGHIANI COINVOLTE NELLA IONO- E OSMOREGOLAZIONE

MARIA GIOVANNA LEONARDI (\*)

(\*) DiPSA, Università degli Studi di Milano, via Celoria 2, 20133 Milano; mgiovanna.leonardi@unimi.it

Lettura tenuta durante la Tavola rotonda «Struttura e funzioni dei Tubuli Malpighiani degli insetti» - Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 18 novembre 2011

### *Malpighian Tubule's cellular and molecular structures involved in ionic- and osmoregulation*

The paper describes urine formation in Malpighian Tubules and the principal hormonal mechanisms involved in the control of Malpighian Tubule's function. Insect haemolymphatic pressure is equal to that present in the tubular lumen, therefore urine formation in insects relies entirely on salts active secretion. Ions secretion is driven by a V-type H<sup>+</sup>-ATPase present in the apical membrane of tubular cells. This pump generates an electrochemical potential gradient sufficient to drive Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> fluxes from cell to lumen through H<sup>+</sup>/alkali cations exchanger. The overall Malpighian Tubules activity determines salt (KCl and NaCl) active excretion, to which water secretion is coupled. Urine formation is a complex mechanism which involves several transport proteins, many of which have been recently identified.

KEY WORDS: urine formation, V-type H<sup>+</sup>-ATPase, H<sup>+</sup>/alkali cation exchanger, hormonal regulation, excretion.

### INTRODUZIONE

L'apparato escretore degli insetti, come quello degli altri animali, svolge un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'omeostasi dell'organismo. Per questo motivo i Tubuli Malpighiani che, coadiuvati dall'intestino posteriore, esercitano le funzioni escretorie negli insetti sono stati ampiamente studiati da lungo tempo (PANNA-BECKER, 1995).

I Tubuli Malpighiani sono coinvolti in molte variegata attività ma svolgono principalmente le funzioni classiche degli organi escretori: l'eliminazione dei prodotti del metabolismo azotato, il cui prodotto d'escrezione principale è rappresentato negli insetti dall'acido urico, il mantenimento dell'omeostasi acido-base, e il controllo del volume dell'acqua e delle concentrazioni ioniche nei liquidi intracorporei.

I meccanismi coinvolti nella produzione di urina sono attualmente chiariti; diversi genomi di insetti sono in via di clonazione (ZDOBNOV e BORK, 2007), e molte delle componenti molecolari, responsabili delle funzioni escretorie sono state identificate. In *Aedes aegypti*, in particolare, in cui il pasto di sangue innesca una rapida diuresi, la produzione di urina e la sua regolazione sono state ampiamente descritte (BEYENBACH *et al.*, 2010).

I Tubuli Malpighiani di *A. aegypti* presentano due tipi cellulari: le cellule principali, prevalenti, deputate alla secrezione di K<sup>+</sup> e Na<sup>+</sup>, e le cellule stellate, più piccole, coinvolte nella secrezione di Cl<sup>-</sup>. Nel sistema circolatorio aperto che caratterizza

gli insetti, la pressione emolinfatica è circa uguale a quella presente nel lume dei Tubuli Malpighiani, e non consente la formazione dell'urina per filtrazione. Nei Tubuli Malpighiani la formazione dell'urina avviene quindi per secrezione. La produzione di urina inizia nel tratto distale dei tubuli, dove avviene la secrezione di un fluido isoosmotico, formato prevalentemente da sali (KCl e NaCl) e acqua.

### LA PRODUZIONE DI URINA

Già negli anni cinquanta RAMSAY (1953) aveva suggerito che nelle cellule dei Tubuli Malpighiani dovesse essere presente una pompa in grado di secernere attivamente K<sup>+</sup> nel lume. In realtà, la capacità di secernere attivamente K<sup>+</sup> e Na<sup>+</sup> è dovuta alla presenza sulla membrana apicale delle cellule tubulari, di una H<sup>+</sup> ATPasi di tipo vacuolare (V-H<sup>+</sup> ATPasi), associata a proteine di trasporto che agiscono come scambiatori, trasferendo H<sup>+</sup> in una direzione e un catione (K<sup>+</sup> e Na<sup>+</sup>) nella direzione opposta. La V-H<sup>+</sup> ATPasi trasferisce attivamente H<sup>+</sup> dal citoplasma cellulare al lume del tubulo, a spese di energia metabolica. I protoni vengono così accumulati nel lume e poiché l'estruzione di H<sup>+</sup> determina il trasferimento di una carica netta positiva, la pompa genera anche un potenziale elettrico a cavallo della membrana apicale della cellula, con polo positivo nel lume. L'elevato gradiente elettrochimico così formato, è sfruttato da scambiatori che accoppiano il ritorno

in cellula del protone secondo gradiente, all'estruzione di  $K^+$  e  $Na^+$  dalla cellula nel lume contro gradiente (WIECZOREK *et al.*, 2009).

Alcuni di questi scambiatori sono stati ora identificati. In *A. gambiae* è stato clonato il cDNA che codifica NHA1, un membro della famiglia degli antiporti  $Na^+/H^+$  (RHEAULT *et al.*, 2007). Esperimenti di immunolocalizzazione, hanno dimostrato la presenza in *Drosophila melanogaster* di due trasportatori di questa famiglia, NHA1 e NHA2, localizzati sulla membrana apicale delle cellule principali. L'importanza funzionale di questi trasportatori è confermata dal fatto che la sovraespressione di NHA1 determina un aumento della produzione di urina mentre quella di NHA2 incrementa la concentrazione tubulare di  $K^+$  e  $Na^+$  (DAY *et al.*, 2008).

Il potenziale elettrico di più di 20 mV, con polo positivo nel lume, generato a cavallo dell'epitelio tubulare dall'attività della  $V-H^+$  ATPasi, determina un flusso di corrente elettrica di cortocircuito, dovuta al passaggio di ioni  $Cl^-$  sia attraverso la via paracellulare tra le cellule epiteliali, che la via transcellulare attraverso la cellula epiteliale. Il flusso di  $Cl^-$  è quindi elettricamente accoppiato alla secrezione dei cationi, e causa complessivamente l'escrezione elettroneutra di NaCl e KCl.

Il flusso transcellulare di  $Cl^-$  è dovuto alla presenza nella membrana apicale delle cellule stellate di canali specifici per il  $Cl^-$  (O'CONNOR e BEYENBACH, 2001) e alla presenza nella membrana basolaterale di uno scambiatore  $Cl^-/HCO_3^-$ . È stato osservato che anticorpi diretti contro lo scambiatore  $Cl^-/HCO_3^-$  di *A. aegypti* marcano in modo specifico le cellule stellate ma non le cellule principali di questo insetto (BEYENBACH *et al.*, 2010). Parte del  $Cl^-$  potrebbe anche provenire, attraverso le giunzioni intercellulari, dalle cellule principali, sulla cui membrana basolaterale è presente un cotrasportatore  $Na^+/K^+/2Cl^-$ . Sulla membrana basolaterale delle cellule tubulari di diversi insetti, tra cui *Rhodnius prolixus* e *D. melanogaster*, è stata inoltre dimostrata la presenza di una  $Na^+/K^+$  ATPasi. La  $Na^+/K^+$  ATPasi e il cotrasportatore  $Na^+/K^+/2Cl^-$  sono, quindi, responsabili dell'approvvigionamento basale di questi ioni.

L'escrezione attiva nel lume di NaCl e/o KCl, genera un gradiente osmotico locale che, richiamando acqua, induce la produzione di urina. Se nella maggioranza dei casi è l'escrezione di ioni potassio a guidare la formazione dell'urina, negli insetti ematofagi prevale l'escrezione di  $Na^+$ .

L'acqua raggiunge il lume tubulare attraverso la via transcellulare e/o paracellulare: entrambe le vie sono coinvolte nel passaggio transepiteliale di acqua, ma allo stato attuale non è possibile

definire se e quanto una via risulti prevalente. Geni codificanti per differenti acquaporine, le proteine canale specifiche per il passaggio dell'acqua attraverso la membrana plasmatica, con diversa permeabilità sia all'acqua che ad altri soluti, come urea,  $NH_3$ , NO e  $CO_2$ , sono stati recentemente identificati in *Drosophila* (BEYENBACH *et al.*, 2010).

L'urina primaria prodotta dai Tubuli Malpighiani raggiunge l'intestino posteriore, che gioca un ruolo importante nell'escrezione finale. Infatti l'urina primaria contiene, oltre a acqua e sali, molti importanti soluti presenti nell'emolinfa, che non possono essere persi dall'organismo. L'intestino posteriore interviene quindi riassorbendo ioni e acqua, e riassorbendo e secernendo selettivamente sostanze specifiche.

#### LA REGOLAZIONE ORMONALE

L'attività dell'apparato escretore è modulata rapidamente e finemente per via ormonale, al fine di mantenere costanti le caratteristiche chimico-fisiche dell'emolinfa. Infatti l'apporto di sali e acqua varia notevolmente al variare della dieta, sia in specie diverse che in momenti diversi dello sviluppo o in differenti condizioni fisiologiche in uno stesso individuo.

L'omeostasi salina e l'omeostasi idrica sono strettamente e direttamente controllate da ormoni, prevalentemente rappresentati da neuropeptidi.

Sebbene un aumento della quantità di acqua eliminata dall'insetto possa essere ottenuta aumentando la produzione di urina primaria o diminuendo il riassorbimento intestinale, e una diminuzione della perdita d'acqua sia ottenibile diminuendo la produzione o aumentando il riassorbimento, negli insetti gli ormoni diuretici promuovono generalmente la formazione di urina nei Tubuli Malpighiani, e gli ormoni anti-diuretici il riassorbimento di acqua nell'intestino posteriore.

La maggior parte degli ormoni diuretici appartengono a due famiglie: quella degli ormoni CRF-simili, così definiti perché strutturalmente simili ai fattori di rilascio delle gonadotropine dei vertebrati, e quella delle chinine.

I meccanismi coinvolti nella regolazione della produzione di urina sono stati descritti in dettaglio in *A. aegypti*: il pasto di sangue, assunto dalle femmine per la maturazione delle uova, comporta un periodico e massiccio apporto di NaCl e acqua, che innesca un'elevata diuresi. La leucochinina-VIII aumenta il flusso passivo di  $Cl^-$  attraverso la via paracellulare: la sua azione è mediata dalla produzione di inositolo trifosfato, che,

aumentando la concentrazione intracellulare di  $\text{Ca}^{2+}$ , determina un massiccio aumento della permeabilità al cloro. L'incremento di conduttanza è tale che la differenza di potenziale elettrico trans-epiteliale cala a valori prossimi allo zero (BEYENBACH *et al.*, 2010).

Anche l'eccesso di  $\text{Na}^+$  ingerito viene rapidamente escreto dai Tubuli Malpighiani, grazie al rilascio del peptide natriuretico, che agisce aumentando l'ingresso di sodio in cellula: l'attività dell'ormone, mediata da AMPc, determina l'apertura dei canali per il sodio e l'attivazione dei trasportatori presenti nella membrana basolaterale.

Negli insetti, in cui la formazione dell'urina è dovuta esclusivamente a processi di secrezione, l'aumento della diuresi è ottenuto incrementando la secrezione attiva di NaCl e KCl, determinata, come abbiamo visto, dall'attività combinata della pompa protonica di tipo vacuolare e dello scambiatore  $\text{H}^+$ /catione. Un aumento della secrezione può quindi essere ottenuto incrementando la disponibilità cellulare dei diversi ioni, come precedentemente descritto, ma recentemente è stata dimostrata in *A. aegypti* la presenza di un peptide diuretico, l'aedeschinina, in grado di incrementare direttamente l'attività della V- $\text{H}^+$  ATPasi. La V- $\text{H}^+$  ATPasi è una proteina multimerica formata da due domini funzionali: un dominio catalitico, e un dominio canale che ancora la proteina al citoscheletro e alla membrana cellulare. La presenza negli epitelii assorbenti degli insetti di una V- $\text{H}^+$  ATPasi associata a un antiporto  $\text{H}^+/\text{K}^+$ , è stata inizialmente dimostrata nella membrana apicale delle cellule a coppa dell'intestino medio delle larve dei lepidotteri (WIECZOREK *et al.*, 1989), dove è stato successivamente osservato che, quando le larve non si alimentano, i due domini funzionali si disassemblano bloccando l'attività della V- $\text{H}^+$  ATPasi (GRAF *et al.*, 1996). L'aedeschinina stimola l'attività della V- $\text{H}^+$  ATPasi nei Tubuli Malpighiani, promuovendo la riassociazione dei due domini funzionali.

A differenza degli ormoni diuretici, gli ormoni antidiuretici possono agire sia sui Tubuli Malpighiani che sull'intestino posteriore. In *Tenebrio molitor* sono stati identificati due fattori antidiuretici (ADFa e ADFb) la cui azione, mediata da GMPc, inibisce la velocità di formazione dell'urina. In questo insetto quindi, i Tubuli Malpighiani sono sotto il controllo di peptidi diuretici che utilizzano la via dell'AMPc e di peptidi antidiuretici che utilizzano la via del GMPc. La maggior parte degli ormoni antidiuretici agisce però sull'intestino posteriore, aumentando il riassorbimento di acqua.

## CONCLUSIONI

I Tubuli Malpighiani degli insetti formano urina per escrezione attiva di sali. Sebbene il meccanismo generale sia presente e condiviso nei Tubuli Malpighiani di tutti gli insetti, condizioni particolari possono richiedere soluzioni aggiuntive. In *Rhodnius prolixus*, un insetto ematofago che assume un pasto di sangue pari a 10 volte il suo peso corporeo, il problema del mantenimento dell'omeostasi idro-salina è particolarmente marcato. In questo insetto, i Tubuli Malpighiani possono essere suddivisi in due tratti differenti: un tratto distale in cui avviene la formazione dell'urina secondo lo schema classico, e un tratto prossimale dove avvengono processi di riassorbimento. In *R. prolixus*, il tratto distale è sotto il controllo di un fattore diuretico, la 5-idrossitriptamina, che aumenta considerevolmente la permeabilità all'acqua, favorendo probabilmente l'inserzione di acquaporine (O'DONNELL *et al.*, 1982). Il flusso di acqua e ioni che si instaura in seguito alla stimolazione della diuresi, è tale che ogni cellula secerne un volume pari al suo volume cellulare ogni 10 secondi (MADDRELL, 1991) e l'intero contenuto cellulare di  $\text{Cl}^-$  è scambiato in 2-3 secondi (IANOWSKI *et al.*, 2002).

Il tratto prossimale, al contrario, presenta una bassa permeabilità all'acqua che si riduce ulteriormente durante la diuresi (O'DONNELL, 2009). In questo tratto, inoltre, non sono presenti la V- $\text{H}^+$  ATPasi e lo scambiatore  $\text{H}^+$ /catione. Sulla membrana apicale di queste cellule è invece presente una  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPasi di tipo P, che estrude attivamente protoni e riassorbe ioni potassio, e uno scambiatore  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ , che media il riassorbimento del cloro. Il  $\text{K}^+$  e il  $\text{Cl}^-$  rientrati nelle cellule tubulari raggiungono l'emolinfa grazie alla presenza nella membrana basolaterale di queste cellule di canali specifici per il  $\text{K}^+$  e il  $\text{Cl}^-$  (O'DONNELL, 2009). Nel complesso, quindi, i Tubuli Malpighiani di *R. prolixus* sono in grado di eliminare in pochissimo tempo una grande quantità di acqua e  $\text{Na}^+$ , senza depauperare l'organismo di  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$ .

I Tubuli Malpighiani rappresentano, quindi, un efficiente sistema escretorio, in grado di mantenere l'omeostasi idro-salina negli insetti nonostante l'estrema ricchezza di specie e l'ampia gamma degli habitat occupati pongano l'organismo di fronte a condizioni molto diverse e alcune volte estreme.

## RIASSUNTO

Il lavoro descrive il meccanismo di produzione dell'urina nei Tubuli Malpighiani degli insetti e i principali meccanismi di regolazione ormonale che agiscono a livello tubulare. Negli insetti, caratterizzati da un sistema circolatorio aperto, la pressione emolinfatica non consente la formazione dell'urina per filtrazione. I Tubuli Malpighiani

producono quindi urina per secrezione, grazie alla presenza sulla membrana apicale delle cellule tubulari di una H<sup>+</sup> ATPasi di tipo vacuolare, in grado di generare un gradiente elettrochimico sufficiente a sostenere l'estrusione, mediata da scambiatori H<sup>+</sup>/catione, di K<sup>+</sup> e Na<sup>+</sup>. L'attività dei Tubuli Malpighiani produce complessivamente l'escrezione di sali (KCl e NaCl) e la conseguente secrezione di acqua. Il meccanismo di produzione dell'urina è piuttosto complesso e prevede il coinvolgimento, nelle funzioni escretorie, di diverse proteine di trasporto, molte delle quali sono state attualmente identificate.

#### BIBLIOGRAFIA

- BEYENBACH K.W., BAUMGART S., LAU K., PIERMARINI P.M., ZHANG S., 2009 – *Signaling to the apical membrane and to the paracellular pathway: changes in the cytosolic proteome of Aedes Malpighian tubules.* - J. Exp. Biol., 212: 329-340.
- BEYENBACH K.W., SKAER H., DOW J.A.T., 2010 – *The developmental, Molecular, and Transport Biology of Malpighian Tubules.* - Annu. Rev. Entomol., 55: 351-374.
- DAY J.P., WAN S., ALLAN A.K., KEAN L., DAVIES S.A., GRAY J.V., DOW J.A.T., 2008 – *Identification of two partners from the bacterial Kef exchanger family for the apical plasma membrane V-ATPase of Metazoa.* - J. Cell Sci., 121: 2612-2619.
- GRAF F., HARVEY W.R., WIECZOREK H., 1996 – *Purification and properties of a cytosolic V1-ATPase.* - J. Biol. Chem., 271: 20908-20913.
- IANOWSKI J.P., CHRISTENSEN R.J., O'DONNELL M.J., 2002 – *Intracellular ion activities in Malpighian tubule cells of Rhodnius prolixus: evaluation of Na<sup>+</sup>:K<sup>+</sup>:2Cl<sup>-</sup> cotransport across the basolateral membrane.* - J. Exp. Biol., 205: 1645-1655.
- MADDRELL S.H.P., 1991 – *The fastest fluid-secreting cell known: the upper Malpighian tubule cell of Rhodnius.* - BioEssays, 13: 357-362.
- O'CONNOR K.R., BEYENBACH K.W., 2001 – *Chloride channels in apical membrane patches of stellate cells of Malpighian tubules of Aedes aegypti.* - J. Exp. Biol., 204: 367-378.
- O'DONNELL M.J., 2009 – *Too much of a good thing: how insects cope with excess ions or toxins in the diet.* - J. Exp. Biol., 212: 363-372.
- O'DONNELL M.J., ALDIS G.K., MADDRELL S.H.P., 1982 – *Measurements of osmotic permeability in the Malpighian tubules of an insect, Rhodnius prolixus Stal.* - Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci., 216: 267-277.
- PANNABECKER T., 1995 – *Physiology of the Malpighian tubule.* - Annu. Rev. Entomol., 40: 493-510
- RAMSAY, J.A., 1953 – *Active transport of potassium by the Malpighian tubules of insects.* - J. Exp. Biol., 30: 358-369.
- RHEAULT M.R., OKECH B.A., KEEN S.B., MILLER M.M., MELESHKEVITCH E.A., LINSER P.J., BOUDKO D.Y., HARVEY W.R., 2007 – *Molecular cloning, phylogeny and localization of AgNHA1: the first Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter (NHA) from a metazoan, Anopheles gambiae.* - J. Exp. Biol., 210: 3848-3861.
- WIECZOREK H., BEYENBACH K.W., HUSS M., VITAVSKA O., 2009 – *Vacuolar-type proton pumps in insect epithelia.* - J. Exp. Biol., 212: 1611-1619.
- WIECZOREK H.S., WEERTH, M., SCHINDLEBECK, KLEIN U., 1989 – *A vacuolar-type proton pump in a vesicle fraction enriched with potassium transporting plasma membranes from tobacco hornworm midgut.* - J. Biol. Chem., 264: 11143-11148.
- ZDOBNOV E.M., BORK P., 2007 – *Quantification of insect genome divergence.* - Trends Genet., 23: 16-20.

## LE FUNZIONI COMPLEMENTARI E ALTERNATIVE DEI TUBULI MALPIGHIANI DEGLI INSETTI

BARBARA CONTI (\*) - FABIOLA GIUSTI (\*\*) - DAVID MERCATI (\*\*) - MARCO GOTTARDO (\*\*) -  
ROMANO DALLAI (\*\*)

(\*) *Dipartimento di Coltivazione e Difesa delle Specie Legnose, Università degli Studi di Pisa, bconti@agr.unipi.it*

(\*\*) *Dipartimento di Biologia Evolutiva, Università degli Studi di Siena*

Lettura tenuta durante la Tavola rotonda «Struttura e funzioni dei Tubuli Malpighiani degli insetti» - Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 18 novembre 2011

### *Complementary and alternative functions of insects Malpighian Tubules*

The Malpighian Tubules are gut regions where excretion takes place. However, there are other functions that Malpighian Tubules can perform simultaneously with the excretion (i.e. complementary functions), and other functions that they can perform suspending the excretion, and restoring it later (i.e. alternative functions).

The complementary functions are related to production of mucofibrils, minerals, brocosomes, defensive products and viscous substances for the protection of eggs and juvenile instars.

In some species, the phenomenon of bioluminescence takes place in Malpighian Tubules, and – even in this case – it can be considered as a complementary function.

Furthermore, the alternative functions of Malpighian Tubules only relate to the production of substances for the construction of the cocoon have been found.

KEY WORDS: Insects Malpighian Tubules, complementary functions of Malpighian Tubules, structural morphology.

I Tubuli Malpighiani sono regioni dell'intestino nei quali viene effettuata l'escrezione primaria (WIGGLESWORTH, 1974).

In realtà, essi oltre a partecipare all'escrezione vera e propria, contribuiscono anche alla digestione, alla detossificazione e alla difesa immunitaria, che vanno intese quindi come funzioni complementari. Si possono illustrare, tuttavia, altre funzioni complementari che i Tubuli Malpighiani assolvono contemporaneamente all'escrezione e funzioni che, in alcune occasioni, essi acquisiscono e che sono da ritenersi funzioni alternative all'escrezione. In questi casi tale ultima funzione viene sospesa e ristabilita in seguito.

Le funzioni complementari riguardano la produzione di sostanze viscoso adesivanti, di sostanze per la protezione delle uova e delle forme giovanili, di mucofibrille, di sali minerali, di brocosomi e di sostanze difensive. Ha sede inoltre, nei Tubuli Malpighiani di alcune specie, il fenomeno della bioluminescenza che anche in questo caso è una funzione complementare.

Le funzioni alternative riguardano esclusivamente la produzione di sostanze per la costruzione del bozzolo.

Nel dettaglio, è da considerarsi complementare la produzione della secrezione vischiosa nelle larve dei crisopidi, ma anche di molti crisomelidi, come ad esempio in *Agelastica alni* (Fig. 1A), che fuoriesce dall'ano e viene riversata sullo pseudo-

podo terminale dell'addome. Tale secrezione consente una maggiore adesione alla vegetazione, facilitando lo spostamento della larva (BRASS & DAS, 1914; SPIEGLER, 1962).

Lo stesso prodotto dei Tubuli Malpighiani con funzione adesivante, serve anche, nelle larve dei crisopidi, come sostanza difensiva e/o repellente nei confronti delle formiche ed è costituita probabilmente dai precursori delle sostanze con la quale questi insetti produrranno il bozzolo (LA MUNYON & ADAMS, 1987).

In alcuni crisomelidi, inoltre, i Tubuli Malpighiani producono la sostanza collante con la quale essi ricoprono le uova dando origine a delle ootche. Ne sono alcuni esempi quelle prodotte da *Cassida nebulosa* (Fig. 1B) e *C. rubiginosa*, ma il fenomeno è diffuso in molti altri cassidini. Nella maggior parte dei crisomelidi le uova vengono semplicemente fatte aderire ai supporti vegetali con una produzione colleterica ma, nei casi sopra citati, con un lungo e complicato lavoro, queste vengono immerse in più strati di secreto proctodeale proveniente dai Tubuli Malpighiani, alla fine ricoperti da un rivestimento fecale (Fig. 1C) (KLEINE, 1916; 1917).

Sono prodotti dei Tubuli Malpighiani anche le sostanze coinvolte nella formazione della spuma nella quale le forme giovanili dei cercopoidei delle famiglie Cercopidae, Aphrophoridae (Fig. 2A) e Clastopteridae passano l'intero periodo preimagi-

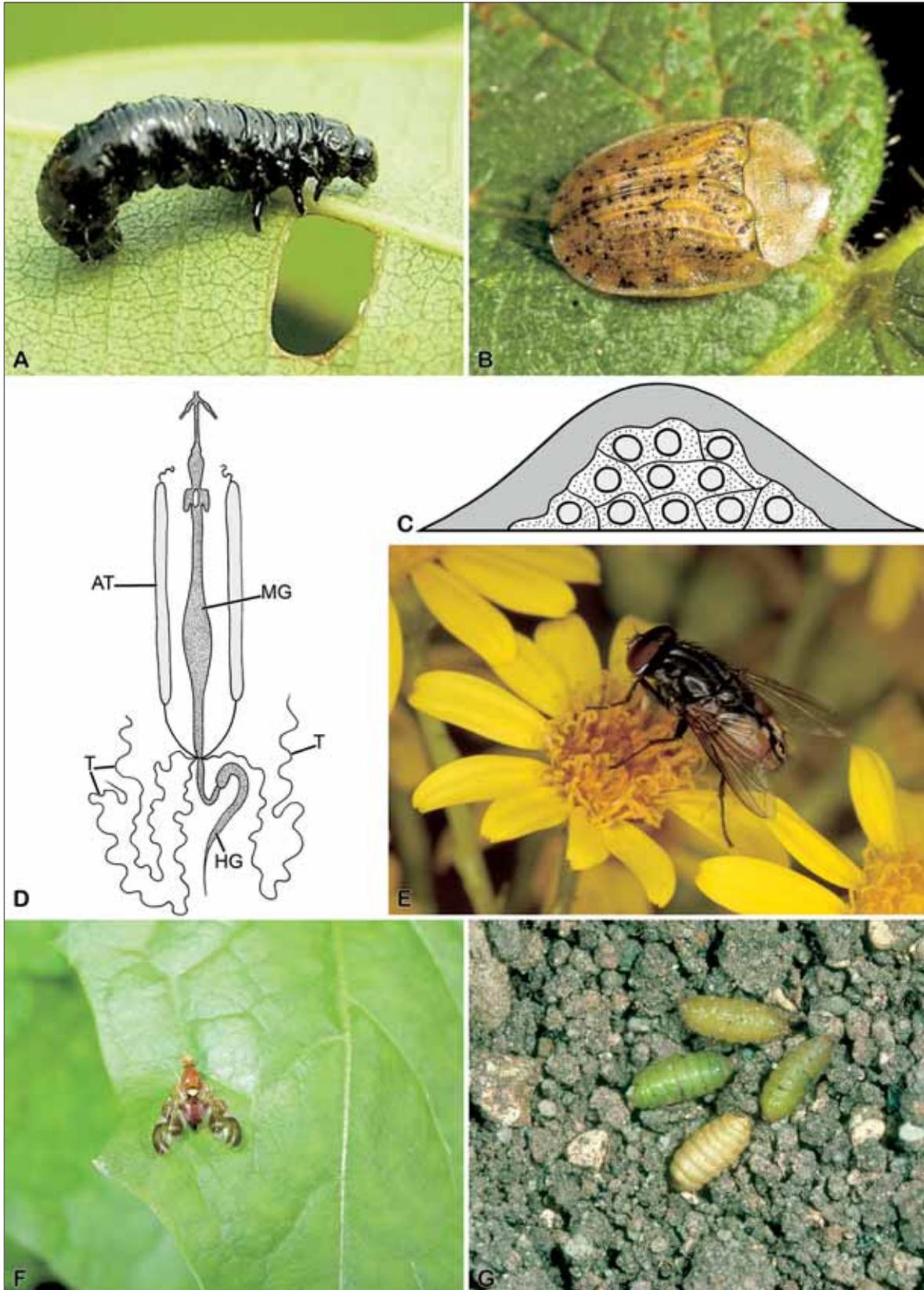


Fig. 1

**A** - Larva di *Agelastica alni* (L.) (Coleoptera Chrysomelidae) (foto Beentree, Wikipedia); **B** - Adulto di *Cassida nebulosa* L. (Coleoptera Chrysomelidae) (foto Adrian Royle); **C** - Rappresentazione schematica di ooteca di crisomelide cassidino (ridisegnato da von Lengerken, 1939); **D** - Rappresentazione schematica dei Tubuli Malpighiani di *Ptycoptera* dove i 2 anteriori (AT) appaiono più gonfi, rispetto agli altri (T), a causa del contenuto in carbonato di calcio. MG= intestino medio, HG= intestino posteriore (ridisegnato da Pantel, 1914); **E** - *Musca autumnalis* De Geer (Diptera Muscidae) (foto Malcolm Storey www.bioimages.org.uk); **F** - Adulto di *Euleia heraclei* (L.) (Diptera Tephritidae) (foto Luciana Bartolini www.lucianabartolini.net); **G** - Pupari di *Euleia heraclei* (L.) (Diptera Tephritidae) (foto Coutin R./OPIE INRA).

nale. Queste specie, volgarmente dette sputacchine, sono criptobiotiche dato che sia le forme epigee che ipogee vivono all'interno della spuma prodotta (Fig. 2B). I Tubuli Malpighiani delle forme giovanili di tali specie presentano una specializzazione a zone: in alcuni tratti effettuano l'escrezione mentre in altri secernono le sostanze funzionali alla produzione della spuma (Fig. 2D). Fu LICENT (1912) per primo a individuare l'origine della spuma, ma si deve a MARSHALL (1973) lo studio istologico con il quale è stato possibile stabilire che durante il periodo preimaginale, la parte prossimale del tubulo appare rigonfia e produce una grande quantità di un mucopolisaccaride. Tale sostanza, mescolata con la melata proveniente dalla camera filtrante, costituisce la spuma che viene poi letteralmente "montata" sia mediante l'insufflazione di aria dagli stigmi toracici e addominali che da ripetuti movimenti di accollamento e separazione dei lobi paratergali degli ultimi scleriti addominali detti "stygmacalyps" (dal greco *kalyptein* cioè nascondere) che nascondono gli stigmi (Fig. 2C) (EMELYANOV, 1987). Essi avrebbero anche un ruolo determinante per la respirazione mantenendo il plastron aerifero sugli spiracoli tracheali ventrali (RAKITOV, 2002). Nella parte distale del Tubulo Malpighiano avviene inoltre la sintesi proteica. Le proteine prodotte verrebbero poi trasferite nel lume dei Tubuli Malpighiani con la duplice funzione di stabilizzante e surfattante della spuma e poi di escreto quelle in eccesso (LICENT, 1912; MARSHALL, 1973). All'interno della spuma, le forme giovanili compierebbero le mute ben protette contro l'eccessiva evapotraspirazione (EVANS, 1940). Tale teoria, ampiamente accettata, è stata messa in discussione da un lavoro nel quale è stata valutata l'evaporazione di acqua dalla spuma e dalle evidenze sperimentali l'Autore conclude che la protezione contro il disseccamento fornita da tale prodotto è modesta (TURNER, 1994). Inoltre, senza dubbio la maggior parte dei cercopoidei vivono in habitat mesofili e le modalità nutrizionali consentono loro un accesso illimitato all'acqua che non giustifica la necessità idrica sostenuta da EVANS (1940) ma anche da altri autori (RAKITOV, 2002). Infine, la teoria che attribuisce alla spuma funzione contro il disseccamento non serve a spiegare né perché nei cercopoidei con forme giovanili ipogee queste producano la spuma, anche se più densa (ROVERSI & BACCETTI, 1994), né perché quelle degli Epipygidae producano la spuma solo in occasione della muta (MARSHALL 1964 a e b).

Altra peculiare produzione dei Tubuli Malpighiani è rappresentata dalle sostanze con le quali vengono costruiti i tubetti rigidi degli epipigidi.

Gli Epipygidae (Fig. 2E) sono degli omotteri cercopoidei delle zone Australiana e Neotropica detti "tube spittlebugs" perché le forme giovanili producono sia i tubetti rigidi all'interno dei quali vivono, sia la spuma tipica delle sputacchine ma solo, come già detto, in occasione delle mute. I tubetti (Fig. 2F) vengono fissati al supporto vegetale, con l'apertura rivolta verso l'alto ed al loro interno la forma giovanile si posiziona con il capo verso il basso e con l'apparato boccale infisso nel tessuto vegetale per succhiare la linfa. MARSHALL (1964 a e b) ha documentato nelle forme giovanili di *Machaerota guttata* (Epipygidae Machaerotini) i cambiamenti citologici che si svolgono nell'epitelio dei Tubuli Malpighiani sia durante la produzione della spuma che del materiale con il quale vengono costruiti i tubi. Nei quattro Tubuli Malpighiani delle forme giovanili degli Epipygidae sono evidenti un segmento lobulato distale, uno più grosso prossimale ed un sottile dotto di sbocco. Nella parte prossimale si distinguono due ulteriori regioni: una anteriore con cellule ricche di fibrille e una posteriore con cellule ricche di granuli (Fig. 2G). Quest'ultima zona è responsabile della produzione della spuma. Essa, infatti, subisce una progressiva e crescente vacuolizzazione in occasione delle mute, quando la forma giovanile produce appunto la spuma all'ingresso del tubetto e l'eccidi ha luogo dentro la massa spumosa. Contemporaneamente alla produzione di schiuma si ha anche la vacuolizzazione delle cellule nella zona ricca di fibrille a livello delle quali si riscontrano delle protrusioni citoplasmatiche all'interno del lume del Tubulo Malpighiano con conseguente estrusione di materiale coalescente costituito da mucofibrille. È stato messo in evidenza come l'armatura dei tubi, vere e proprie conchiglie di foglia specie-specifica, sia costituita da mucofibrille, cioè composti gelatinosi che una volta secchi diventano duri e su tale intelaiatura vengono poi depositati i sali minerali prodotti selettivamente a livello del mesenteron. Con il prodotto che fuoriesce dall'ano, mediante movimenti semicircolari dell'addome verrà costruito il tubetto (MARSHALL 1964 a e b).

Una produzione analoga alla spuma dei Cercopoidei si ritrova nelle forme giovanili dei Cicadoidei. Queste, a vita ipogea, sono e criptobiotiche e si nutrono della linfa delle radici (WHITE & STREHL, 1978). Esse usano le zampe anteriori fossorie per scavare il terreno e per costruire sia cellette con pareti cementate all'interno delle quali esse si nutrono, sia camini di uscita (Fig. 3A). Per quanto vi siano differenze nelle modalità di vita, sono state messe in luce analogie, sia morfologiche che comportamentali, tra le forme giovanili dei

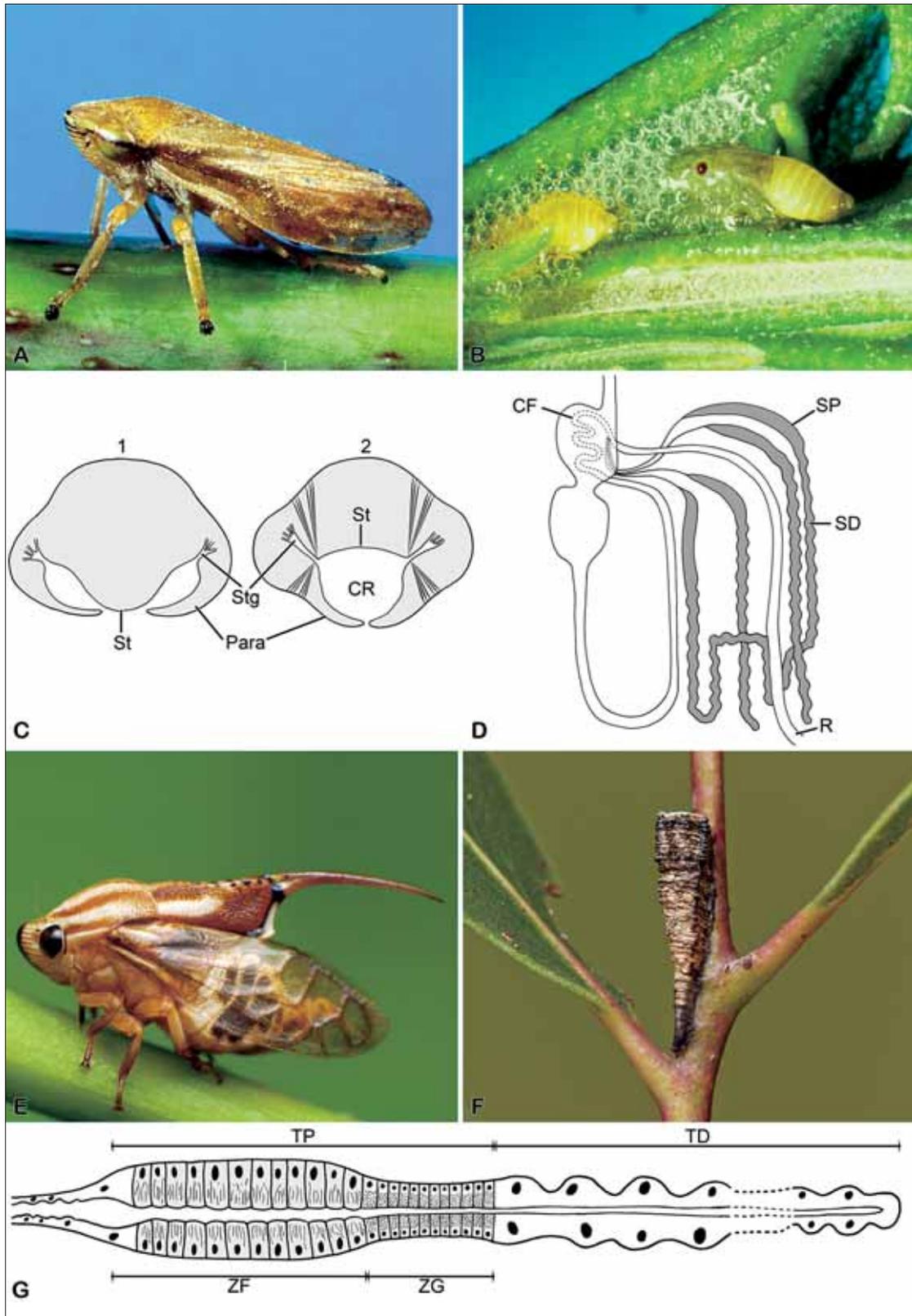


Fig. 2

A - Adulto di *Philaenus spumarius* (L.) (Hemiptera Aphrophoridae) (foto Andrea Lucchi & Valerio Mazzoni); B - Forme giovanili di *Philaenus spumarius* (L.) (Hemiptera Aphrophoridae); C - Rappresentazione schematica di sezioni addominali trasverse di neanide di *Philaenus spumarius* (L.) (Hemiptera Aphrophoridae) effettuate 1) all'altezza del primo urite, 2) a livello del quarto urite. St= sterno, Stg= stigmi, Para= lobi paratergali delimitanti la cavità respiratoria (CR) modificabile dall'azione dei muscoli (ridisegnato da Weber, 1933); D - Rappresentazione schematica dei Tubuli Malpighiani degli omotteri cercopoidei. CF=camera filtrante, SP=segmento prossimale, SD=segmento distale, R=retto (ridisegnato da Rakitov, 2002); E - Adulto di Epipygidae (Hemiptera) (foto Rundstedt Rovillos); F - Tubetti calcarei di *Cbaetophyes* (Hemiptera Epipygidae) (foto Anthony Daley); G - Rappresentazione schematica del Tubulo Malpighiano di una forma giovanile di Epipygidae (Hemiptera). TD=tratto distale, TP=tratto prossimale, D=dotto di sbocco, ZF=zona con cellule ricche di fibrille, ZG=zona con cellule ricche di granuli (ridisegnato da MARSHALL, 1964b).

cercopoidei e quelle dei cicadoidei. Le forme giovanili di entrambe le due superfamiglie presentano una microscultura cerosa idrofobica sulla superficie ventrale dell'addome nonché il già citato plastron aerifero protetto dagli stygmacalyps. Questo nelle cicale consente la respirazione anche in suoli umidi o addirittura allagati suggerendo che l'originale funzione degli stygmacalyps fosse la protezione degli spiracoli tracheali da una copiosa escrezione liquida. Vi è inoltre una similitudine spiccata nelle differenziazioni settoriali che presentano i Tubuli Malpighiani di entrambi i gruppi sia durante gli stadi preimaginali che nell'adulto (Fig. 3B) (RAKITOV, 2002). Secondo le ricerche di BOULARD (1965), confermate poi da RAKITOV (2002), la componente proteica prodotta nella parte distale del Tubulo Malpighiano dei cicadoidei servirebbe ad agglutinare le particelle di terreno consentendo all'animale di cementare le pareti della galleria di nutrizione e di costruire i camini esterni di sfarfallamento. Tale liquido servirebbe anche a rimuovere il fango dalle zampe e dalla cuticola del corpo e a proteggerla dagli attacchi fungini avendo proprietà fungicide e fungistatiche. Il liquido, inoltre, avrebbe la capacità di tamponare, come in altre specie, il pH del suolo (SCHRADER, 1994).

Dato che le cicaline sono organismi ammoniotelici (MARSHALL, 1973), è stato supposto che l'escrezione di ammoniaca, vantaggiosa energeticamente, vada considerata un adattamento dei fitomizi (BRODBECK *et al.*, 1993). KATO (1958) suggerisce, a tale proposito, che le sostanze proteiche di scarto, eliminate quando in eccesso, e il mucopolisaccaride, entrambi prodotti dai Tubuli Malpighiani e contenuti negli escreti, servano anche a neutralizzare l'ammoniaca, catabolita tossico, che altrimenti si accumulerebbe intorno alle forme giovanili dei cercopidi. Egli estende inoltre tale ipotesi anche ai cicadidi.

I Tubuli Malpighiani concorrono anche alla formazione dello scudetto dei Diaspididae. In questa famiglia di emitteri coccoidei l'abbondante secrezione delle ghiandole tegumentarie, di natura cerosa e proteica in forma di lunghi filamenti bianchi, viene agglomerata con un secreto cementante di natura mucoproteica prodotto dai Tubuli Malpighiani ed escreto dall'ano che va poi a costituire il doppio scudetto di queste specie (FOLDI, 1982).

Un'ulteriore produzione dei Tubuli Malpighiani è costituita dai sali minerali che possono essere selettivamente prodotti a livello dell'epitelio e accumulati all'interno del tubulo stesso. Tali sostanze negli insetti possono, previa traslocazione, essere utilizzati per varie funzioni. La mineralizzazione della cuticola del pupario, un metodo per con-

ferirgli rigidità con finalità protettiva, è una di queste. Presentano tale possibilità molte specie di ditteri come *Musca autumnalis* (Fig. 1E). Questa è una specie che mineralizza, al momento dell'impupamento, la cuticola del pupario con sali di calcio, di magnesio e di fosforo. Tale fenomeno è noto per molti altri ciclorrafi, anche se non tutti lo effettuano in modo completo. Ad esempio *M. domestica*, effettua una sclerotizzazione più che una mineralizzazione della cuticola del pupario. In *M. autumnalis* per verificare come i sali prodotti selettivamente a livello dei Tubuli Malpighiani vengano trasferiti alla cuticola del pupario è stata analizzata chimicamente l'emolinfa della larva che si sta trasformando in pupa e il pupario in corso di formazione. È stato accertato che alla diminuzione dei sali contenuti nell'emolinfa della larva che si sta trasformando in pupa corrisponde un aumento proporzionale degli stessi nella cuticola pupale. Del contenuto di sali dell'emolinfa l'80% rimane nel pupario abbandonato alla muta, il 5% viene eliminato con il meconio ed il 15% lo si ritrova negli escreti degli adulti. La migrazione dei sali dall'emolinfa ai siti di utilizzo è stata verificata allevando le larve su un medium contenente  $^{45}\text{Ca}$ , cioè un isotopo radioattivo. Questo fenomeno, noto come già detto per molti ciclorrafi, è in realtà stato accertato anche in alcuni ortorrafi come ad esempio negli Stratiomyidae del genere *Sargus* nei quali viene effettuata non solo la mineralizzazione della cuticola pupale ma anche di quella larvale (KRUEGER *et al.*, 1988).. È stato inoltre accertato che contengono carbonato di calcio anche i Tubuli Malpighiani delle larve dei Syrphidae *Eristalis tenax*, *Myiatropa florea*, *Mallota eristaloides*, *Meron equestris*, *Syrirta pipiens*, *Eumerus strigatus*, degli Ptychopteridae del genere *Ptychoptera* (Fig. 1D) (PANTEL, 1914), del Tephritidae *Anastrepha striata* ed altre (KEILIN, 1921).

Anche nel tefritide *Euleia heraclei* (Fig. 1F e 1G) i Tubuli Malpighiani contengono carbonato di calcio ma invece di essere, come nella maggior parte dei ditteri sopra citati, sotto forma di minuscoli granuli in sospensione è presente in forma di duri calcosferiti. Il termine calcosferite sta ad indicare un corpuscolo contenente carbonato di calcio in una matrice organica (HARTIG, 1873). I calcosferiti in genere si ritrovano nel corpo grasso delle larve dei ditteri, ma *E. heraclei* costituisce in tal senso un'eccezione poiché questa specie non ne presenta nel grasso ma al contrario ne ha i Tubuli Malpighiani pieni. I calcosferiti al momento dell'ultima muta vengono disciolti nel fluido periviscerale, poi il carbonato di calcio, passando attraverso la cuticola appena formata della pupa, passa nel liquido ecdisiale. Finalmente, quando que-

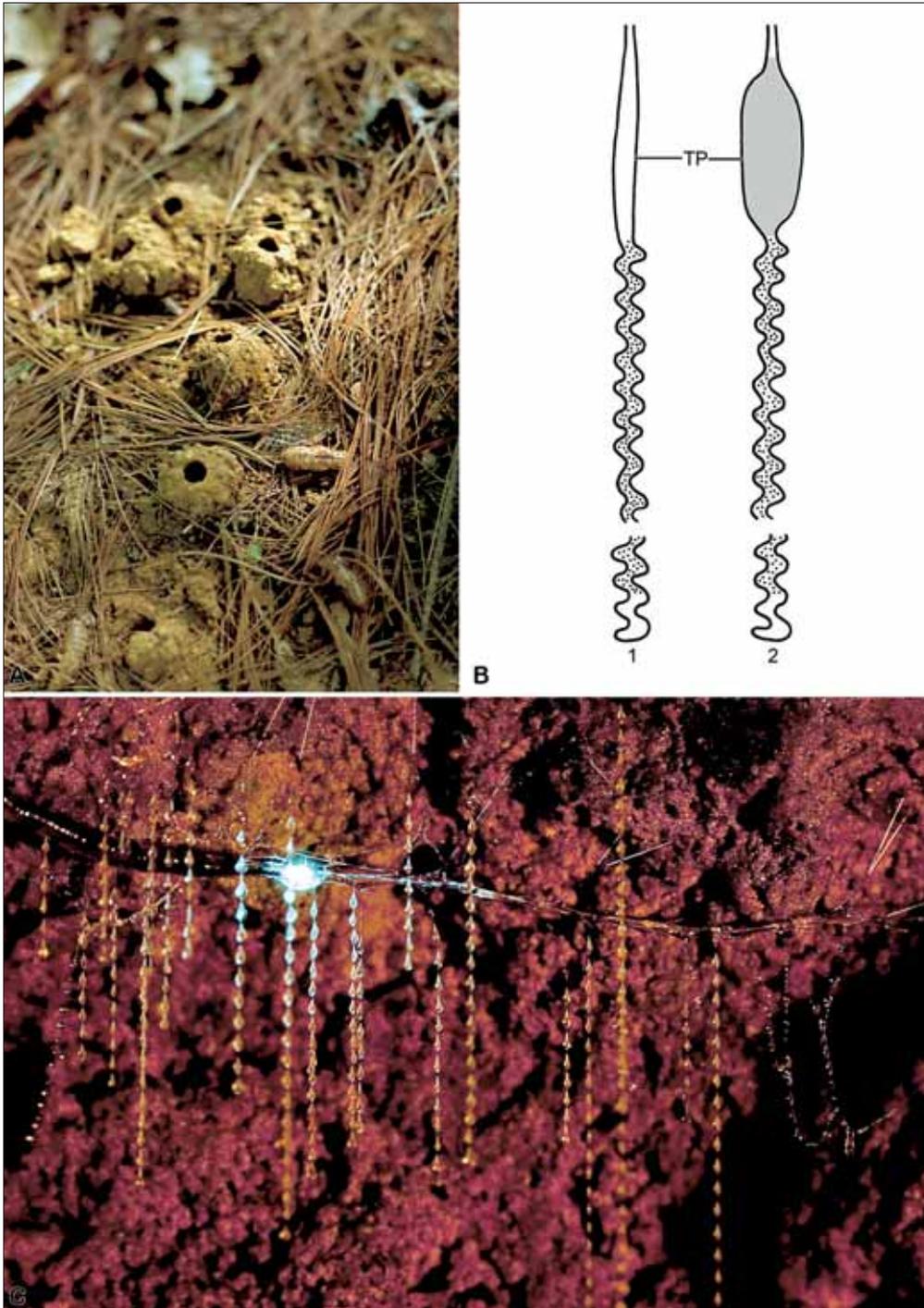


Fig. 3

**A** - Camini di sfarfallamento di Cicadidae (foto Roy Troutman, SBP Studios); **B** - Schema della differenziazione a zone dei Tubuli Malpighiani comune ai cercopoidei e ai cicadoidei. 1) adulti, 2) forme giovanili. TP=tratto prossimale (ridisegnato da Rakitov, 2002); **C** - Larva di *Arachnocampa luminosa* (Skuse) (Diptera Mycetophilidae) (Foto Prof. Chrys Wills).

st'ultimo viene riassorbito il carbonato di calcio si deposita in uno strato duro e brillante sulla superficie interna del pupario. Questo fenomeno è stato anche definito "eliminazione ecdisiale" (KEILIN, 1921).

Nei Lasiocampidi del genere *Eriogaster* (Fig. 4A) e *Melacosoma* i bozzoli sono a forma di uovo da

cui il generico inglese "eggar" (Fig. 4B). Questi bozzoli hanno 2 peculiarità. La prima è che presentano colorazioni dal giallo pallido fino al marrone e la seconda è che sono molto rigidi. La colorazione è dovuta alla clorofilla ingerita con la vegetazione. Infatti in laboratorio le larve se tenute digiune prima dell'incrisalidamento danno bozzo-

li chiari, non pigmentati. Quanto alla durezza del bozzolo è conferita dal carbonato di calcio prodotto nei Tubuli Malpighiani, estruso dall'ano e spalmato sul bozzolo appena formato (TUTT, 1898).

I sali minerali prodotti selettivamente a livello dei Tubuli Malpighiani possono inoltre servire, nei coleotteri cerambicidi, per foderare le pareti della cella pupale e per costruire l'opercolo di chiusura della stessa. FABRE, nel 1891, osserva l'opercolo costruito dalle larve di *Cerambyx* e utilizzato per chiudere l'ingresso delle gallerie realizzate nei tronchi delle querce che descrive così: "La porta di chiusura delle gallerie può essere doppia o tripla. All'esterno è un tappo di trucioli misti a legno masticato mentre all'interno è un opercolo minerale, in un unico pezzo bianco cretaceo, ellittico, concavo, duro come il calcare, liscio nella faccia verso la galleria, nodoso verso l'esterno e che imita alla perfezione il cappello di una ghianda. Esso è costruito con carbonato di calcio mescolato con cemento organico che conferisce consistenza al calcare". In seguito altri autori, basandosi su tali osservazioni, dissezionando larve di *Cerambyx*, hanno potuto osservare che 4 dei 6 Tubuli Malpighiani hanno sviluppo maggiore degli altri e che appaiono "smisuratamente gonfi, rigidi e biancastri". L'analisi chimica del loro contenuto ha rivelato la presenza di carbonato di calcio. Gli altri 2 Tubuli Malpighiani appaiono invece normali e svolgono la funzione escrettrice (MAYET, 1896).

Le osservazioni hanno poi permesso di stabilire che al momento della costruzione dell'opercolo l'intestino è vuoto e che, data la posizione "stomacale" degli sbocchi dei Tubuli Malpighiani, il liquido biancastro con i granuli calcarei in sospensione viene vomitato dalla bocca. Secondo Mayet la presenza del calcare nel terreno sotto la pianta attaccata è fondamentale per i cerambicidi dato che in carenza di tale composto essi non riescono ad accumulare sufficiente carbonato con cui foderare e chiudere le gallerie di ibernazione e le infiltrazioni di acqua comportano muffe e conseguente mortalità delle larve. Per questo motivo i cerambicidi sarebbero più diffusi nei boschi che sorgono su terreni calcarei che in quelli dove il calcare è meno abbondante (MAYET, 1896).

Negli insetti stecco del genere *Carausius* (Fig. 4C), ma più in generale nei fasmidi, il carbonato di calcio viene accumulato nei Tubuli Malpighiani, trasferito nell'emolfinca e utilizzato per l'indurimento del corion delle uova (Fig. 4D). I fasmidi sono, come noto, insetti polinefrici e in *Carausius* spp. sono stati individuati 24 Tubuli Malpighiani superiori, 134 inferiori e 32 centrali (definiti anche appendici del mesenteron). L'analisi

istochimica dei superiori ha messo in luce la presenza di acido urico, non vengono fornite indicazioni sul contenuto delle appendici mesenteriali, ma quelli inferiori, per quanto siano simili ai superiori nella forma, contengono carbonato di calcio, tracce di magnesio e solo piccole quantità di acido urico. Il corion delle uova dei fasmidi contiene grande quantità di ossalato di calcio ritenuto proveniente dai Tubuli Malpighiani. Dato che i Tubuli Malpighiani inferiori sono presenti nelle femmine, poco sviluppati nei maschi e assenti nelle ninfe e dato anche che nelle femmine il loro contenuto in carbonato di calcio diminuisce durante l'oogenesi è stato possibile concludere che il carbonato di calcio accumulato nei Tubuli Malpighiani di queste ultime serve per l'indurimento del corion delle uova. È stato inoltre evidenziato che questi insetti assumono Na, K, Ca e Mg dalle foglie di cui si nutrono ma che utilizzano solo in parte eliminando l'eccedente: l'eliminazione dell'eccedente nei maschi e nelle forme giovanili avviene con le feci. Analogamente, nelle femmine Na, K, e Mg vengono eliminati con le feci ma non il Ca che viene depositato nelle uova prodotte (RAMSAY, 1955; BEDFORD, 1978).

Altre interessanti formazioni, osservate sul corpo di molti emitteri sono i brocosomi (dal greco βρόχος = maglia di una rete e σώμα = corpo). Questi sono corpuscoli dalla forma poliedrica a faccette pentagonali o esagonali internamente compartimentati contenenti lipidi e proteine (ARZONE, 1986). Individuati per la prima volta sul corpo di zanzare e di cicadellidi (TULLOCH *et al.*, 1952) sono stati considerati a lungo una prerogativa di questo ultimo gruppo. In realtà lavori più recenti ne hanno documentato la presenza anche in molte famiglie di eterotteri e fra gli omotteri negli psillidi (WYNIGER *et al.*, 2008). Essi vengono prodotti dai Tubuli Malpighiani, espulsi dall'ano e, in quelle specie che hanno l'abitudine al grooming, distribuiti sul corpo con le zampe dagli individui stessi. La loro funzione è tuttavia ancora incerta. Secondo molti autori essi fungono da sostanze protettive tenendo lontane le particelle di terreno, i microbi, le spore fungine, l'acqua e gli escreti liquidi contenenti ammoniaca (RAKITOV, 1995; 2002a), prevenirebbero il disseccamento della cuticola (ARZONE, 1986), servirebbero da carrier per i feromoni (DAY, 1983) e come particelle riflettenti i raggi UVA nei casi di eccessiva luminosità solare (NAVONE, 1987).

Altra funzione dei Tubuli Malpighiani, complementare a quella escretoria, è la bioluminescenza di alcuni micetofili. Infatti, in alcune specie diffuse nella regione Australiana, le cellule responsabili del fenomeno sono collocate nei Tubuli Malpighiani di questi insetti. Tra queste la più famosa è

*Arachnocampa luminosa*. Questo micetofilide è specie cavernicola che vive in colonie in molte grotte Australiane e Nuova Zelandsi, le quali costituiscono uno spettacolo così stupefacente da essere una vera e propria attrazione turistica.

La specie trascorre la maggior parte della vita come larva (Fig. 3C) che è predatrice. Essa fila, con le ghiandole sericipare labiali, sul soffitto della grotta una specie di rete (da cui il nome *arachno* per analogia con il comportamento dei ragni) nella quale si dispone orizzontalmente aspettando le prede.

In questa specie i Tubuli Malpighiani presentano 4 regioni distinte con funzioni diverse ed è la zona prossimale quella implicata nella produzione di luce. Il bagliore è il risultato della reazione chimica che coinvolge luciferina (un prodotto di scarto), luciferasi, ATP e ossigeno. È stato accertato che la bioluminescenza serve alla larva per attirare prede (BROADLER & STRINGER, 2001).

La larva fila, oltre alla rete, fino a 70 fili di seta di circa 40 cm di lunghezza che da questa si dipartono pendenti verso il basso. I fili, detti “insidie” (Fig. 3C), servono per la cattura delle prede dato che ognuno è invischiato con una trentina di goccioline di muco appiccicoso. In altre specie affini, le goccioline possono essere velenose potenziando la capacità della trappola.

Le prede sono moscerini, mosche, piccoli lepidotteri, piccole lumache o millepiedi ma soprattutto effimere, tricotteri e zanzare, insetti cioè con ciclo legato all’acqua che scorre abbondante sul fondo della grotta. Quando la preda rimane invischiata nel filo di seta, la larva del micetofilide si avvicina velocemente e la mangia viva. Se le prede sono scarse si possono avere anche fenomeni di cannibalismo.

In questa specie oltre alle larve, che fra l’altro sono più brillanti se affamate rispetto a quella che hanno appena mangiato, anche gli adulti di entrambi i sessi sono luminosi ma in questo caso la bioluminescenza intermittente serve presumibilmente per attrarre il sesso opposto. Anche la pupa si illumina ad intermittenza, ma pochi giorni prima di emergere dalla spoglia pupale la femmina, in particolare, aumenta la luminosità che diventa fissa. Il forte bagliore dalla pupa femminile è stato interpretato come un segnale per il maschio che gli indica l’avvicinarsi del momento dell’accoppiamento. Sono infatti frequenti i tentativi di copula dei maschi con le luminose pupe femminili. Gli insetti adulti sono pessimi volatori e rimanendo nella stessa area, danno luogo alla colonia di “luciole” (GREEN, 1979).

Le funzioni alternative dei Tubuli Malpighiani, come già detto, riguardano la produzione delle

sostanze per la costruzione del bozzolo. La maggior parte degli insetti che producono il bozzolo, lo costruiscono con la seta prodotta dalle ghiandole sericipare. In alcuni gruppi, tuttavia, il bozzolo viene costruito con fili dall’apparente consistenza setosa, estrusi dall’ano e prodotti con sostanze provenienti dai Tubuli Malpighiani. Uno dei primi autori che ha messo in evidenza il fatto che in alcuni Coleotteri i Tubuli Malpighiani producevano le sostanze che, impropriamente dette “seta” servivano per la costruzione del bozzolo è stato Silvestri nel 1904 nel suo lavoro sul Carabide *Lebia scapularis* (Fig. 4E). In questa specie, cosa desueta, è la larva di 1a età che costruisce il bozzolo che servirà per la protezione di sé stessa e in seguito degli altri stadi larvali e pupali. Questa specie, ipermetabola, è un attivo predatore di uova, larve e pupe di *Galerucella luteola* (Coleoptera Chrysomelidae). La larva di prima età è campodeiforme ma, a causa dell’attiva nutrizione, cresce a dismisura diventando fusiforme per l’abnorme accumulo di grasso. La larva “per tale enorme ingrassamento”, come dice Silvestri, non può più muoversi agevolmente e potrebbe costituire una facile preda per altri insetti se rimanesse senza protezione. Per questo essa risolve il problema delle sovradimensioni costruendosi un bozzolo con materiale proveniente dai Tubuli Malpighiani, temporaneamente stoccato nella zona rettale che funge da serbatoio e poi filato attraverso l’apertura anale. Tale bozzolo (Figg. 4F e 4G) è ovale e di colorazione dal giallo citrino al bruno. È costruito con fili di grossezza variabile (5-40  $\mu\text{m}$ ) intrecciati e saldati fra loro in modo irregolare a formare un rivestimento rado che lascia intravedere prima la larva e poi la pupa sottostante. Internamente, tuttavia, l’intreccio è più fitto tanto che l’interno del bozzolo sembra sia rivestito da una membranella liscia. La larva lascia per qualche tempo un’apertura nel bozzolo dalla quale può entrare e uscire e continuare a nutrirsi di forme giovanili di *G. luteola* che a volte vi racchiude. Quando la larva di prima età raggiunge la maturità chiude il bozzolo e vi compie la muta trasformandosi in larva di seconda età e del secondo tipo; poi a seguire effettuerà le altre mute fino alla stadio adulto. In questa specie i Tubuli Malpighiani sono 4 riuniti 2 a 2 e di calibro costante per tutta la loro lunghezza fino allo sbocco nell’intestino dove per un breve tratto sono slargati. Nella larva che fila, la parte prossimale dei Tubuli Malpighiani, che è ingrossata, ha pareti costituite da cellule ghiandolari con il citoplasma granuloso e vacuolizzato intorno al nucleo. Nel lume di questa porzione dei Tubuli Malpighiani si osserva materiale non escrezionale



Fig. 4

**A** - Adulto di *Eriogaster lanestris* (L.) (Lepidoptera Lasiocampidae) (foto www.biopix.dk); **B** - Bozzolo di *Eriogaster lanestris* (L.) (Lepidoptera Lasiocampidae) (foto Krzysztof Jonko); **C** - Femmina di *Carausius morosus* (Sinéty) (Heteronemiidae Phasmatodea) (foto Peter Bryant); **D** - Uova di *Carausius morosus* (Sinéty) (Heteronemiidae Phasmatodea) (foto Jaromír Zajíček); **E** - Adulto di *Lebia scapularis* (Fourc.) (Coleoptera Carabidae) (foto Bruno Lavoué); **F** - Rappresentazione schematica del bozzolo di *Lebia scapularis* (Fourc.) (Coleoptera Carabidae) (da SILVESTRI, 1904); **G** - Bozzolo di *Lebia scapularis* (Fourc.) (Coleoptera Carabidae) (foto Bruno Lavoué).

come nel retto ed è attribuita a questo tratto la produzione della “seta”. Il pigidio in queste specie funziona da filiera. Esso non è fornito di appendici speciali ma essendo uno stretto tubo il materiale spinto dalla muscolatura del retto fuori dall’ano assume l’aspetto filiforme (SILVESTRI, 1904).

In *Sitona macularius* (Coleoptera Curculionidae) sono i Tubuli Malpighiani della larva matura (cioè di quarta età) che producono la sostanza per la costruzione del bozzolo. A maturità, infatti, l’e-

tologia larvale si modifica passando da un’attivissima nutrizione ad una fase di inattività completa in ripari vari (sottoterra, anfrattuosità del terreno, confluenza fra due steli, base delle piante...). In questa fase l’intestino è completamente vuoto e la cavità corporea è occupata dall’enorme massa dei Tubuli Malpighiani che elaborano il secreto. Quando la larva è ancora attiva la differenziazione istologica tra i 2 tratti dei Tubuli Malpighiani è particolarmente evidente poiché quello prossima-

le rimane inalterato mentre al contrario le cellule dell'epitelio del tratto distale presentano un aumento del volume del nucleo, del citoplasma, del numero e della dimensione dei granuli di secreto. In seguito, quando la larva diventa quiescente, il segmento distale presenta un gradiente di secrezione: nella parte estrema il processo è agli inizi (i granuli di secrezione sono cioè più piccoli) mentre nei tratti via via più prossimali i granuli sono più grandi fino a divenire globuli. Nella zona adiacente al tratto prossimale si ha già l'estrusione di un secreto in forma di grossi globi coalescenti. Nella larva che sta filando il bozzolo i tratti distali dei Tubuli Malpighiani sono pieni di secreto che invade anche il tratto prossimale, dilatato da quest'ultimo e che viene poi riversato nell'intestino dove, arricchito di altre sostanze secrete dall'epitelio dell'ileo e del colon, si raccoglie in una sorta di ampolla rettale che funziona temporaneamente da serbatoio.

A questo punto la larva esce dalla quiescenza e nel luogo dove si trova, senza riprendere l'attività trofica, inizia la fabbricazione del bozzolo. Questo viene prodotto secondo la tipica maniera degli Hyperinii, prelevando cioè dall'ano di volta in volta, per mezzo dell'apparato boccale, porzioni di secreto che, dopo una parziale solidificazione contro un sostegno, vengono modellate in fili mediante movimenti di trazione e di torsione del capo, del torace e dei primi uriti. Il bozzolo è in genere di forma subsferica, bianca trasparente, di tessitura grossolana cioè con larghi spazi vuoti che lasciano intravedere la pupa verde chiara all'inizio ma più scura con il passare del tempo. I bozzoli possono essere ritrovati sotto un leggero strato di terra o di sabbia, ancorati alle foglie o agli steli delle piante ospiti che nel caso specifico sono due leguminose: *Hedysarum coronarium* e *Onobrychis sativa* (MAZZI & BACCETTI, 1956).

Altri iperini studiati per la formazione del bozzolo con prodotti provenienti dai Tubuli Malpighiani sono *Hypera meles* come pure *Hypera rumicis* (LEBEDEW, 1914; KENCHINGTON, 1983) (Fig. 5A e 5B), che lo producono con un procedimento analogo a quello appena descritto per *S. macularius*. Il fenomeno è tuttavia generalizzabile per tutta la sottofamiglia degli Hyperinii. Anche negli Ptinidae le larve mature filano un bozzolo, dove avrà luogo l'impupamento, con materiale proveniente dai Tubuli Malpighiani (MARCUS, 1930).

Negli imenotteri che si impupano all'interno di un bozzolo, questo viene costruito con i secreti delle ghiandole labiali e meno frequentemente con quelli delle ghiandole colleteriche ma, in alcuni casi, come nell'Eulophidae *Euplectrus bicolor* (Fig. 5C e 5D), il bozzolo viene costruito con pro-

dotti provenienti dai Tubuli Malpighiani. Fu Thomsen, nel 1927, a stabilire per primo che in *E. bicolor* i numerosi Tubuli Malpighiani di cui la specie è dotata (Fig. 5E) producevano nella larva matura il materiale per la costruzione del bozzolo (THOMSEN, 1927). Oggi è tuttavia noto che molti Calcidoidei usano la stessa modalità.

Il fenomeno della produzione del bozzolo, da parte dei Tubuli Malpighiani, nelle larve mature dei neurotteri è noto da tempo e molto studiato.

È noto infatti che nei coniopterigidi (Fig. 6A, 6B, 6C e 6D) le forme giovanili mature prima dell'impupamento costruiscono, con materiale estruso dall'ano e prodotto dai Tubuli Malpighiani, un rado bozzolo costituito da una doppia rete, quella esterna più rada e con funzione di ancoraggio mentre la seconda più interna e compatta che funge da vera e propria protezione (ZIZZARI *et al.*, 2008).

Negli stadi larvali dei neurotteri planipenni (Fig. 6E e 6F) mesenteron e proctodeo presentano un'interruzione per la quale le feci vengono accumulate nel mesenteron e il proctodeo non assolve alla loro eliminazione ma effettua solo l'escrezione raccogliendo i prodotti dei Tubuli Malpighiani e lo stoccaggio temporaneo di tali sostanze. Nello stadio di propupa, che sta filando il bozzolo, l'epitelio del proctodeo, che precedentemente appariva molto sottile, appare molto più spesso, con cellule dotate di lunghi microvilli sporgenti nel lume intestinale e apparentemente in fase secernente. Sono inoltre visibili nel lume dell'intestino 2 tipi di sostanze: una associata all'epitelio in fase secernente, che costituirà il rigido strato interno del bozzolo, e l'altra prodotta dai Tubuli Malpighiani, che costituirà la parte esterna fibrosa del bozzolo stesso (LA MUNYON, 1988; LOZINSKY, 1921).

I tisanotteri, è noto nel corso del loro sviluppo, presentano 2 stadi neanidali (o larvali secondo la letteratura internazionale) attivi e mobili e 2 o 3 stadi afaghi e quiescenti di propupa e pupa. Questi ultimi sono in genere anoici.

Tuttavia in alcune specie, la larva di seconda età produce un bozzolo setoso all'interno del quale l'insetto effettua la ninfosì. Questo fenomeno è stato per la prima volta riportato da Kurdjumov nel 1913 in *Aeolothrips fasciatus* e poi in seguito da altri autori per le altre specie della famiglia Aeolothripidae ma anche per alcuni Tripidae (*Anaphothrips* e *Odontothrips*), Melanthripidae (*Ankothrips*) e Heterothripidae (*Aulacothrips*) (KURDJUMOV, 1913).

Analogamente ai neurotteri e coleotteri precedentemente citati il bozzolo nei tisanotteri viene costruito con una produzione anale ma la provenienza dai Tubuli Malpighiani era stata fino a poco tempo fa solo ipotizzata. Infatti, scopo di un

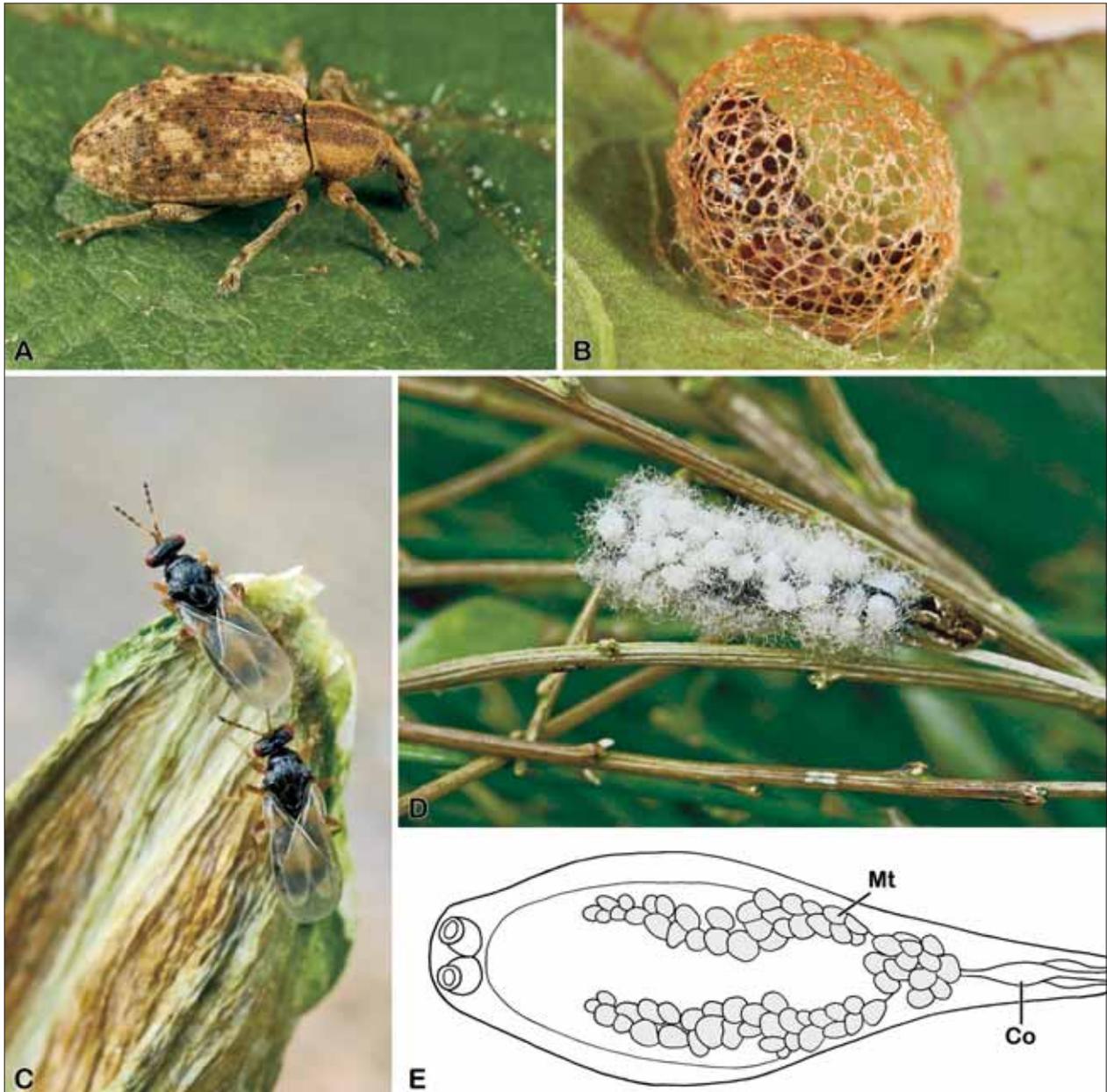


Fig. 5

A - Adulto di *Hypera rumicis* (L.) (Coleoptera Curculionidae) (foto Malcom Storey); B - Bozzolo di *Hypera rumicis* (L.) (Coleoptera Curculionidae) (foto Malcom Storey); C - Adulto di *Euplectrus bicolor* (Swederus) (Hymenoptera Eulophidae) (foto Claude Galand, www.entomart.be); D - Bozzoli di *Euplectrus bicolor* (Swederus) (Hymenoptera Eulophidae) su larva parassitizzata (foto Claude Galand, www.entomart.be); E - Anatomia interna di *Euplectrus bicolor* (Swederus) (Hymenoptera Eulophidae) in vista dorsale. Co=colon, Mt=Tubulo Malpighiano (ridisegnato da Thomsen, 1927).

nostro recente lavoro (CONTI *et al.*, 2010) è stato quello di documentare le modificazioni ultrastrutturali dell'epitelio, nel corso della ninfosi, dei Tubuli Malpighiani di un tisanottero Aeolothripidae che produce il bozzolo e precisamente di *Aeolothrips intermedius* (Fig. 7A). La specie è un'abituale frequentatrice di fiori di numerose piante coltivate e spontanee, sia arboree che erbacee, con netta preferenza per le Leguminose. Gli adulti presentano una caratteristica livrea con ali a bande bianche e nere, tipica della maggior parte delle specie di questo genere.

Le neanidi sono predatrici generiche, pur presentando spiccata preferenza per le forme giovanili di altri tisanotteri, in particolare di *Thrips tabaci*. Gli adulti sono in genere pollinifagi ma la femmina al momento della maturazione delle uova preda. Essa depone uova isolate, inserendole nei tessuti vegetali (nervature fogliari o teneri rametti) di diverse piante erbacee. Subito dopo la schiusa dall'uovo la neanide incomincia la ricerca delle prede di cui nutrirsi, pungendole e succhiandole (CONTI, 2009). Raggiunta la maturità cerca un luogo adatto (alla biforcazione della nervatura fogliare o nelle



Fig. 6

*Conwentzia psociformis* (Curtis) (Neuroptera Coniopterygidae): **A** - Larva; **B** - Bozzolo; **C** - Pupa; **D** - Adulto; **E** e **F** - Emergenza dal bozzolo di pupa dectica di *Chrysoperla carnea* (Neuroptera Chrysopidae) (foto Prof. Urs Wyss).

anfrattuosità del terreno) per tessere un bozzolo che verrà prodotto agitando freneticamente l'addome da destra a sinistra e viceversa per tendere il filo fuoriuscente dall'ano (Fig. 7B). Inizialmente produce una rete dalle maglie larghe per l'ancoraggio e la protezione del bozzolo vero e proprio che

viene prodotto dopo e all'interno del quale effettuerà le 3 mute seguenti fino al raggiungimento dello stadio adulto. Quando l'insetto non si muove più, il bozzolo finito appare costituito da un doppio strato esterno più rado e un velo compatto interno (Fig. 7C). Finché all'interno del bozzolo la

larva non ha ancora effettuato la muta, e la conseguente trasformazione in pupa, se viene disturbata e il bozzolo danneggiato essa si riattiva e lo ripara. Una volta però effettuata la muta essa perde questa possibilità.

I bozzoli ottenuti in laboratorio sono stati osservati al microscopio elettronico a scansione (SEM) ed analizzati chimicamente.

L'esame al SEM mostra un ammasso di filamenti di diverso diametro in genere dalla superficie liscia; solo alcuni di questi presentano numerose piccole spine (Fig. 7D). L'analisi chimica allo spettrometro di massa ha messo in evidenza la cospicua presenza di  $\beta$ -acetil-glucosammina, cioè quel tipo di chitina con cui risultano principalmente costituiti i bozzoli di neurotteri ed alcuni coleotteri, diversa dalla  $\alpha$ -acetil-glucosammina che costituisce la cuticola degli artropodi e dalla  $\gamma$ -acetil-glucosammina tipica dei bozzoli di altri coleotteri, proveniente dalla membrana peritrofica.

I Tubuli Malpighiani delle larve mature prima, durante e dopo la produzione del bozzolo come pure quelli degli adulti neosfarfallati e più vecchi sono stati dissezionati e preparati per l'esame al microscopio elettronico a trasmissione (TEM).

Sia nelle forme giovanili che nell'adulto i Tubuli Malpighiani appaiono come due strutture tubolari che si inseriscono nella regione pilorica e, a circa 100  $\mu\text{m}$  di distanza da questa, si dividono in 2 branche ugualmente lunghe dirette una anteriormente e l'altra posteriormente. Tra i Tubuli Malpighiani dei vari stadi non vi sono quindi differenze di forma bensì di dimensione. Nella figura 8A sono rappresentati quelli dell'adulto che misurano 500  $\mu\text{m}$  di lunghezza e 11  $\mu\text{m}$  di diametro. Nella figura 8B è riportata invece l'immagine di quelli di una larva che si prepara a produrre il bozzolo. Da notare come qui essi triplichino il loro volume.

L'esame al TEM delle sezioni trasversali dei Tubuli Malpighiani degli adulti (sia neosfarfallati che più vecchi) (Fig. 8C) evidenzia la tipica struttura dell'epitelio di tipo escretore. Sono presenti 3 cellule epiteliali principali che circondano il lume del tubulo, dal diametro pari a 7  $\mu\text{m}$ . Il nucleo delle cellule è ellittico e grande. La regione apicale delle cellule presenta una fila ordinata di lunghi microvilli. Nel lume si nota la presenza di piccoli e densi granuli, qualche vescicola e alcuni corpi lamellari. La regione basale delle cellule presenta molte invaginazioni della membrana plasmatica alle quali sono associati molti mitocondri. Nel citoplasma sono presenti molti ribosomi liberi, poche cisterne del reticolo endoplasmatico ed apparati di Golgi, vescicole, lisosomi e urosferiti.

Sempre nell'adulto la zona di raccordo delle 2 branche del Tubulo Malpighiano che si inserisce e

scarica nella zona pilorica a seconda del tratto considerato presenta diversa ultrastruttura. Nel tratto distale (lungo circa 50  $\mu\text{m}$ ) l'aspetto generale dell'epitelio è simile a quello appena descritto, interessato al recupero degli ioni dall'emolinfa, mentre nel tratto prossimale l'epitelio cambia bruscamente aspetto. Qui sono presenti cellule appiattite, meno spesse e dotate di microvilli i quali non sono disposti ordinatamente e apparentemente non vi è recupero di ioni. Nella parte prossimale, le cellule dell'epitelio appaiono dotate di una sottile epicuticola apicale e sono di raccordo con quelle ectodermiche del proctodeo.

Nella larva che sta producendo il bozzolo nelle cellule dell'epitelio non si notano più urosferiti ed i numerosi Golgi (a questo ingrandimento un'area di 1  $\mu\text{m}^2$  ne contiene circa 20) sono impegnati in una intensa attività secernente che si desume dai loro prodotti e che è verosimilmente indotta su base ormonale (Fig. 9A). Il lume del Tubulo Malpighiano è pieno di un prodotto che contiene materiale elettrodensso. Alla base dei microvilli sono visibili grosse vescicole piene di materiale denso. Esse si formano a livello dei Golgi e poi migrano verso il lume del Tubulo Malpighiano dove scaricano il loro contenuto.

I Golgi sono strutture formate da una "zona cis" dotata di cisterne rigonfie a volte connesse con altre a formare un ammasso irregolare di vescicole membranose anastomizzate fra loro, dalla "zona mid" con cisterne piatte che contengono una secrezione densa a cui segue la "zona trans" con vescicole di diversa grandezza. I Golgi sono di solito orientati con la "zona trans" rivolta verso la parte apicale della cellula. Tuttavia, non è raro osservare, nel caso in esame, Golgi con l'asse principale orientato ortogonalmente rispetto alla zona apicale della cellula o addirittura in alcuni casi con la zona trans rivolta inusualmente verso il basso della cellula. L'aspetto generale dei Golgi sembra il risultato della fusione di Golgi vicini, di aspetto tradizionale (Fig. 9B).

Sempre nella larva che sta producendo il bozzolo, nel tratto di collegamento del Tubulo Malpighiano al proctodeo, la struttura generale delle cellule è simile a quella osservata nell'epitelio dei Tubuli Malpighiani degli adulti. Nel citoplasma sono scomparsi i Golgi, i microvilli sono disposti in modo parallelo e circondano il lume del Tubulo Malpighiano nel quale è presente una massa notevole di una densa secrezione. La peculiarità di questo tratto è la presenza nella cellula di una notevole quantità di granuli di glicogeno (che occupa la maggior parte del citoplasma) come tipicamente avviene nelle cellule addette al riassorbimento delle sostanze da recuperare.

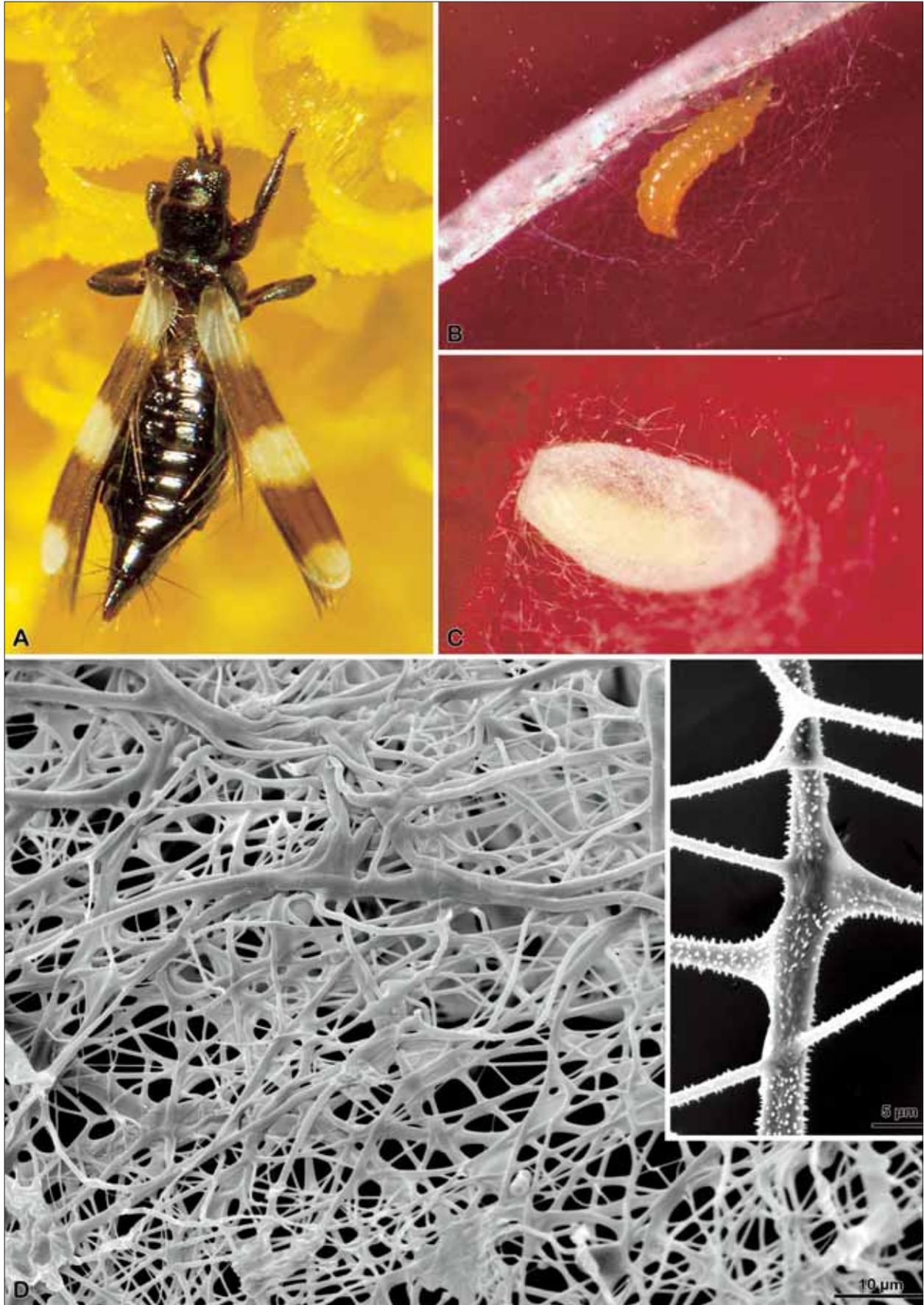


Fig. 7

*Aeolothrips intermedius* Bagnall: A - Femmina; B - Larva matura che ha appena iniziato la produzione del bozzolo; C - Bozzolo completamente formato; D - Bozzolo esaminato al SEM, dettaglio per mostrare le spinescenze cuticolari.



Fig. 8

*Aeolotrips intermedius* Bagnall: **A** - Intestino medio (MG) di individuo adulto con i 2 Tubuli Malpighiani (MT) che si dividono in due branche, una anteriore, parallela al mesenteron e una orientata posteriormente. Appare evidente la zona di sbocco dei 2 Tubuli Malpighiani a livello della regione pilorica e le papille rettali (RP). HG= intestino posteriore; **B** - Intestino medio (MG) di neanide matura. I 2 Tubuli Malpighiani (MT) sono simili per forma a quelli dell'individuo adulto ma da questi differiscono per il volume che appare triplicato. HG= intestino posteriore; **C** - Sezione trasversale del Tubulo Malpighiano di un individuo adulto nella quale i numerosi urosferiti (\*) indicano l'intensa attività escrettrice delle cellule epiteliali.

L'epitelio del proctodeo, nel quale sfocia il Tubulo Malpighiano, presenta, nella larva che produce il bozzolo, la stessa struttura dell'adulto ma il suo lume è pieno della secrezione prodotta dal Tubulo Malpighiano. I muscoli che circondano il sottilissimo epitelio sono spesso contratti nella fase di rilascio della secrezione.

Quindi dalle evidenze sperimentali sopra riportate è stato possibile concludere che:

- nei tisanotteri i Tubuli Malpighiani sono coinvolti nella produzione del bozzolo. Ciò si evince dalla modificazione del loro epitelio nel corso del processo di estrusione. I Tubuli Malpighiani quindi svolgono, nel caso specifico, una funzione

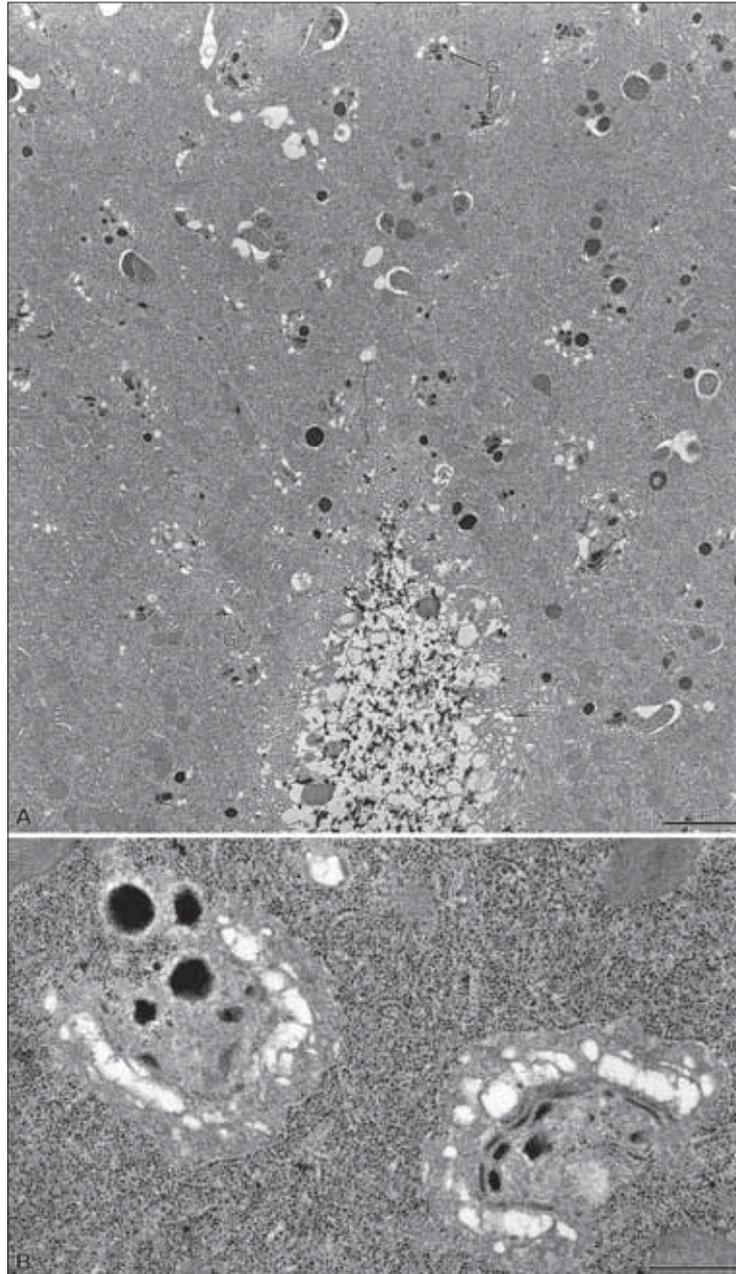


Fig. 9

A - Sezione trasversale di un Tubulo Malpighiano di una larva di secondo stadio che sta producendo il bozzolo. Il basso ingrandimento permette di osservare il citoplasma delle cellule epiteliali estremamente ricco in apparati di Golgi (G) con vescicole elettrondense e reticolo endoplasmatico rugoso. L= lume del Tubulo Malpighiano; B - Dettaglio di due apparati di Golgi di grandi dimensioni.

alternativa all'escrezione che tuttavia viene ristabilita nello stadio adulto seguente;

- dalle analisi gas-cromatografiche effettuate è stato accertato che il bozzolo è costituito da -acetilglucosammina, cioè da una sostanza chitino-simile con cui risultano fatti anche i bozzoli dei neuroteri e dei coleotteri precedentemente citati (CONTI *et al.*, 2010).

Concludendo, la presente rassegna sulle le funzioni espletate dai Tubuli Malpighiani, è il frutto di una ricerca bibliografica, sicuramente non è completamente esaustiva dato che, come visto, la casi-

stica è molto ampia. Moltissime funzioni, inoltre, espletate dai Tubuli Malpighiani diverse dall'escrezione sono a tutt'oggi ancora da indagare e chiarire.

#### RINGRAZIAMENTI

Porgiamo i nostri più sentiti ringraziamenti agli autori delle foto, citati nelle didascalie, che cortesemente ci hanno concesso la possibilità di riprodurle.

*Acknowledgments:* Many thanks are due to Authors of the photos for their kind authorization to reproduction.

BIBLIOGRAFIA CONSULTATA

- ARZONE A., 1986 – *Brocosomi: origine, forma, funzione*. - Atti dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia R.C., 34: 59-71
- BEDFORD O., 1978 – *Biology and Ecology of the Phasmatodea*. - Annual Review of Entomology, 23: 125-149
- BOULARD M., 1965 – *Notes sur la biologie larvaire des cigales (Homoptera Cicadidae)*. - Annales de la Société Entomologique de France, 1: 503-522.
- BRASS P., DAS L., 1914 – *Abdominalsegment der Käferlarven als Bewegungsorgan*. Zoologische Jahrbucher. - Abteilung für Systematik, Ökologie und Geographie der Tiere, 37: 65-122.
- BROADLEY R.A., STRINGER A.N., 2001 – *Prey attraction by larvae of the New Zealand glowworm, Arachnocampa luminosa (Diptera: Mycetophilidae)*. - Invertebrate Biology 120(2): 170-177.
- BRODBECK B.V., MIZELL R.F. III, ANDERSEN P.C., 1993 – *Physiological and behavioral adaptations of three species of leafhoppers in response to the dilute nutrient content of xylem fluid*. - Journal of Insect Physiology, 39 (1): 73-81.
- CONTI B., 2009 – *Notes on the presence of Aeolothrips intermedius in northwestern Tuscany and on its development under laboratory conditions*. - Bulletin of Insectology, 62 (1): 107-112.
- CONTI B., BERTI F., MERCATI D., GIUSTI F., DALLAI R., 2010 – *The ultrastructure of Malpighian tubules and the chemical composition of the cocoon of Aeolothrips intermedius Bagnall (Thysanoptera)*. - Journal of Morphology, 271 (2): 244-254.
- DAY M.F., 1993 – *Brochosomes of Australian Cicadelloidea*. In: Drosopoulos S., Petrakis P.V., Claridge M.F., de Vrijer P.W.F. (Eds.) - Proceedings of Eighth Auchenorrhyncha Congress, Delphi, Greece: 1011.
- EMEL'YANOV A.F., 1987 – *The phylogeny of Cicadina (Homoptera: Cicadina) based on morphological data*. In: Tobias V.I. (ed.) Morphological Grounds of Insects Phylogeny. Proceedings of URRS Entomological Society, 69 Nuaka Leningad.
- EVANS J.W., 1940 – *Tube-building cercopids (Homoptera: Machaerotidae)*. - Transaction of Royal Society of South Australia, 64 (1): 70-75.
- FABRE J.H., 1891 – *Le capricorne*. In: Souvenirs entomologiques IV Série. Études sur l'instinct et les mœurs des insectes. Paris, Librairie Ch. Delagrave. Soc. Anonyme d'Imprimerie de Villefranche de Rouergue, 330 pp.
- FOLDI I., 1982 – *Étude structurale et expérimentale de la formation du bouclier chez les Cochenilles Diaspines (Hom. Coccoidea Diaspididae)*. - Annales de la Société Entomologique de France, 18 (3): 317-330.
- GREEN L.B.S., 1979 – *The fine structure of the light organ of the New Zealand glow-worm Arachnocampa luminosa (Diptera: Mycetophilidae)*. - Tissue and Cell, 11: 457-465.
- HARTING P., (1873) – *Recherches de morphologie synthétique sur la production artificielle de quelques formations calcaires organiques*. Verhandelingen der Koninklijke Nederlandsche Akademie van Wetenschappen. Afdeling Natuurkunde, Amsterdam, 14: 84 pp.
- KEILIN D., 1921 – *On the calcium carbonate and the calcospherites in the Malpighian tubes and the fat body of Dipterous larvae and the ecdysial elimination of these products of excretion*. - Quaterly Journal of Microscopical Science, 65: 611-625.
- KENCHINGTON W., 1983 – *The larval silk of Hypera spp. (Coleoptera: Curculionidae). A new example of the cross-protein conformation in an insect silk*. Journal of Insect Physiology, 29 (4): 355-361.
- KLEINE R., 1916 – *Cassida nebulosa L. und ihr Fraßbild. Eine biologische Betrachtung*. - Stettiner entomologische Zeitung, 77: 187-216, taf. II-VII.
- KLEINE R., 1917 – *Cassidenstudien III. Über Cassida rubiginosa Müll.* - Entomologische Blätter, 13: 63-73.
- KRUEGER R.A., CROCE A.B., HOPKINS T.L., KRAMER K.J., 1988 – *Calcium transport from Malpighian tubules to puparial cuticle of Musca autumnalis*. - Journal of Comparative Physiology B, 158: 413-419..
- LA MUNYON C.W., ADAMS P.A., 1987 – *Use and effect of an anal defensive secretion in larval Chrysopidae (Neuroptera)*. - Annals of the Entomological Society of America, 80 (6): 804-808.
- LEBEDEW K., 1914 – *Ueber die als Sericterien funktionierenden Malpighischen Gefäße der Phytonomus larven*. - Zoologischer Anzeiger, 44: 49-56.
- LENGERKEN (VON) H., 1939 – *Die Brutfürsorge und Brutpflegeinstinkte der Käfer*. Akademische Verlagsgesellschaft. Geest and Portig, Leipzig, 386 pp.
- LICENT P.E., 1912 – *Récherches d'anatomie et de physiologie comparées sur le tube digestif des Homoptères supérieurs*. - La cellule, 28: 7-161
- MARCUS B.A., 1930 – *Untersuchungen über die Malpighischen Gefäße bei Käfern. V. Ptiniden*. - Zeitschrift für Morphologie und Ökologie der Tiere, 19: 629-643.
- MARSHALL A.T., 1964a – *Spittle-production and tube-building by cercopid nymphs (Homoptera)*. 1. *The cytology of the Malpighian tubules of spittle-bug nymphs*. - Quaterly Journal of Microscopical Science, 105: 257-262 .
- MARSHALL A.T., 1964b – *Spittle-production and tube-building by cercopid nymphs (Homoptera)*. 2. *The cytology and function of the granule zone of the Malpighian tubules of tube-building nymphs*. - Quaterly Journal of Microscopical Science, 105 (4): 415-422.
- MARSHALL A.T., 1973 – *Protein synthesis and secretion by Malpighian tubules of cercopoid larvae (Homoptera)*. - Journal of Insect Physiology, 19: 2317-2326.
- MAYET V.M., 1896 – *Un nouvelle fonction des tubes de Malpighi*. - Bulletin de la Société Entomologique de France, 1: 122-127.
- MAZZI V., BACCETTI B., 1956 – *Prime osservazioni sui tubi malpighiani e la secrezione di seta in Donus crinitus Bob.* - Bollettino di Zoologia, 23 (2): 137-148.
- NAVONE P., 1987 – *Origine struttura e funzioni di escreti e secreti entomatici di aspetto ceroso distribuiti sul corpo mediante zampe*. - Annali della Facoltà di Scienze Agrarie dell'Università di Torino, 14: 237-294.
- PANTEL J., 1914 – *Signification des glandes annexes intestinales des larves de Ptychopteridae et observations sur les tubes de Malpighi de ces Nématocères (larves et adultes)*. - La Cellule, 29: 393-429.
- RAKITOV R.A., 1995 – *The covering formed by brochosomes on the cuticle of leafhoppers (Homoptera: Cicadellidae)*. - Entomological Revue, 74 (9): 90-103.
- RAKITOV R.A., 2002 – *Structure and function of the malpighian tubules and related behaviours in juveniles Cicadas: evidence and homology with spittlebugs (Hemiptera: Cicadoidea & Cercopoidea)*. - Zoologischer Anzeiger, 241: 117-130.
- RAKITOV R.A., 2002a – *What are brochosomes for? An enigma of leafhoppers (Hemiptera, Cicadellidae)*. - Denisia, 4: 411-432.

- RAMSAY J.A., 1955 – *The excretory system of stick insect, Dixippus morosus (Orthoptera, Phasmidae)*. - The Journal of Experimental Biology, 32: 183-199
- ROVERSI P.F., BACCETTI B., 1994 – *Ecologia ed etologia di Haematoloma dorsatum (Abrens) (Homoptera Cercopidae)*. - Redia, 77 (1): 133-150.
- SCHRADER S., 1994 – *Influence of earthworms on the pH conditions of their environment by cutaneous mucus secretion*. - Zoologischer Anzeiger, 233: 211-219.
- SILVESTRI F., 1904 – *Contribuzione alla conoscenza della metamorfosi e dei costumi della Lebia scapularis Fourc. con descrizione dell'apparato sericiparo della larva*. - Redia, 2: 68-84.
- SPIEGLER P.E., 1962 – *The origin and nature of the adhesive substance in larvae of the genus Chrysopa (Neuroptera: Chrysopidae)*. - Annals of Entomological Society of America, 55: 69-77.
- THOMSEN M., 1927 – *Some observations on the biology and anatomy of a cocoon-making chalcid larva, Euplectrus bicolor*. - Swed. Dansk Naturhistorisk Forening i Kobenhaven. Videnskabelige Meddelelser, 84: 73-89.
- TULLOCH G.S., SHAPIRO J.E., COCHRAN G.W. (1952) – *The occurrence of ultramicroscopic bodies with leafhoppers and mosquitoes*. - Bulletin of Brooklyn Entomological Society, 47: 41-42.
- TURNER J.S., 1994 – *Anomalous water loss rates from spittle nests of spittlebugs Aphrophora saratoga (Homoptera: Cercopidae)*. - Comparative Biochemistry and Physiology, 107A (4): 679-683.
- TUTT J.W., 1898 – *The Lasiocampids*. - Proceedings of the South London Entomological and Natural History Society, Vol. 1899-1900.
- WEBER H., 1933 – *Lehrbuch der Entomologie*. - Jena, 450 pp.
- WHITE J., STREHL C.E., 1978 – *Xylem feeding by periodical cicada nymphs on tree roots*. - Ecological Entomology, 3: 323-327.
- WIGGLESWORTH V.B., 1974 – *The principles of insect physiology*. London, Chapman & Hall: 827pp.
- WYNIGER D., BURCKHARDT D., MÜHLETHALER R., MATHYS D., 2008 – *Documentation of brochosomes within Hemiptera with emphasis on Heteroptera (Insecta)*. - Zoologischer Anzeiger, 247: 239-341.
- ZIZZARI Z.V., LUPETTI P., MANCARELLI C., DALLAI R., 2008 – *Sperm ultrastructure and spermiogenesis of Coniapterygidae (Neuroptera, Insecta)*. - Arthropod Structure & Development, 37: 410-417.



