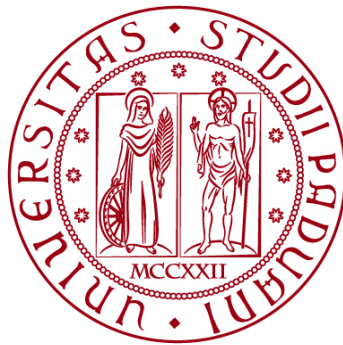


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia Molecolare



ELABORATO DI LAUREA

**ANALISI EVOLUTIVA DEI SEGNALI DI ATTRAZIONE PER GLI
IMPOLLINATORI: LA RADIAZIONE INFRAROSSA NELLE
PIANTE TERMOGENICHE.**

**Tutor: Prof.ssa Barbara Baldan
Dipartimento di Biologia**

**Co-tutor: Dott.ssa Elisabetta Offer
Dipartimento di Biologia**

Laureando: Davide Virginio

ANNO ACCADEMICO 2025/2026

INDICE

ABSTRACT	V
1. STATO DELL'ARTE	1
1.1 Introduzione.....	1
2. METODOLOGIE	3
2.1 Quantificazione della termogenesi.....	3
2.2 Trascrittomica.....	4
2.3 Tracciamento dell'attività dei coleotteri su coni maschili e femminili durante la termogenesi	4
2.4 Esperimenti a due scelte con modelli 3D di coni	6
2.5 Esperimenti comportamentali con radiazioni termiche infrarosse e stimoli olfattivi.....	7
2.6 Registrazioni del singolo sensillo	8
2.7 Selezione e analisi strutturale.....	9
2.8 Profili dei volatili delle piante a seme (spermatofite).....	9
2.9 Dati di riflettanza di coni e fiori.....	10
2.10 Modellizzazione del sistema visivo per i principali impollinatori.....	10
2.11 Analisi comparative delle caratteristiche di impollinazione.....	11
3. RISULTATI.....	13
3.1 Interazione mutualistica tra <i>Zamia furfuracea</i> e <i>Rhopalotria furfuracea</i>	13
3.2 IR come segnale di impollinazione.	14
3.3 Strutture sensoriali in <i>Pharaxonotha floridana</i> e <i>Rhopalotria furfuracea</i>.	15
3.4 Base molecolare della sensibilità alle IR	18
4. DISCUSSIONE.....	20
4.1 Evoluzione segnali di impollinazione.....	20
4.2 Conclusioni	22
4.3 Opinioni personali.....	24
5. BIBLIOGRAFIA.....	25
APPENDICE	25

ABSTRACT

Le piante hanno sviluppato un repertorio sorprendente di segnali per attrarre gli impollinatori e instaurare relazioni mutualistiche. Il colore e il profumo dei fiori sono alcuni dei segnali più noti e studiati. Alcune piante, dette termogeniche, sono in grado di attirare gli impollinatori producendo calore, derivante dalla respirazione cellulare, a livello degli organi riproduttivi. La radiazione infrarossa termica (IR), generata da queste piante, può essere considerata uno dei più antichi segnali di impollinazione. Analisi comparative suggeriscono una transizione, avvenuta in tempi remoti, da una segnalazione basata sugli infrarossi a una in cui il colore diventa prevalente nelle piante da fiore. In parallelo, lo studio delle antenne dei coleotteri impollinatori delle piante termogeniche ha rilevato la presenza di neuroni attivati dagli infrarossi con canali ionici termosensibili. I risultati di questa ricerca chiariscono l'esistenza di un'antica modalità sensoriale alla base dell'evoluzione dell'impollinazione, uno dei processi fondamentali di co-evoluzione tra piante e animali per la sopravvivenza delle specie.

1.STATO DELL'ARTE

1.1 Introduzione

Molte piante sono in grado di produrre calore per aumentare la loro temperatura rispetto a quella ambientale, come gli animali endotermici. La produzione di energia termica è sempre stata considerata come un adattamento delle piante ai climi freddi, per favorire la volatilizzazione dei composti volatili organici (VOC) in grado di attirare gli impollinatori o per la creazione di un rifugio caldo per gli impollinatori (Seymour et al 2003). Più recentemente la produzione di calore è stata considerata come un segnale diretto per gli impollinatori (Zhu et al, 2011). La produzione di calore avviene tramite una reazione metabolica detta termogenesi, la quale è strettamente legata alla via respiratoria mitocondriale delle piante. La respirazione cellulare attuata tramite la catena trasporto elettroni consiste in una serie di ossidazioni e fosforilazioni che portano alla produzione di ATP, ma questa classica via non è in grado di produrre il calore che si riscontra nelle piante termogeniche. Infatti, esiste un processo biochimico che favorisce la dissipazione di energia chimica, ottenuta dalle reazioni redox, sotto forma di energia termica. Questa via è detta cyanide-resistant respiratory pathway (via respiratoria cianuro resistente), ed è basata su una ossidasi alternativa detta AOX, la quale è una proteina omo-dimerica presente a livello della membrana interna del mitocondrio di cui esistono 6 isoforme ad oggi isolate. In questa via non si verificano reazioni di fosforilazione, ciò porta ad una resa energetica minore rispetto alla respirazione cellulare classica, perché parte dell'energia chimica viene dissipata sotto forma di calore.

Oltre alla via basata sulla ossidasi alternativa, vi è una seconda via in grado di produrre energia termica. Perché questa via funzioni è fondamentale la presenza delle PUMP (plant uncoupling mitochondrial proteins) proteine presenti nella membrana interna del mitocondrio. Esse favoriscono la dissipazione del gradiente di H^+ nello spazio inter-membrana favorendo l'aumento di concentrazione all'interno della matrice, tutto questo senza produrre ATP, ma l'energia che si produce, dal passaggio degli anioni, è trasformata in calore e dissipata (*Fig. 1*) (Zhu et al, 2011).

Queste due vie, alla base della produzione di calore delle piante termogeniche operano principalmente a livello degli organi riproduttivi: fiori (angiosperme) e coni (gimnosperme). Dalle analisi attuate dagli autori sui coni di alcune cicadine termogeniche è stata riscontrata una concentrazione di mitocondri maggiore rispetto agli altri tessuti non termogenici, e una maggior trascrizione di AOX (isoforma 1) e PUMP. Inoltre si osserva una sovraregolazione dei geni che controllano la sintesi di trasportatori di carboidrati e di amidi, oltre alla presenza di un elevato numero di amiloplasti colmi di amido. Questi dati sono stati ricavati dalle analisi trascrizionali dei microsporofilli dei coni maschili di una cicadina termogenica: *Zamia furfuracea*. *Zamia furfuracea* appartiene alle cicadi che costituiscono il più antico lignaggio vivente di piante da seme impollinate dagli animali e rappresentano complessivamente oltre la metà di tutte le specie vegetali termogene conosciute (12–16). Queste gimnosperme presentano organi riproduttivi maschili e femminili distinti, che si sviluppano su piante separate e sono caratterizzati da cicli giornalieri di emissioni volatili che stimolano il movimento dei coleotteri impollinatori tra le piante maschili (che producono il polline) e quelle femminili (che portano gli ovuli).

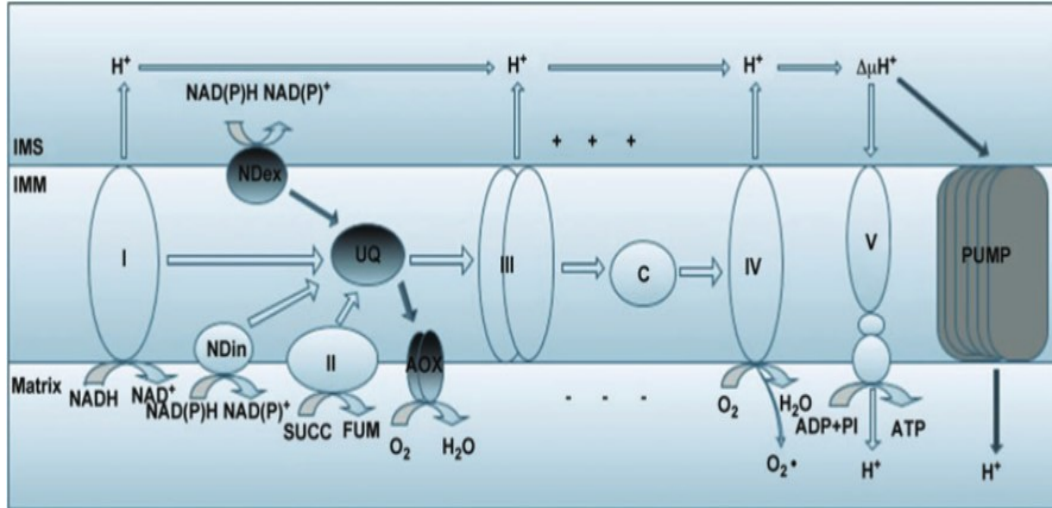


Figura 1 (Zhu et al, 2011). Diagramma della catena di trasporto degli elettroni a livello mitocondriale nelle piante e dei sistemi di dissipazione dell'energia chimica. I sistemi di dissipazione dell'energia chimica sotto forma di energia termica sono mostrati in nero

La termogenesi, infatti, è regolata dai ritmi circadiani, cicli biologici che si ripetono ogni 24 ore, più o meno, che regolano determinate funzioni vitali dell'organismo. Gli autori hanno evinto dalle analisi trascrizionali di *Z. furfuracea* la presenza di una concentrazione maggiore di un fattore regolatore chiamato REVEILLE (rve).

Questo fattore maggiormente espresso dal tardo pomeriggio alla notte corrisponde al periodo in cui si ha il picco della termogenesi. È noto che il cono maschile e quello femminile presentano ritmi circadiani differenti per quanto riguarda l'evento di termogenesi, infatti, i picchi, distano 3 ore uno dall'altro. Questa osservazione ha spinto gli autori a studiare la relazione tra la termogenesi in *Zamia* e il comportamento degli impollinatori.

2.METODOLOGIE

2.1 Quantificazione della termogenesi

Le temperature (T) dei coni e dell'ambiente sono state registrate per 231 individui appartenenti a 58 specie vegetali tra il 2020 e il 2024. Le misurazioni della T sono state ottenute utilizzando datalogger a termocoppia a 4 canali HOBO UX120-014M dotati di cavi di tipo 3MK (accuratezza: $\pm 0,7$ °C). I sensori a termocoppia (diametro ~ 1 mm) sono stati accuratamente inseriti negli sporofilli maschili e femminili in tre posizioni: le regioni apicale, mediana e basale dei coni. Il quarto canale del datalogger ha registrato la T ambiente vicino al cono. Le misurazioni della temperatura per i coni maschili e femminili sono state registrate a intervalli di 10 secondi per un periodo da 1 a 14 giorni.

Le telecamere termiche ad alta risoluzione FLIR C5 Compact Thermal Imaging e FLIR ONE Pro High-Resolution Thermal Imaging (accuratezza: ± 3 °C) sono state utilizzate per identificare i coni termogenici sul campo e valutare l'eterogeneità spaziale nel riscaldamento. I dati sulla termogenesi sono stati raccolti da cicadine selvatiche in Florida (USA), Brasile e Colombia, oltre che in collezioni botaniche presso il Montgomery Botanical Center (MBC), il Kampong National Tropical Botanical Garden e l'Orto Botanico di Medellín (Colombia).

Il set di dati più esteso è stato ottenuto per *Zamia furfuracea* (n = 56) e utilizzato per sviluppare e addestrare un Hidden Markov model (HMM) che distingue gli eventi termogenici dalle fluttuazioni della T ambientale. L'entità, il picco e la durata della termogenesi, così come le dinamiche di riscaldamento e raffreddamento, sono stati stimati a partire da questi modelli.

2.2 Trascrittomica

I coleotteri *Rhopalotria furfuracea* (Coleoptera: Belidae) e *Pharaxonotha floridana* (Coleoptera: Erotylidae) sono stati catturati in natura sui coni maschili e femminili delle cicadine ospiti, rispettivamente *Zamia furfuracea* e *Zamia integrifolia* (Cycadales: Zamiaceae). Sono stati generati trascrittomi de novo tessuto-specifici dai coleotteri *P. floridana* e *R. furfuracea*, nonché dalla cicadine *Zamia furfuracea*. Circa 1.000 coleotteri per specie sono stati dissezionati e i tessuti sono stati raggruppati e congelati in RNAlater fino all'utilizzo. I tessuti vegetali sono stati raccolti direttamente da tre diversi individui maschili sul campo e conservati in ghiaccio secco fino al momento dell'utilizzo. L'estrazione dell'RNA, la preparazione della libreria e il sequenziamento dell'RNA sono stati eseguiti da Genewiz (Azenta) utilizzando una piattaforma HiSeq (2x150 bp). Il trimming degli adattatori è stato eseguito utilizzando trim Galore e i trascrittomi di riferimento de novo sono stati assemblati con Trinity. Gli open reading frame sono stati identificati utilizzando transdecoder e annotati con Diamond. Le reads sono state pseudo allineate ai trascrittomi di riferimento de novo e l'abbondanza è stata stimata utilizzando Kallisto. Per identificare i recettori candidati coinvolti nella termogenesi, è stata eseguita un'analisi differenziale dell'espressione genica tra coni pre-deiscenti non termogenici e coni deiscenti termogenici. Per restringere il campo dei recettori candidati potenzialmente coinvolti nella ricerca del calore nei coleotteri impollinatori, si sono analizzati i trascrittomi delle antenne alla ricerca di trascritti annotati con funzioni termosensoriali in Uniprot (<http://uniprot.org/>) per la selezione dei dieci candidati più arricchiti.

2.3 Tracciamento dell'attività dei coleotteri su coni maschili e femminili durante la termogenesi

I movimenti dei coleotteri tra i coni maschili e femminili sono stati tracciati utilizzando:

a) esperimenti in campo aperto per osservare il movimento dei coleotteri in condizioni naturali. 20 piante in vaso di *Zamia furfuracea* sono state divise in due

gruppi posti a 50 metri di distanza: uno composto da piante femminili recanti coni recettivi e l'altro da piante maschili recanti coni che rilasciavano polline. Tre giorni dopo, gli impollinatori *Rhopalotria furfuracea* sono stati marcati utilizzando polveri fluorescenti biodegradabili e non tossiche (Eco-18 Signal Green, Eco-21 Magenta e Eco-14 Orange; DayGlo Color Corp, Cleveland, OH, USA) Valencia-Montoya et al. (2017). I pigmenti fluorescenti sono stati applicati giornalmente alle 17:00 sui coni maschili deiscenti, subito prima dell'inizio del picco di termogenesi. I coni femminili recettivi sono stati esaminati per verificare le visite dei coleotteri ogni ora, dalle 17:00 alle 23:00, per cinque giorni consecutivi utilizzando una lampada a luce ultravioletta (UV Black Light) TaoTronics TT-FL002. Sono state registrate le T dei coni femminili e le tracce fluorescenti lasciate dagli impollinatori al momento della visita.

b) esperimenti di movimento dei coleotteri in un ambiente controllato monitorando continuamente la T dei coni. 30 coni maschili deiscenti e tre coni femminili recettivi sono stati raccolti e collocati in sacchetti di rete. Sensori a termocoppia sono stati inseriti negli sporofilli e la T dei coni è stata registrata ogni secondo come descritto sopra. I coleotteri in uscita dai coni maschili sono stati contati ad intervalli di 15–30 minuti tra le 15:30 e le 23:45. Per valutare l'attrazione dei coleotteri verso i coni femminili, i sacchetti di rete contenenti i coni femminili sono stati collocati all'interno di una gabbia a rete di 40 × 40 × 60 cm, insieme a 10 coni maschili deiscenti che ospitavano coleotteri *R. furfuracea* raccolti sul campo. Il numero di coleotteri in arrivo sui coni femminili è stato contato ad intervalli di 15–30 minuti tra le 15:30 e le 23:45. Per analizzare il comportamento, il numero totale di coleotteri in uscita dai coni maschili e di quelli in arrivo sui coni femminili è stato sommato per ciascun intervallo temporale tra gli esperimenti. Questi valori sono stati normalizzati rispetto al numero massimo di coleotteri osservati uscire dai coni maschili e al numero massimo osservato sui coni femminili nell'arco di tutte le osservazioni.

2.4 Esperimenti a due scelte con modelli 3D di coni

Per disaccoppiare il ruolo della radiazione infrarossa come segnale di impollinazione da altri segnali noti come il profumo e l'umidità del cono, sono stati condotti esperimenti comportamentali utilizzando coni di cicadine tridimensionali stampati in 3D e riscaldati artificialmente. I coni artificiali sono stati riscaldati utilizzando sabbia desertica asciutta e inodore, la cui temperatura corrispondeva alle temperature medie registrate nei coni maschili e femminili durante la termogenesi delle specie di cicadine testate oppure alla temperatura ambiente.

Per le prove in campo, due coni artificiali sono stati fissati a picchetti da terreno in plastica e posizionati a circa 20 cm di distanza tra loro a un'altezza di circa 20 cm dal suolo, vicino a piante maschili e femminili selvatiche di *Zamia furfuracea*. Un cono è stato riscaldato come descritto sopra, mentre l'altro è stato mantenuto a temperatura ambiente. Per impedire ai coleotteri di apprendere la temperatura del cono attraverso il trasferimento di calore per conduzione, i coni stampati in 3D sono stati rivestiti con Tanglefoot Tangle-Trap trasparente e inodore, garantendo che ciascun insetto potesse compiere un'unica scelta al momento dell'atterraggio.

Per controllare ulteriormente il trasferimento di calore convettivo e conduttivo, sono stati condotti ulteriori esperimenti in gabbie a rete di $40 \times 40 \times 60$ cm in condizioni controllate. I coni stampati in 3D, quello riscaldato e quello a temperatura ambiente, sono stati posizionati a circa 20 cm di distanza all'interno delle gabbie. Le correnti d'aria attorno alle gabbie sono state bloccate per ridurre al minimo il trasferimento di calore tramite convezione. Inoltre, per isolare ulteriormente il ruolo della radiazione infrarossa controllando al contempo il calore convettivo, i coni sono stati avvolti in una pellicola di polietilene (trasparente per circa il 99% agli infrarossi), posizionata a circa 1 cm dalla superficie del cono e fissata con un sottile filo d'acciaio.

Sia negli esperimenti in campo che in quelli in gabbia, il numero di coleotteri che hanno visitato ciascun cono è stato registrato dopo 15-30 minuti. Sono stati registrati solo i coleotteri che hanno effettuato una scelta. Per tenere conto di potenziali bias spaziali, le posizioni dei coni riscaldati e di quelli a temperatura ambiente sono state alternate tra una prova e l'altra. Tutti gli esperimenti sono stati

condotti durante la finestra temporale in cui i conigli maschili e femminili subiscono naturalmente la termogenesi, al fine di considerare le variazioni circadiane nel comportamento dei coleotteri impollinatori. La significatività statistica è stata valutata mediante un test di proporzione in R 4.4.0, in cui la proporzione di risposte positive è stata verificata rispetto a un'ipotesi nulla di 0,5, indicante l'assenza di preferenza tra i conigli riscaldati e quelli a temperatura ambiente.

2.5 Esperimenti comportamentali con radiazioni termiche infrarosse e stimoli olfattivi

Per determinare se la rimozione dell'apice delle antenne potesse abolire le risposte comportamentali dei coleotteri al calore, sono stati condotti esperimenti controllati su singoli individui di *Pharaxonotha floridana* (da 1 a 4 settimane di età). I coleotteri sono stati immobilizzati in puntali di micropipette da 200 μ L e posizionati sotto una telecamera da microscopio CMOS AmScope per la registrazione del comportamento. Ciascun coleottero è stato esposto in sequenza a quattro stimoli: calore, calore (controllo), profumo del cono e profumo (controllo) del cono, per 10 secondi per ciascuno stimolo. Se si fosse osservato una risposta, lo stimolo successivo sarebbe stato presentato dopo che il coleottero aveva cessato il movimento. L'ordine degli stimoli è stato randomizzato tra le diverse prove.

Per la stimolazione termica agli infrarossi, un resistore è stato riscaldato alla temperatura di picco raggiunta dai conigli della pianta ospite del coleottero (34 °C) e posizionato a una distanza di 5 cm dall'antenna del coleottero su un piano orizzontale. Gli esperimenti sono stati condotti all'interno di una gabbia di elettrofisiologia completamente chiusa per evitare correnti d'aria e il trasferimento di calore convettivo. Simulazioni di fluidodinamica sono state effettuate in COMSOL Multiphysics v. 6.3 per riprodurre le condizioni dell'apparato sperimentale, confermando che il trasferimento di calore convettivo era trascurabile, poiché la temperatura attorno al coleottero si stabilizzava alla temperatura ambiente (20 °C). Come controllo, un resistore identico è stato presentato alla stessa distanza, ma mantenuto a temperatura ambiente.

Per la stimolazione olfattiva, un sistema di erogazione del flusso d'aria controllato trasportava il composto metil salicilato (Sigma-Aldrich #84332-1L), il principale volatile del cono della pianta ospite del coleottero. Lo stimolante olfattivo è stato dapprima disciolto in DMSO e poi diluito in soluzione extracellulare fino a una concentrazione finale dello 0,1% di DMSO e 5 mM di metil salicilato. Come controllo è stata utilizzata una soluzione di solo solvente (0,1% DMSO).

Il movimento dei coleotteri è stato registrato e analizzato utilizzando ImageJ (NIH) generando proiezioni per differenza di stack per quantificare il movimento. Script Python personalizzati sono stati utilizzati per l'elaborazione dei dati e sono stati calcolati intervalli di confidenza al 95% per valutare la significatività statistica.

2.6 Registrazioni del singolo sensillo

I coleotteri adulti di *Pharaxonotha floridana* sono stati raccolti sul campo e immobilizzati in puntali da micropipetta da 200 µL. L'antenna è stata posizionata e fissata utilizzando un capello umano su un vetrino copri oggetto fissato con nastro adesivo per garantire stabilità. I potenziali d'azione extracellulari sono stati registrati utilizzando elettrodi di tungsteno affilati tramite elettrolisi. Un elettrodo di riferimento è stato inserito nell'occhio del coleottero, mentre un elettrodo di registrazione è stato posizionato accuratamente alla base del sensillo bersaglio fino a rilevare distinti segnali neuronali.

Gli stimoli termici sono stati erogati tramite due flussi d'aria secca alternati e impostati a temperature diverse, controllati mediante un micromanipolatore realizzato su misura. Il flusso d'aria è stato preconditionato facendolo passare attraverso un elemento riscaldante regolato da un resistore. Una sonda a termocoppia (sensore AutoMate Scientific 03) è stata collocata adiacente all'antenna per misurare la temperatura in parallelo attraverso un canale indipendente. La stimolazione meccanica è stata applicata regolando, leggermente, l'elettrodo di registrazione pur mantenendo l'integrità del segnale. I segnali neurali sono stati amplificati (10×, Syntech Universal AC/DC Probe; <http://www.syntech.nl>), digitalizzati a 10.667 campioni al secondo (sistema di

acquisizione dati/amplificatore IDAC-4, Syntech) e filtrati (100-3000 Hz, con soppressione del rumore a 50/60 Hz) prima di essere trasmessi a un computer tramite un'interfaccia USB-IDAC.

2.7 Selezione e analisi strutturale

Le sequenze simili al recettore TRPA1 sono state estratte dai genomi degli artropodi. Gli omologhi di TRPA1 provenienti da diversi cladi di artropodi, tra cui insetti, aracnidi e crostacei decapodi, sono stati utilizzati come query per la ricerca iterativa di sequenze omologhe di TRPA1 sia strettamente che lontanamente imparentate utilizzando jackHMMER con un e-value di $10e-20$. Le diverse isoforme sono state identificate mediante mappatura su sequenze di riferimento e tramite ispezione manuale in Geneious Prime v.2022.2 (<https://www.geneious.com>).

AlphaFold3 (31) è stato utilizzato per predire una struttura omo-tetramerica del canale TRPA1(B) di *P. floridana* e per annotare caratteristiche strutturali quali i domini di ripetizione anchirinica e i domini transmembrana.

2.8 Profili dei volatili delle piante a seme (spermatofite)

Per confrontare l'emissione di sostanze volatili tra le linee evolutive delle piante a seme, è stato assemblato un dataset relativo alle sostanze volatili dei conifere e dei fiori provenienti da piante termogeniche e uno da un gruppo di famiglie di piante con seme non termogeniche di dimensioni equivalenti, selezionate casualmente da Pherobase. Per ciascuna specie, è stata codificata la presenza o l'assenza di singoli composti volatili ed è stata costruita una matrice binaria dei profili. È stata eseguita un'analisi delle componenti principali (PCA) per visualizzare le differenze nella composizione dei volatili tra i gruppi termogenici e non termogenici.

2.9 Dati di riflettanza di coni e fiori

I coni di 23 specie di cicadine e le infiorescenze di 32 specie di aracee sono stati raccolti presso il Montgomery Botanical Center e il Fairchild Botanical Garden. I colori sono stati misurati utilizzando uno spettrometro compatto ThorLabs CCS200 dotato di una sonda a fibra ottica. Gli spettri sono stati mediati su cinque misurazioni effettuate da diverse angolazioni e normalizzati rispetto alla media di cinque misurazioni della luce di fondo. Gli spettri sono stati misurati da 200 nm a 1000 nm ed elaborati utilizzando il software ThorSpectra v3.35.

La libreria Python Selenium è stata utilizzata per estrarre gli spettri grezzi di riflettività floreale e i metadati dal database di riflettività floreale "FReD". I dataset di riflettanza dei coni di cicadine e dei fiori sono stati combinati e filtrati per l'intervallo 300-700 nm, che comprende lo spettro visibile dei principali impollinatori. I dati grezzi di riflettività sono stati elaborati utilizzando la funzione "prospec" del pacchetto R "pavo" (70) per gestire i valori negativi, impostando il valore minimo a zero e normalizzando e levigando gli spettri con uno span di 0,2. La funzione "sensmodel" è stata utilizzata per modellare la sensibilità nello spettro delle due opsine visive dei coleotteri sulla base della sensibilità di picco caratterizzata da saggi di espressione funzionale e sovrapposta agli spettri di riflettanza dei coni. Gli spettri normalizzati sono stati tracciati e colorati in base alla tonalità (hue) definita come la lunghezza d'onda di massima riflettanza.

2.10 Modellizzazione del sistema visivo per i principali impollinatori

Per studiare come i principali impollinatori percepiscono i segnali cromatici, gli spettri di riflettanza di coni e fiori sono stati mappati sui rispettivi spettri di assorbimento degli impollinatori: coleotteri, api e farfalle. Il modello visivo per il coleottero *Pharaxonotha floridana* è stato costruito utilizzando la funzione "vismodel", incorporando i dati dello spettro delle opsine dell'ultravioletto (UV) e delle lunghezze d'onda lunghe (LW). Per la visione delle api (*Apis mellifera*), è stato utilizzato il modello dell'esagono cromatico, che caratterizza la percezione

tricromatica negli imenotteri. Per modellare il sistema visivo tetracromatico della maggior parte delle farfalle impollinatrici, sono stati utilizzati i valori di sensibilità dei fotorecettori delle farfalle *Heliconius*.

Gli spettri di riflettanza dei con i e dei fiori sono stati tracciati all'interno di ciascun modello visivo utilizzando la funzione "colspace" nel pacchetto R "pavo". Tutti i modelli hanno tenuto conto dell'adattamento di von Kries, che regola la sensibilità dei recettori in base alle condizioni di luce ambientale, e hanno utilizzato la funzione di irraggiamento D65 per rappresentare l'illuminazione diurna standard.

2.11 Analisi comparative delle caratteristiche di impollinazione.

Banche dati su larga scala e la letteratura pubblicata sono state esaminate per documentare la termogenesi e la diversità cromatica attraverso le principali famiglie di piante con seme (Spermatophyta). Per verificare se la termogenesi sia associata ad antiche linee evolutive di piante con seme, cladi delle famiglie termogeniche sono state confrontate con quelle di un gruppo di dimensioni equivalenti di famiglie di piante a seme non termogeniche selezionate casualmente. Le differenze sono state valutate utilizzando l'ANOVA filogenetica per tenere conto della storia evolutiva condivisa. Per valutare la diversità cromatica all'interno delle famiglie di Spermatophyta, è stato compilato un set di dati completo sui tratti del colore dei fiori utilizzando il database TRY Plant Trait. Attraverso circa 16.500 record globali, sono state identificate otto ampie categorie nominali di colore: blu, marrone, verde, arancione, rosa, viola, rosso, bianco e giallo. Immagini rappresentative di oltre 130.000 specie sono state recuperate da iNaturalist (www.inaturalist.org), The World List of Cycads (www.cycadlist.org) e Palm Web (www.palmweb.org). GPT-4V (con visione) è stato utilizzato per dedurre i colori dei fiori e dei con i.

Per stimare la diversità cromatica, la ricchezza e gli indici di diversità di Shannon e Simpson sulle categorie di colore per ciascuna famiglia di piante sono stati considerati sia includendo che escludendo le specie con colore.

Metodi di ricostruzione dello stato di massima verosimiglianza (ML) sono stati utilizzati per testare modelli di codipendenza tra termogenesi e diversità cromatica

in una filogenesi modificata delle piante a seme. È stato utilizzato il modello filogenetico dei minimi quadrati generalizzati (PGLS) con stima di massima verosimiglianza del segnale filogenetico (λ) per valutare l'associazione tra diversità cromatica e termogenesi. Inoltre, è stata valutata la codipendenza tra questi tratti quando considerati come discreti, sulla base della distribuzione bimodale dei valori di ricchezza del colore. 1.000 alberi ricampionati tramite bootstrap con lunghezze dei rami e valori dei tratti permutati casualmente hanno tenuto conto dell'incertezza filogenetica. L'evoluzione correlata della termogenesi e della diversità cromatica è stata ulteriormente valutata utilizzando il metodo di Pagel, come implementato nella funzione *fitPagel* del pacchetto R "phytools", e i parametri del modello sono stati ottimizzati utilizzando *fitDiscrete*. Sono stati testati due modelli evolutivi: (1) evoluzione indipendente e (2) dipendenza reciproca dei tratti. La selezione del modello si è basata sui pesi dell'Akaike Information Criterion (AIC). Per il modello maggiormente supportato, la distribuzione dei rapporti di verosimiglianza e dei valori p è stata analizzata per valutare la significatività statistica attraverso gli alberi ricampionati tramite bootstrap.

Per ricostruire la cronologia evolutiva della termogenesi e della diversificazione degli insetti, sono stati raccolti dataset fossili, stime dei tempi di divergenza e stime Bayesiane dei tassi di diversificazione dalla letteratura recente. Le cicadine, insieme al *Ginkgo biloba*, rappresentano la più antica linea evolutiva vivente di piante con seme che producono polline e si affidano all'impollinazione. Individuare l'origine della termogenesi all'interno di questo clade può offrire informazioni sulla relazione temporale tra la termogenesi e la comparsa dell'impollinazione. I dati della letteratura e le misurazioni sul campo sono stati integrati per assegnare un punteggio alla presenza, all'assenza e all'intensità della termogenesi dei coni attraverso le Cycadales e outgroup selezionati. Questo dataset è stato utilizzato per effettuare la ricostruzione dello stato ancestrale della termogenesi attraverso le cicadine utilizzando metodi di massima verosimiglianza implementati nel pacchetto R "phytools". La termogenesi è stata modellata come un tratto discreto e la temperatura di picco del cono come un tratto continuo. Infine, è stata consultata la letteratura per caratterizzare le interazioni delle cicadine con le famiglie di coleotteri e per documentare i fossili di impollinatori delle cicadine.

3. RISULTATI

3.1 Interazione mutualistica tra *Zamia furfuracea* e *Rhopalotria furfuracea*

L'impollinatore obbligato della *Z. furfuracea* è un coleottero curculionide appartenente alla famiglia delle Belidae: *Rhopalotria furfuracea*. Queste tipologie di coleotteri vengono definite anche con il termine “veri punteruoli”, in quanto presentano il rostro, un prolungamento solido della testa che ricorda una proboscide, dove all'estremità è presente un apparato boccale masticatore. Viene definito impollinatore obbligato in quanto il suo ciclo vitale è strettamente legato al cono maschile di *Z. furfuracea*. Si nutre, si accoppia e depone le uova sul cono maschile, le sue larve si nutrono e si schiudono a livello dello stelo del cono e maturano. Il ciclo vitale dura dai 7/8 giorni, durante il periodo di impollinazione di *Z. furfuracea* possiamo trovare diverse generazioni in un singolo cono (Shayla et al, 2020). Alla fine della stagione riproduttiva della cicadea le larve di *R. furfuracea* entrano in uno stato di diapausa (arresto metabolico geneticamente programmato), all'interno dello stelo del cono maschile ormai secco, e rimarranno in questo stato fino alla nuova stagione riproduttiva (Shayla et al, 2020).

Per osservare i movimenti di *R. furfuracea* a livello del cono maschile gli autori hanno catturato degli esemplari ai quali è stata applicata, a livello delle zampe, una pittura ultravioletta fosforescente (*Fig. 2A-B*). Gli esemplari sono stati rilasciati in una zona dove si trovavano coni maschili e femminili a una distanza di 50m uno dall'altro. I campioni (coleotteri) si sono diretti verso il cono maschile, muovendosi verso le zone con temperatura maggiore (osservazione delle tracce lasciate dalla pittura ad ultravioletti) (*Fig. 2C*) ciò suggerisce come i segnali termici possano effettivamente essere un attrattivo per gli impollinatori. In seguito, si è attuato un esperimento in gabbia in cui si valutava l'occupazione dei coni maschili e femminili dei coleotteri correlato agli eventi di termogenesi delle due tipologie di coni, inoltre si è osservato che gli scarabei si muovono attivamente tra un cono e l'altro (*Fig. 2D*). Il movimento tra i coni si osservava durante gli eventi di termogenesi che nei due coni (maschile e femminile), a causa del diverso ritmo circadiano, si presenta in maniera asincrona (tre ore di distanza uno dall'altro). La termogenesi potrebbe essere un segnale dinamico che porta gli impollinatori a spostarsi dal cono maschile,

quello in cui vivono, a quello femminile. Questo processo viene definito push-pull, che letteralmente significa spingere-tirare. Il cono maschile tramite i VOC (composti organici volatili) e il calore prodotto all'inizio della termogenesi, attira gli impollinatori (pull), mentre al massimo picco della termogenesi alla massima produzione e rilascio dei VOC si realizza l'abbandono del cono maschile da parte di *R. furfuracea* (push), i quali verranno attirati dal cono femminile che si trova all'inizio del processo di termogenesi. Questo succede perché l'impollinatore è attirato da una concentrazione media/bassa di VOC (presenti all'inizio della termogenesi), mentre se le concentrazioni aumentano (picco termogenesi), l'impollinatore, le percepisce come uno stimolo per andarsene verso coni con concentrazioni di VOC minori, presenti nel cono femminile (Shayla et al, 2020).

3.2 IR come segnale di impollinazione.

Sulle analisi in campo attuate in precedenza, gli autori, non hanno potuto distinguere il ruolo, nell'attrazione degli impollinatori, dei singoli segnali: Infrared Radiation (IR), VOC e umidità. Per poterli filtrare hanno attuato un esperimento in campo, ma con i coni in condizioni controllate. Gli autori hanno riprodotto in 3D dei modelli di coni di *Z. furfuracea* ottenuti da scansioni di coni veri (*Fig. 2E-F*). I coni, per l'esperimento, sono stati posizionati vicino a vere *Zamie* e venivano riscaldati in maniera artificiale nello stesso modo in cui avrebbero fatto dei veri coni, simulando l'evento di termogenesi (*Fig. 2G*). Questo ha permesso agli autori di eliminare due variabili, i VOC e l'umidità. Infine, i coni sono stati ricoperti da una trappola adesiva inodore e incolore così che i coleotteri *R. furfuracea* rimanessero attaccati al cono che visitano senza però toccarlo direttamente così da non avere conducibilità termica. Si è osservato che i coleotteri preferivano posarsi sui coni riscaldati rispetto ai controlli a temperatura ambiente. In questo caso la temperatura è l'unico fattore variabile tra i coni. I risultati suggeriscono che l'emanazione di segnali termici, IR, possono funzionare da fattori a corto-medio raggio per attirare gli impollinatori.

Per confermare i dati ottenuti si è attuato un altro esperimento, in ambiente controllato, nel quale si cercava di limitare al minimo il trasferimento del calore in modo convettivo, coprendo i coni 3D con un film di polietilene (permetteva il

passaggio del 99% della IR) posizionato a 1cm dalla superficie del cono e limitando l'ingresso di correnti d'aria (Fig. 2H). In questo ambiente controllato e in cui l'unico, probabile, fattore di impollinazione è la IR, i coleotteri hanno preferito posarsi sui coni con temperatura maggiore (maggiore emissione di IR) ciò conferma che IR è un segnale in grado di attirare gli impollinatori.

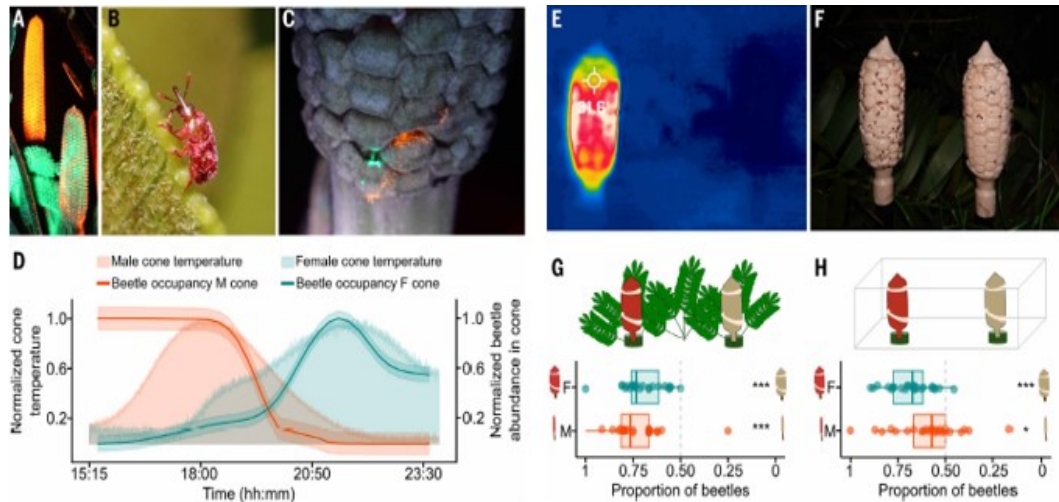


Figura 2. (A) Coni maschili della cicade *Z. furfuracea* che rilasciano polline marcato con coloranti UV-fluorescenti per tracciare il movimento dei coleotteri. (B) Un coleottero impollinatore (*R. furfuracea*) ricoperto di polline e coloranti UV-fluorescenti mentre trasporta il polline dalle piante maschili a quelle femminili. (C) Cono femminile di *Z. furfuracea* che mostra segni di coloranti fluorescenti lasciati dai coleotteri impollinatori durante il trasferimento del polline. (D) Presenza di coleotteri nei coni maschili e femminili durante la termogenesi. $n = 570$ coleotteri nei coni maschili; $n = 278$ coleotteri nei coni femminili. (E) Esperimenti sul campo che utilizzano modelli stampati in 3D di coni femminili riscaldati (a sinistra) e non riscaldati (a destra). (F) Visite dei coleotteri impollinatori ai coni stampati in 3D riscaldati artificialmente (a sinistra) rispetto a quelli a temperatura ambiente (a destra). (G) Proporzioni di coleotteri che visitano modelli stampati in 3D di coni maschili e femminili riscaldati (a sinistra) e non riscaldati (a destra) in esperimenti sul campo. Coni femminili: $n = 25$ esperimenti, $n = 1025$ coleotteri, $P < 0,0001$. Coni maschili: $n = 31$ esperimenti, $n = 518$ coleotteri, $P < 0,0001$. (H) Proporzioni di coleotteri che visitano modelli stampati in 3D di coni maschili e femminili riscaldati (a sinistra) e non riscaldati (a destra) in esperimenti in gabbia che controllano il calore conduttivo e convettivo. Coni femminili: $n = 26$ esperimenti, $n = 1187$ coleotteri, $P < 0,0001$. Coni maschili: $n = 25$ esperimenti, $n = 1154$ coleotteri, $P < 0,001$.

3.3 Strutture sensoriali in *Pharaxonotha floridana* e *Rhopalotria furfuracea*.

Z. furfuracea e *R. furfuracea* presentano un forte legame mutualistico, ottenuto da millenni di coevoluzione che ha permesso di rifinire i segnali della pianta verso l'impollinatore, mentre, quest'ultimo si è evoluto per captarli al meglio. I ricercatori assumono che lo stretto rapporto di coevoluzione abbia permesso al coleottero di riconoscere i segnali termici di *Z. furfuracea*. Per dimostrarlo hanno analizzato gli organi di senso elementari dell'insetto: le sensille, delle estroflessioni della cuticola

che sono in contatto con il sistema nervoso e che trasformano stimoli chimici, tattili e termici in segnali nervosi (Fig. 3D-I). Si può facilmente determinare il loro funzionamento in base alla loro morfologia, posizione e numero. Le sensille possono trovarsi per lo più a livello delle antenne e dei palpi boccali. Oltre alle sensille, i ricercatori hanno cercato, a livello delle antenne, delle strutture dette peg-in-pit coeloconic sensilla composte da una invaginazione della cuticola (pit) al cui centro svetta un pilo sensoriale (peg). Solitamente queste strutture sono associate e controllano dei neuroni in grado di rispondere agli stimoli sensoriali (Fig. 3E-H-L). Questi organi di senso sono stati analizzati e vagliati in due specie di coleotteri impollinatori di cicadee termogeniche: *R. furfuracea* e *Pharaxonotha floridana* (Fig. 3A-B). Analizzando il segmento più distale dell'antenna dei due impollinatori hanno trovato, tramite analisi morfologiche e di distribuzione, grandi quantità di sensille con funzione termosensibile (Fig. 3C-G). Per esser certi, i ricercatori, hanno attuato l'analisi elettrofisiologica di un singolo sensillo all'estremità dell'antenna di *P. floridana*, che effettivamente reagiva agli stimoli termici. In seguito, hanno provato ad eccitare, tramite calore, due sensille coeloconiche differenti, le quali erano collegate a neuroni termosensibili che hanno risposto agli stimoli in maniera differente (Fig. 3M-N). Il primo ha reagito immediatamente all'aumento della temperatura, nel secondo caso hanno avuto la risposta da parte di due classi di neuroni che si attivavano e si inibivano alla presenza di calore. Per comprendere se queste strutture termosensibili abbiano una utilità per l'impollinatore nel riconoscere le IR emesse dalle piante termogeniche hanno messo a punto un test, nel quale si osservano i comportamenti di coleotteri immobilizzati all'esposizione di IR e salicilato di metile (un VOC) proveniente dai coni di *Cycas*, il controllo positivo. Gli impollinatori rispondevano ad entrambi i segnali, ma quando la porzione più distale dell'antenna, dove erano presenti le strutture sensoriali termosensibili, veniva eliminata gli scarabei non reagivano più allo stimolo dato dalle IR, ma solo a quello del salicilato di metile (Fig. 3O-P). L'esperimento conferma che gli organi sensoriali specializzati descritti in precedenza sono in grado di captare segnali dati dalle IR.

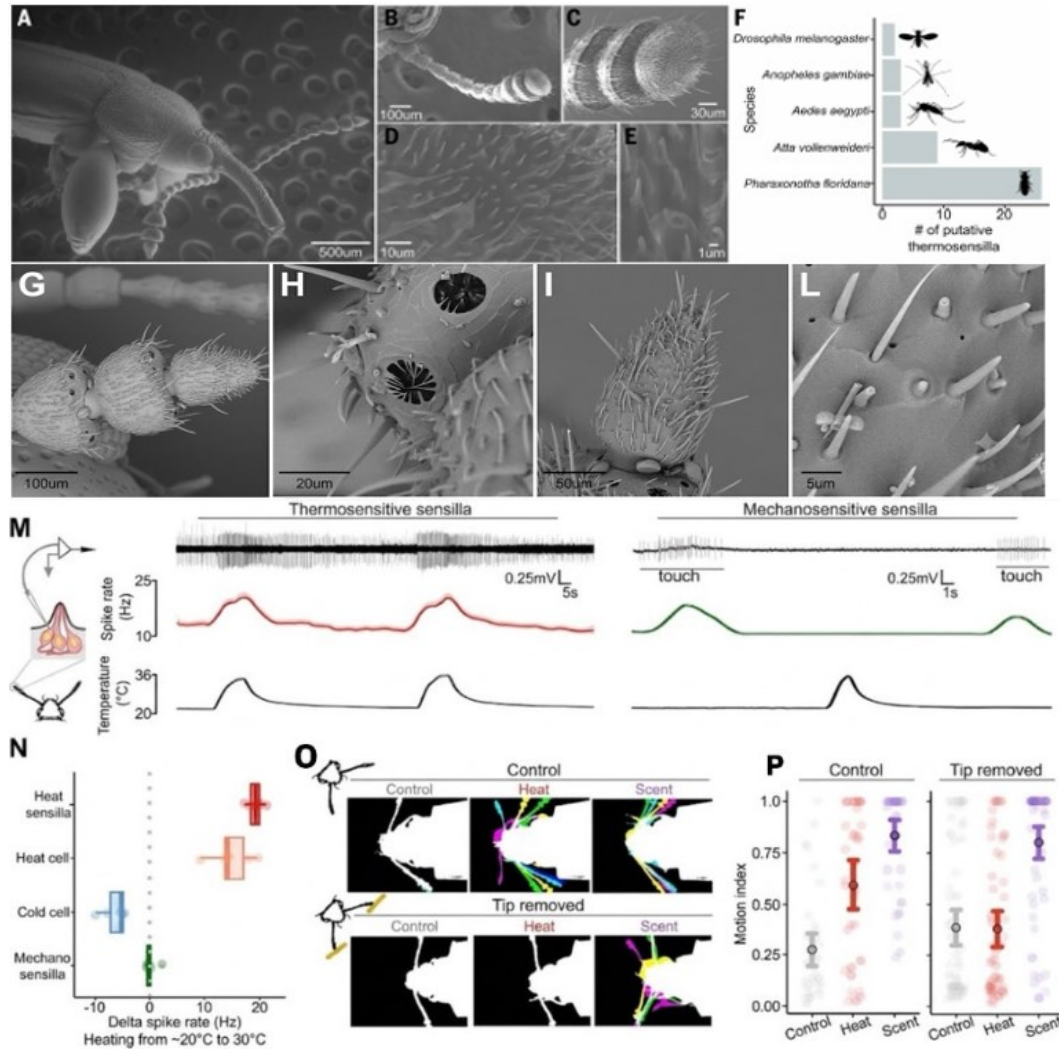


Figura 3 (A) Immagini al microscopio elettronico a scansione (SEM) dell'insetto impollinatore *R. furfuracea*, che impollina la pianta termogenica *Z. furfuracea*. (B) Immagine SEM di un'antenna dell'insetto impollinatore *P. floridana*, che impollina la pianta termogenica *Z. integrifolia*. (C) Immagine SEM degli ultimi tre segmenti antennali di *P. floridana* che mostrano gli organi sensoriali (sensilli). (D) Vista ingrandita della diversità dei sensilli nel segmento antennale terminale di *P. floridana*. (E) Immagine SEM che mostra la morfologia di un sensillo termosensibile a forma di piolo in fossetta (coeloconic peg-in-pit) nel segmento antennale terminale di *P. floridana*. (F) Numero di sensilli termosensibili ("termosensilli") in diverse specie di insetti. (G) Micrografie a scansione elettronica (SEM) degli ultimi tre segmenti antennali del coleottero impollinatore *Rhopalotria furfuracea*. (H) *R. furfuracea* ha mostrato tasche sensoriali antennali sul secondo e terzo segmento antennale, ma non sul segmento terminale. (I) Sensilli termosensibili candidati raggruppati nel segmento antennale terminale. (L) Vista ravvicinata di un sensillo celoconico nel segmento antennale terminale. (M) A sinistra, risposte neurali alla radiazione termica da parte di un singolo sensillo termosensibile situato nel segmento antennale terminale del coleottero *P. floridana*. A destra, risposte neurali alla radiazione termica e al tatto da parte di un sensillo meccanosensibile nel segmento antennale terminale. (N) Variazioni della frequenza di scarica da diversi sensilli antennali in risposta al riscaldamento da circa 20° a circa 30°C ($P < 0,0001$ per le risposte dei sensilli termosensibili al calore, $n = 6$ a 7 sensilli; i box plot rappresentano l'intervallo interquartile e le linee mediane rappresentano la mediana). (O e P) Movimenti antennali dei coleotteri impollinatori con (controllo) e senza l'ultimo segmento antennale (punta rimossa) in risposta alla radiazione termica e all'odore del cono. I colori rappresentano diversi intervalli di tempo che indicano il movimento delle antenne. $n = 40$ a 67 coleotteri. Le barre d'errore rappresentano l'intervallo di confidenza al 95% e i punti medi rappresentano la media.

3.4 Base molecolare della sensibilità alle IR

Per determinare su quali basi molecolari si fonda il meccanismo sensoriale, gli autori hanno condotto un'analisi trascrittomiche delle antenne e di altri organi di *P. floridana* (Fig. 4A), da cui sono stati isolati i trascritti che più probabilmente possono corrispondere a geni termosensibili: GR28b (Gustatory Receptor28b), IR21a (Ionotropic Receptor 21a) e molte isoforme di TRPA1 (Transient Receptor Potential Ankyrin 1). Dopo aver isolato questi trascritti hanno attuato un esperimento di ibridazione in situ ha permesso di localizzare i trascritti nei tessuti dell'impollinatore. TRPA1, dello scarabeo, si concentra nella regione più distale dell'antenna, strettamente connesso ad un neurone sensoriale necessario per captare la IR (Fig. 4B-C-D-E). Mentre GR28b e IR21a, non si trovano nella stessa regione di TRPA1 (no co-espressione). Sono invece colocalizzati (GR28b e IR21a) a livello delle sensille collegate alle due tipologie di neuroni che presentano risposte al calore opposte (Fig. 4F-G). L'attenzione, degli autori; si è focalizzata sul trascritto TRPA1 presente anche in diversi altri taxa, che permette di captare le variazioni di temperatura dell'ambiente per identificare le proprie prede come nei serpenti e nelle zanzare. TRPA1 è un canale cationico non selettivo omotetrameric, in cui ciascun monomero contiene sei domini transmembrana (da S1 a S6) con estremità N- e C-terminali citoplasmatiche e l'ansa del poro si trova tra S5 e S6 (Zhang et al, 2022). L'isoforma TRPA1 B è la più presente nell'antenna di *P. floridana*. Tramite analisi di patch-clamp electrophysiology il suo presunto ruolo come termo-recettore è stato determinato; infatti l'espressione eterologa in *P. floridana* di TRPA1B ha dimostrato una robusta risposta alle variazioni di calore poco al di sopra delle temperature ambientali. Oltre all'isoforma B, la seconda più presente nell'impollinatore è l'isoforma A, la quale presenta anch'essa una certa sensibilità alle variazioni termiche, ma è nettamente inferiore rispetto all'isoforma B. I risultati di confronto tra le due isoforme dimostrano come l'unica differenza sostanziale tra le due proteine sia la regione 5' (N terminale) che nell'isoforma B è più corta rispetto all'isoforma A. Analizzando le TRPA1 in *R. furfuracea* hanno riscontrato lo stesso risultato, cioè una concentrazione a livello delle antenne e della testa in generale maggiore dell'isoforma B rispetto alla A. Confrontando però le stesse proteine dei due impollinatori, *R. furfuracea* e *P. floridana* si è notato che, a

livello dell'N terminale le sequenze amminoacidiche delle proteine TRPA1 non coincidevano appieno. Confrontandole TRPA1 con altre varianti provenienti da altri insetti si è confermato la divergenza al 5' delle proteine. Questo ha portato i ricercatori a definire il 5' di TRPA1 una regione heat point regioni così definite in quanto hanno una probabilità più alta del normale di mutare (*Fig. 4H*). Analizzando la sensibilità al calore di TRPA1 B, il range della sua attivazione varia al variare dell'organismo preso in considerazione, infatti in *R. furfuracea* e *P. floridana* i valori attivazione della proteina differiscono di molti gradi. La variazione è probabilmente dovuta allo stretto legame mutualistico tra impollinatore e pianta che ha portato ad un processo evolutivo di TRPA1 B dipendente dalle temperature raggiunte durante il processo di termogenesi dei coni di *Zamia*. Il mutualismo porta al riconoscimento di determinati range di temperatura; quindi, l'impollinatore riesce ad associarli alla specifica pianta di interesse.

Gli autori hanno teorizzato che lo splicing alternativo di TRPA1 si sia evoluto 300Ma in quanto presente in moltissimi taxa differenti e filogeneticamente molto distanti tra loro. Per esempio, *P. floridana* e *R. furfuracea* appartengono a 2 famiglie filogeneticamente separate, >140Ma, ma entrambe presentano lo splicing alternativo del TRPA1 ed entrambe sono attratte dalla IR. I ricercatori affermano che la rilevazione da parte degli impollinatori delle IR può essere stata molto diffusa negli impollinatori come uno dei segnali più importanti dell'impollinazione per le piante termogeniche. Dopo tutte le considerazioni fatte e i dati ottenuti possono determinare che la IR non è ad uso esclusivo di predatori e parassiti, ma può essere utilizzata come segnale per attirare gli impollinatori in grado di captarla.

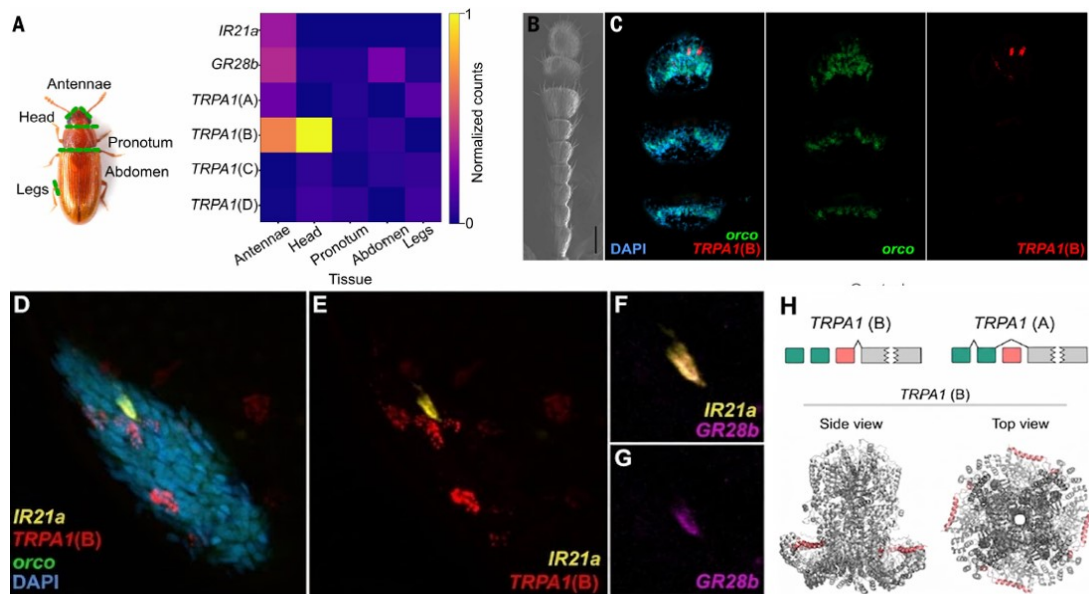


Figura 4. (A) A sinistra, campioni di tessuto di coleottero utilizzati per la trascrittomiche comparativa. A destra, espressione di geni candidati termosensibili in diversi organi del coleottero impollinatore *P. floridana*. (B) Immagine al SEM di un'antenna di coleottero. Barra di scala, 100 µm. (C) Ibridazione in situ degli ultimi tre segmenti antennali del coleottero impollinatore *P. floridana* che mostra l'espressione del gene candidato termosensibile TRPA1(B) e del marcatore dei neuroni sensoriali olfattivi orco. (D) Ibridazione in situ RNAscope di geni recettori candidati termosensibili nel segmento antennale terminale. (E) I geni candidati termosensoriali TRPA1(B), IR21a e GR28b sono stati espressi sulla punta antennale e non hanno mostrato sovrapposizione nell'espressione con il marcatore dei neuroni olfattivi orco. TRPA1(B) è risultato fortemente espresso nel segmento antennale terminale e non si è co-localizzato con IR21a o GR28b. (F-G) L'espressione di IR21a e GR28b si è co-localizzata sulla punta antennale. (H) Isoforme di splicing TRPA1(B) e TRPA1(A). I blocchi colorati rappresentano gli esoni soggetti a splicing alternativo (in alto). La struttura AlphaFold evidenzia a colori la posizione degli amminoacidi codificati dall'esone, che è unico per la variante TRPA1(B).

4. DISCUSSIONE

4.1 Evoluzione segnali di impollinazione

Il profumo e i VOC sono i principali segnali per attirare gli impollinatori funzionanti a lunga distanza, ma quando l'impollinatore si avvicina, al fiore o al cono, questi segnali diventano inefficaci. Le piante hanno dovuto attuare delle strategie per mantenere stimolato l'impollinatore che si trova a media e corta distanza, così da indirizzarlo verso le strutture riproduttive. I ricercatori definiscono il fiore (angiosperme) e i coni (gimnosperme) come dei cartelloni pubblicitari che utilizzano molteplici segnali per attirare diversi impollinatori, come: colori appariscenti o il tepore prodotto dalla termogenesi. Il colore dei fiori delle

angiosperme è uno dei segnali di impollinazione a corto medio raggio più conosciuti, studiati ed apprezzato dai nuovi impollinatori. Gli autori hanno analizzato come i colori dei fiori riflettano nello spettro (nel range 200/1000 nm), hanno osservato che i nuovi impollinatori come api e farfalle (tricromatici) presentavano opsine in grado di assorbire a livello dello stesso spettro in cui emettevano i fiori (300/700 nm). I risultati confermano che effettivamente questi impollinatori sono in grado di vedere la diversa colorazione dei fiori e che per loro è un vero e proprio segnale di impollinazione. Lo stesso confronto è stato attuato con i cono delle Cycas, hanno osservato come i colori riflettevano nello spettro e i dati sono stati confrontati con le opsine dei coleotteri (UV e long wavelegth LW) le quali mostravano massimo spettro di assorbimento a 374nm (UV) a 490nm. Si è riscontrato che le lunghezze d'onda dei cono e degli impollinatori non si sovrappongono. Quindi anche se gli impollinatori delle Cycas termogeniche sono in grado di vedere i colori, non sono in grado di riconoscere quelli emessi dai cono. Il colore non è un segnale di attrazione per gli impollinatori delle Cicadales.

Questo perché gli impollinatori delle cicadines hanno perso le opsine a short wavelength rispetto agli insetti ancestrali che erano tricromatici. La perdita delle opsine è dovuta, probabilmente, alla selezione da parte delle piante termogeniche per insetti in grado di percepire meglio le variazioni termiche rispetto a percepire lunghezze d'onda dello spettro più ampie. Allo stesso modo, gli autori, hanno confrontato piante termogeniche, che utilizzano come segnale per attirare gli impollinatori uno scarto metabolico (energia termica), e piante che utilizzano colorazioni molto contrastanti per poter attirare gli impollinatori tricromatici. Queste analisi hanno permesso, ai ricercatori, di determinare che le piante a fiore, le quali hanno instaurato un rapporto mutualistico con impollinatori recenti, si sono differenziate dai segnali di impollinazione metabolici delle piante termogeniche investendo, sulla creazione di colorazioni variegata a livello degli organi riproduttivi. Analisi filogenetiche hanno evidenziato una correlazione negativa tra la termogenesi e la diversità di colori, mostrando come ci sia stato un compromesso per cui le famiglie delle piante a seme che presentano la termogenesi abbiano una bassa varietà di colori e viceversa. Infatti piante che investono molta energia nella produzione di calore metabolico presentano solitamente una quantità di pigmenti molto ristretta e poco apprezzabile dagli impollinatori moderni in quanto tutta

l'energia evolutiva è stata investita per massimizzare la produzione di calore. Questo trade-off probabilmente è dovuto dalla ridondanza dei segnali di impollinazione, non ha senso che una pianta utilizzi moltissime risorse per dare vita a 2 segnali a corto medio raggio, che hanno la stessa identica funzione, ma che attirano impollinatori differenti. Per le piante è stato più conveniente instaurare rapporti mutualistici con una cerchia ristretta di impollinatori e portare avanti un processo di coevoluzione così da fortificare il rapporto mutualistico. Solitamente questa evoluzione porta alla selezione di un determinato segnale di impollinazione, il quale per primo aveva fatto avvicinare l'impollinatore, che viene poi evolutivamente affinato dallo stesso rapporto mutualistico nel tempo (*Fig. 5B*).

Per meglio comprendere il passaggio da impollinazione basata su IR a quella basata sulla colorazione dei fiori, gli studiosi hanno raccolto dati fossili, sia di piante che di impollinatori, così da poter stimare l'origine della termogenesi. Per fare ciò hanno ricostruito l'albero evolutivo delle cicadine per determinare quando sono apparse le prime cicadine termogeniche, tra le più antiche piante ancora presenti con impollinazione entomofila. Oltre a questo, hanno analizzato i fossili delle presunte piante termogeniche e i corrispettivi impollinatori e hanno determinato che la termogenesi, nelle cicadine, sia apparsa all'inizio del Permiano come uno dei più antichi segnali di impollinazione. Sempre dalle analisi è emerso che gli scarabei impollinatori erano animali notturni e dicromatici. Gli studiosi pensano che la diversificazione dei primi impollinatori, abbia portato ad un aumento di insetti policromatici come api e farfalle. Quest'ultimi si sono adattati ed evoluti in concomitanza con la diversificazione cromatica dei fiori circa 50Ma. Il cambio nella strategia dei segnali di impollinazione coincide con il variare dei gruppi dominanti di impollinatori caratterizzati da diversi biases sensoriali.

4.2 Conclusioni

L'evoluzione dell'impollinazione è strettamente legata ai segnali prodotti dalle piante e dalle capacità sensoriali degli impollinatori. È corretto pensare che all'alba dell'impollinazione i segnali prodotti dalle piante derivassero da vie metaboliche o macchine molecolari già presenti all'interno delle piante stesse, che sfruttavano le primordiali capacità degli insetti di captare determinati segnali, iniziando una

catena di eventi di coevoluzione tra piante e impollinatori. Un esempio lampante sono le proteine AOX1 (nelle piante) e TRPA1 (negli insetti), le quali sono presenti in moltissimi taxa, come già visto, ma solo nella relazione mutualistica pianta-impollinatore hanno subito una regolazione positiva che permette: da un lato la produzione di calore ed emissione di IR e dall'altro la capacità di percepire gli stimoli termici. I ricercatori hanno analizzato altre linee di piante e insetti che presentavano caratteristiche simili a quelle studiate in questo articolo ed hanno osservato gli stessi adattamenti, ma avvenuti in tempi e modi differenti un chiaro esempio di evoluzione convergente.

Le Cycas sono state un ottimo campione di studio in quanto sono il lignaggio di piante a seme più antico che si serve di una impollinazione entomofila ancora presenti oggi, ora sono a rischio di estinzione, ma si stima che nel Mesozoico fossero le piante (gimnosperme) più presenti, coesistenti con altre gimnosperme e angiosperme primitive. Gli studiosi pensano che gli impollinatori delle Cycas, che hanno fissato la capacità di captare i segnali termici, abbiano, tramite mutazioni, subito dei bias sensoriali i quali li hanno resi sensibili anche ad altri segnali di impollinazione. Un esempio ci è dato da evidenze fossili del medio- Cretaceo che suggeriscono un passaggio degli impollinatori delle Cycas verso lignaggi di angiosperme più primitivi come le ninfee, anch'esse dotate di capacità termogeniche. Tale precoce instaurarsi di un rapporto mutualistico tra gimnosperme e coleotteri basato sulla termogenesi e sulla segnalazione dell'infrarosso ha verosimilmente gettato le basi per un'efficiente impollinazione entomofila fin dagli albori delle piante a fiore. Le quali, piante a fiore, non presentavano fiori appariscenti e con colorazioni molto differenziate per attirare impollinatori come possiamo osservare oggi, bensì, la grande variabilità cromatica si ha avuta con l'aumento di impollinatori diurni tricromatici, in grado di discriminare le diverse lunghezze d'onda. Questo cambiamento della capacità degli impollinatori di captare i segnali colorati delle piante a fiore si può osservare anche nei coleotteri diurni che si posano sui fiori, nei quali si è riscontrato un aumento di opsine che li porta ad essere tri/tetracromatici. Questo ha permesso di comprendere come l'evoluzione delle caratteristiche florali siano direttamente dipendenti dall'evoluzione delle capacità sensoriali degli impollinatori a loro associati. In un'ottica più ampia, i risultati degli autori suggeriscono che segnali metabolici come l'IR abbiano svolto un ruolo

fondamentale nella fase iniziale dell'evoluzione dell'impollinazione biotica, uno dei mutualismi a maggior impatto trasformativo sugli ecosistemi nella storia della Terra.

A

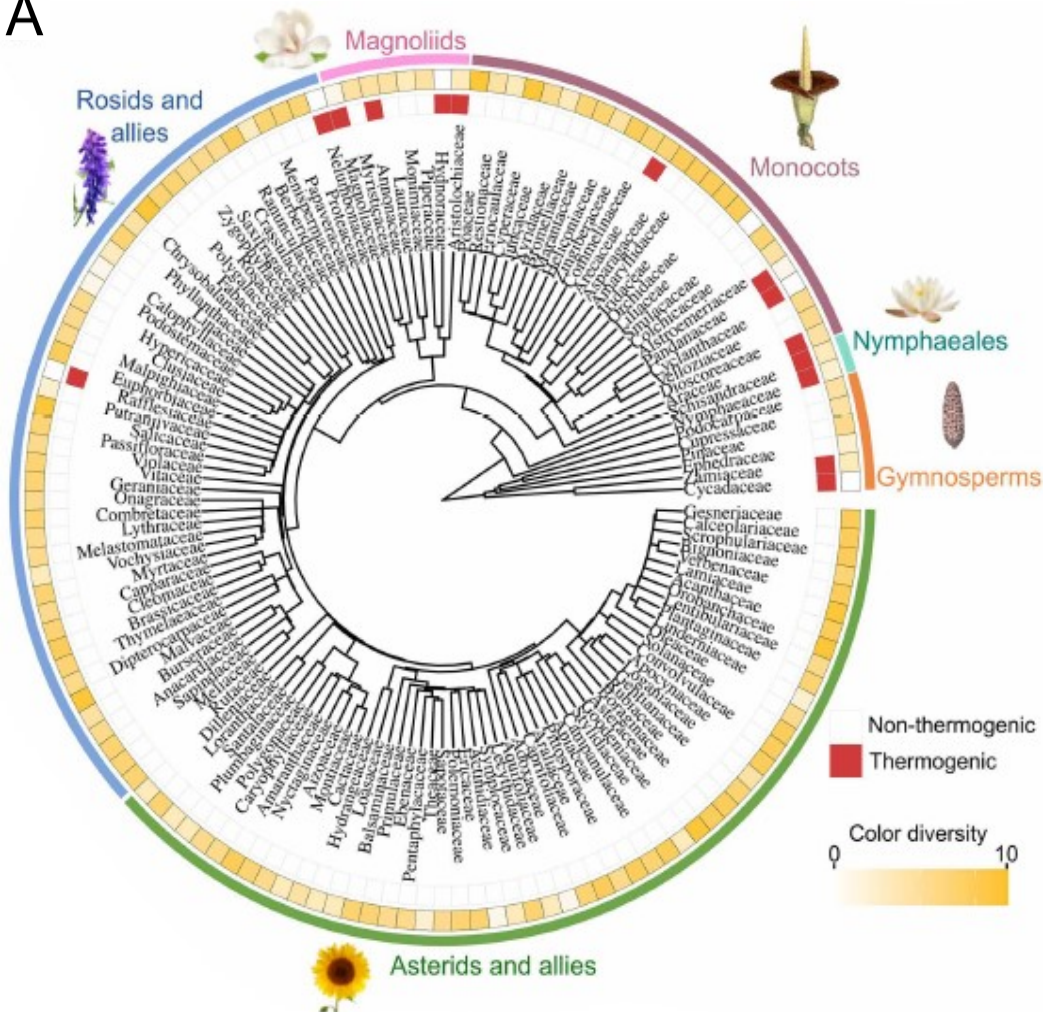


Figura 5. (A) Termogenesi e diversità dei colori mappate come tratti sulla filogenesi delle piante a seme (Spermatophyta).

4.3 Opinioni personali

Leggendo articoli simili ho osservato che viene dato più spazio agli studi comportamentali degli impollinatori, i quali permetterebbero di comprendere meglio quali sono i fattori che invogliano l'impollinatore a dirigersi sul cono. Sono dell'idea che la stessa forma del cono possa essere un fattore che potrebbe alterare i dati. Vorrei che avessero attuato un Y-tube behavior assay (saggio comportamentale in tubo ad Y), un saggio comportamentale molto semplice che ci fornisce molte informazioni sulle scelte degli impollinatori quando si trovano ad un

bivio (Salzman et al. 2023). Secondo me questa tipologia di esperimento potrebbe essere molto interessante oltre che limitare veramente ogni stimolo diverso dalla IR ci dà informazioni su quale stimolo, l'impollinatore, riesca a captare e collegare al cono in maniera più diretta.

Con altre analisi comportamentali si potrebbe, inoltre, definire la distanza alla quale gli impollinatori sono in grado di captare i segnali termici, così da definire una area di azione delle IR. O ancora verificare se un cono non appartenente alla *Z. furfuracea* possa essere impollinato da *R. furfuracea*, tramite riscaldamento artificiale che simula l'evento di termogenesi della *Zamia*.

5. BIBLIOGRAFIA

1. Seymour RS, White CR, Gibernau M. Environmental biology: heat reward for insect pollinators. *Nature*. 2003 Nov 20;426(6964):243-4. doi: 10.1038/426243a. PMID: 14628037.
2. Zhu Y, Lu J, Wang J, Chen F, Leng F, Li H. Regulation of thermogenesis in plants: the interaction of alternative oxidase and plant uncoupling mitochondrial protein. *J Integr Plant Biol*. 2011 Jan;53(1):7-13. doi: 10.1111/j.1744-7909.2010.01004.x. PMID: 21205176.
3. Salzman S, Crook D, Crall JD, Hopkins R, Pierce NE. An ancient push-pull pollination mechanism in cycads. *Sci Adv*. 2020 Jun 12;6(24):eaay6169. doi: 10.1126/sciadv.aay6169. PMID: 32582845; PMCID: PMC7292639.
4. Zhang H, Wang C, Zhang K, Kamau PM, Luo A, Tian L, Lai R. The role of TRPA1 channels in thermosensation. *Cell Insight*. 2022 Oct 11;1(6):100059. doi: 10.1016/j.cellin.2022.100059. PMID: 37193355; PMCID: PMC10120293.
5. Salzman S, Dahake A, Kandalaft W, Valencia-Montoya WA, Calonje M, Specht CD, Raguso RA. Cone humidity is a strong attractant in an obligate cycad pollination system. *Curr Biol*. 2023 May 8;33(9):1654-1664.e4. doi: 10.1016/j.cub.2023.03.021. Epub 2023 Apr 3. PMID: 37015222.

APPENDICE

Infrared radiation is an ancient pollination signal

