

LUIGI DE MARZO(\*) & ANGELO DE STRADIS(\*\*)

Università della Basilicata - Potenza

## Osservazioni morfologiche e istologiche sugli organi di endosimbiosi batterica nelle femmine delle Cleonine (Coleoptera Curculionidae)

### ABSTRACT

NEW MORPHOLOGICAL OBSERVATION OF THE FEMALE BACTERIAL POCKETS IN THE CLEONINS (COLEOPTERA CURCULIONIDAE)

The typical "female transmission pockets" of the subf. Cleoninae were examined in nine species of the genera *Cleonis*, *Larinus*, *Lixus* and *Rhinocyllus*. They correspond to the female colleterial glands and are lacking in *Larinus scolymi*. Three morphological types of these glands were found: accordion-, sac- and bush-like. Observed in *Lixus punctiventris*, the epithelium of these organs exhibits largely nucleated cells, each rich of microvilli at apical end. The dense bacterial contents include a large percentage of paired rods, each 2-3  $\mu\text{m}$  long.

Key words: Curculionidae, Cleoninae, bacteria, accessory glands, fine structure.

### INTRODUZIONE

Com'è noto dalle rassegne di BUCHNER (1965) e di NARDON & GRENIER (1989), l'endosimbiosi con batteri è un fenomeno di larghissima diffusione nei Curculionidi e si esprime in questa famiglia<sup>(1)</sup> attraverso molteplici possibilità di localizzazione. Infatti, secondo la specie e lo stadio (larvale o immaginale), i batteri si possono trovare all'interno di cellule sparse nel tessuto adiposo o negli ovari, nel mesentero o nei tubi malpighiani, o entro le cellule di speciali batteriosomi. Inoltre, una localizzazione di tipo extracellulare si manifesta nelle femmine adulte della subf. Cleoninae, che possiedono una coppia di sacche batteriche, indicate dagli autori come "organi di trasmissione intersegmentali" e considerate analoghe a quelle di Anobidi, Lagridi e Cerambicidi. Queste sacche batteriche vengono qui riesaminate sotto il profilo istologico, anche con l'ausilio della microscopia elettronica a trasmissione, riportando in forma più ampia le osservazioni già esposte in forma di poster allo scorso Congresso Nazionale di Entomologia (DE MARZO & DE STRADIS, 1995).

---

(\*) Dipartimento di Biologia, Difesa e Biotecnologie agro-forestali

(\*\*) Centro interdipartimentale di Microscopia

(1) In questa frase, la fam. Curculionidae è intesa al senso dei citati studiosi di endosimbiosi, cioè secondo l'assetto tradizionale, senza i successivi rimaneggiamenti sistematici (cfr. LAWRENCE, 1982; ABBAZZI & OSELLA, 1992). Pertanto, vi sono escluse le subff. Platypodinae e Scolytinae e vi sono compresi gli attuali Attelabidae e Apionidae.

## MATERIALI E METODI

Le osservazioni anatomiche sono state condotte a fresco in soluzione fisiologica (NaCl 0,9%) su femmine delle seguenti specie: *Cleonis pigra* Scop., *Larinus curtus* Hocch., *L. cynarae* F., *L. rusticanus* Gyll., *L. scolymi* Ol., *L. ursus* F., *Lixus angustatus* F., *L. angustus* Herbst, *L. punctiventris* Boh., *Rhinocyllus conicus* F. L'esame morfologico *in toto* del contenuto delle sacche batteriche è stato effettuato per schiacciamento fra due vetrini nella stessa soluzione fisiologica, a contrasto di fase. Preparati dei batteri per l'osservazione al MET sono stati realizzati con la tecnica dell'adsorbimento su pellicola di carbonio, adagiando le griglie preventivamente rivestite su una goccia di soluzione fisiologica nella quale erano state stemperate le sacche batteriche. Prima dell'osservazione, questi preparati venivano sottoposti a colorazione negativa in una soluzione acquosa al 2% di acetato di uranile.

Le osservazioni ultrastrutturali sono state condotte su una specie rappresentativa, *Lixus punctiventris*, le cui sacche batteriche vennero incluse in Araldite M500 dopo i seguenti trattamenti: a) dissezione in tampone fosfato 0,1 M, pH 7,2; b) prefissazione in una soluzione di aldeide glutarica 4% in detto tampone per 2 ore a 0°C; c) lavaggio in tampone; d) postfissazione in tetrossido di osmio 1% in tampone per 4 ore; e) ulteriore lavaggio; f) disidratazione in alcool etilico e impregnazione con ossido di propilene; g) passaggi graduali in resina. Le fettine, dello spessore di circa 300 Å, vennero contrastate con acetato di uranile in soluzione idroalcolica e citrato di piombo in soluzione acquosa.

## OSSERVAZIONI

La condizione più consueta dei genitali interni della femmina nelle specie esaminate è rappresentata in fig. 1. Le sacche batteriche sono situate in prossimità del gonotrema e, dal punto di vista anatomico, corrispondono alle ghiandole colleteriche.

Primo carattere di variabilità di queste sacche è la presenza/assenza, giacché se ne riscontra l'assenza in una delle specie esaminate, *Larinus scolymi*. Riguardo alla forma, le sacche manifestano il noto polimorfismo interspecifico (cfr. NARDON & GRENIER, l.c.), nel quale si individuano le seguenti categorie morfologiche:

- a) "a fisarmonica" (figg. 1-2), in cui la singola ghiandola è suddivisa in 10-20 concamerazioni, come nel disegno di BUCHNER (l.c.) relativo a *Cleonis pigra*, e come in *Lixus punctiventris*, *L. angustus* e *Rhinocyllus conicus*;
- b) "sacciforme" (figg. 3-5), come in *Larinus cynarae*, *L. curtus*, *L. ursus* e *Lixus angustatus*;

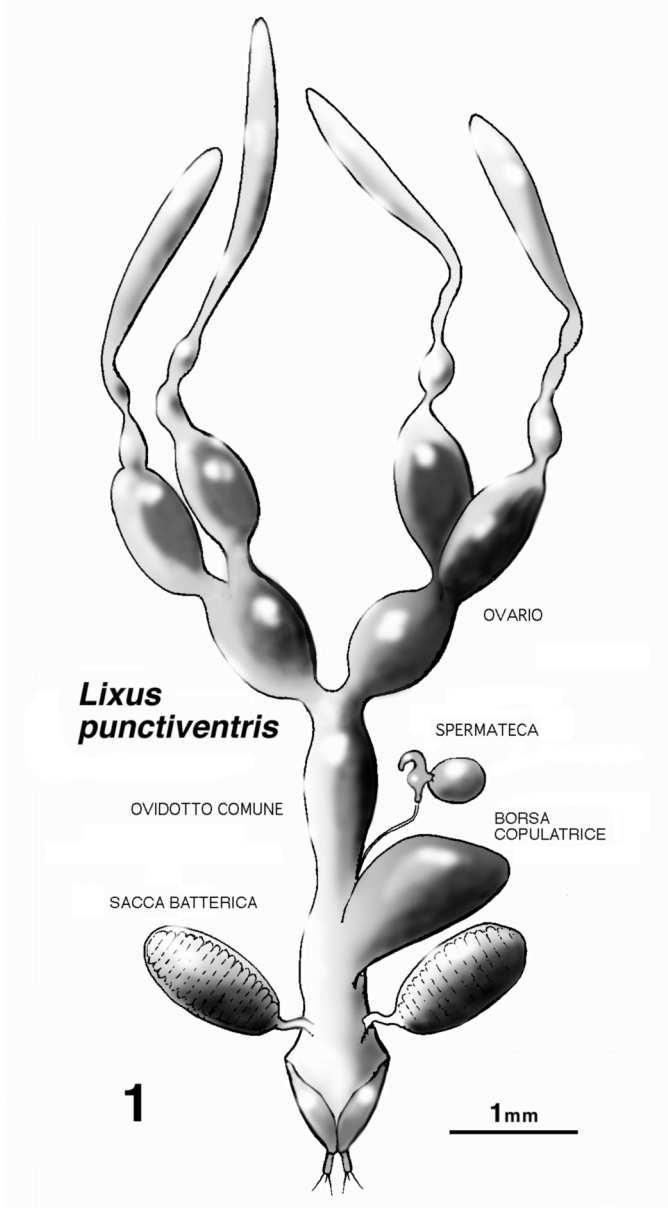
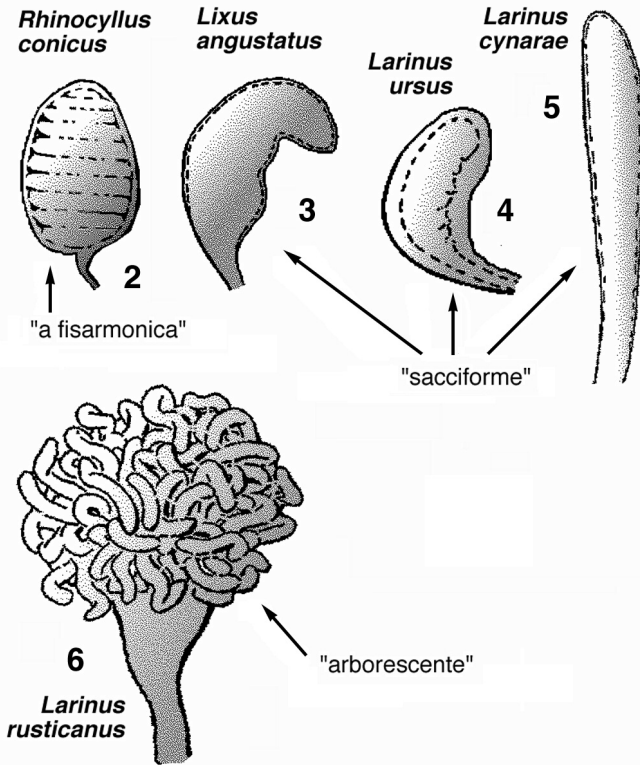


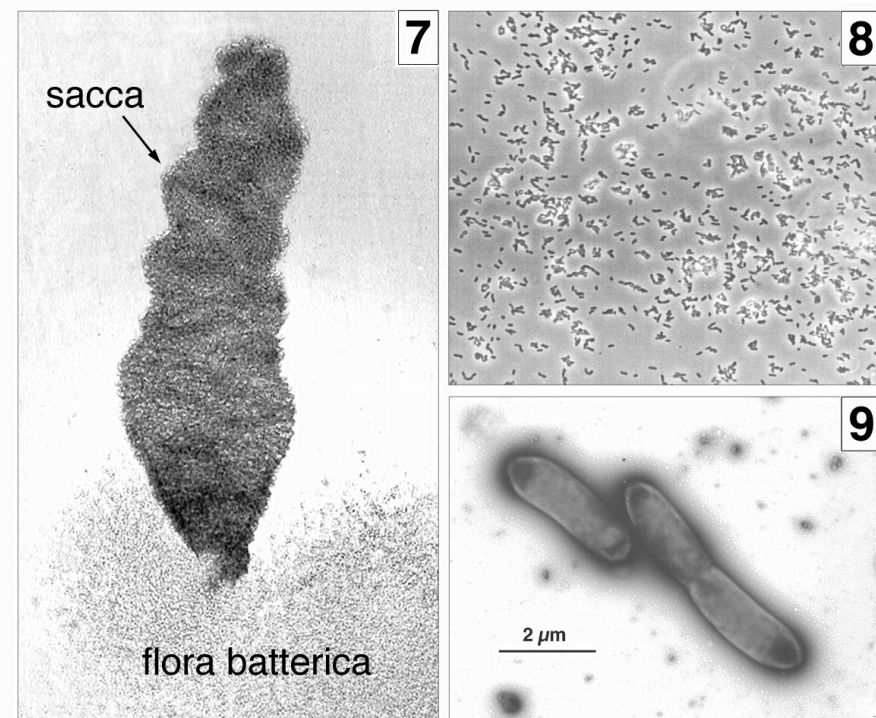
Fig. 1 - In *Lixus punctiventris* l'apparato genitale femminile è nella condizione anatomica più comune nella subf. Cleoninae, con due ovariole per lato, una pronunciata borsa copulatrice, una spermateca con ricettacolo sclerotizzato e con le tipiche sacche batteriche, che dal punto di vista anatomico corrispondono alle ghiandole colleteriche.



Figg. 2-6 - In base alla forma, le sacche batteriche delle specie esaminate appartengono a tre categorie.

c) "arborescente" (fig. 6), in cui la ghiandola si compone di numerose unità tubuliformi, come in *Larinus rusticanus*.

All'esame per schiacciamento al microscopio-luce, il contenuto delle sacche ha l'aspetto di un fluido denso, lattiginoso (figg. 7-8); esso è composto di particelle della lunghezza da 2 a 3  $\mu\text{m}$ , in grande percentuale riunite a coppie, e da una matrice amorfa che si rende evidente per il fatto che le particelle sono frenate nella loro dispersione nella soluzione. Nelle sacche della categoria "arborescente" di *Larinus rusticanus* sono state osservate anche catenelle più numerose, di dieci e più unità. La forma bacillare di queste unità e la condizione duplice di una parte di esse risultano ancor più evidenti nei preparati per adsorbimento (fig. 9) e ne confermano la natura batterica.



Figg. 7-9 - Comprime le sacche batteriche fra due vetrini, al microscopio-luce si osserva la fuoriuscita di un fluido lattiginoso (7), che visto a contrasto di fase si mostra costituito da miriadi di elementi bacilliformi (8), in gran percentuale riuniti a due a due. Si tratta in questo caso della sacca batterica di *Larinus ursus*. Visti al MET, in preparati per adsorbimento su pellicola di carbonio, i bacilli appaiono come in fig. 9.

In generale, le sacche sono fatte di cuticola esile ma tenace, a volte rinforzata da spinule; hanno l'epitelio di spessore variabile secondo lo stato di maturazione dell'apparato genitale e sono rivestite da una tonaca muscolare più o meno spessa secondo la specie.

Osservato al MET, l'epidermide delle sacche (figg. 10-12) risulta composta da cellule con grandi nuclei, ricche di vacuoli e di mitocondri sparsi uniformemente in tutto il citoplasma, con un ricco complesso di microvilli nella regione apicale. La cuticola ha uno spessore variabile intorno a 0,5 micron. Nel lume, i bacilli sono strettamente ammassati ma nei pochi spazi si riconosce la presenza di un secreto amorfo. Non si rileva presenza di batteri all'interno delle cellule epidermiche.

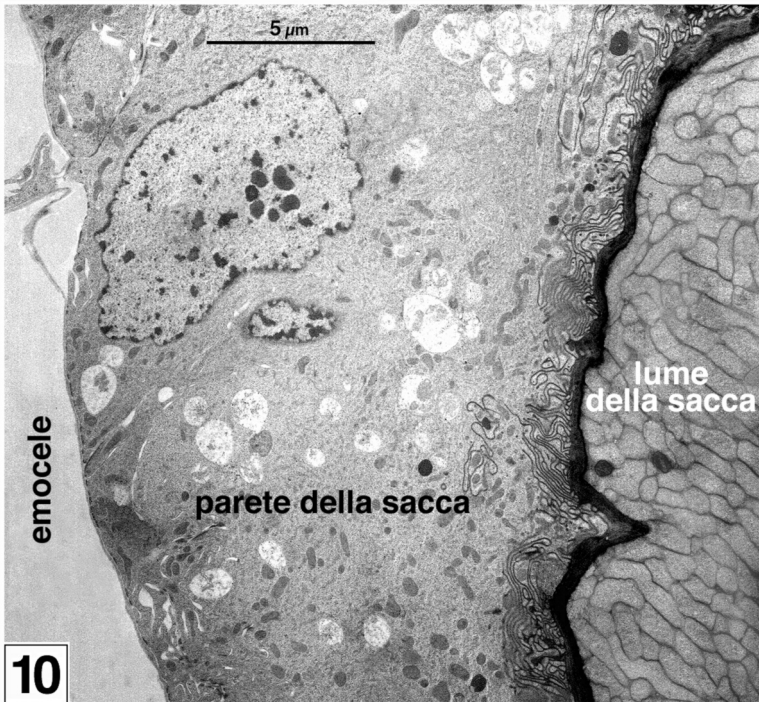
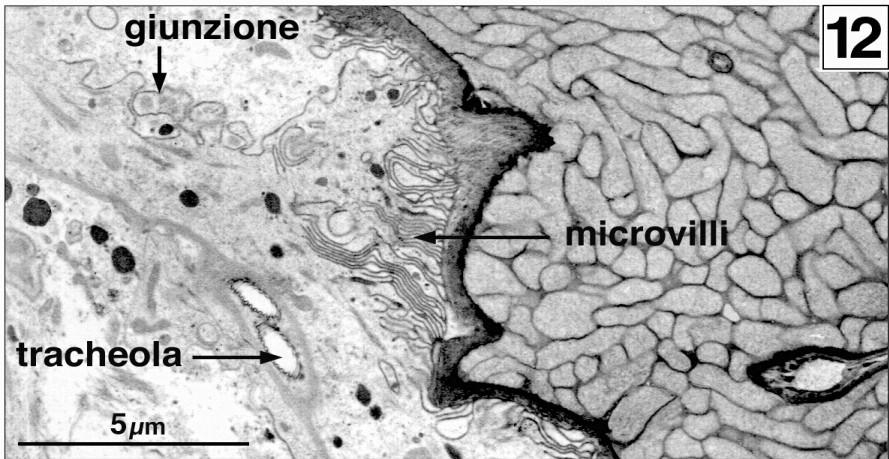
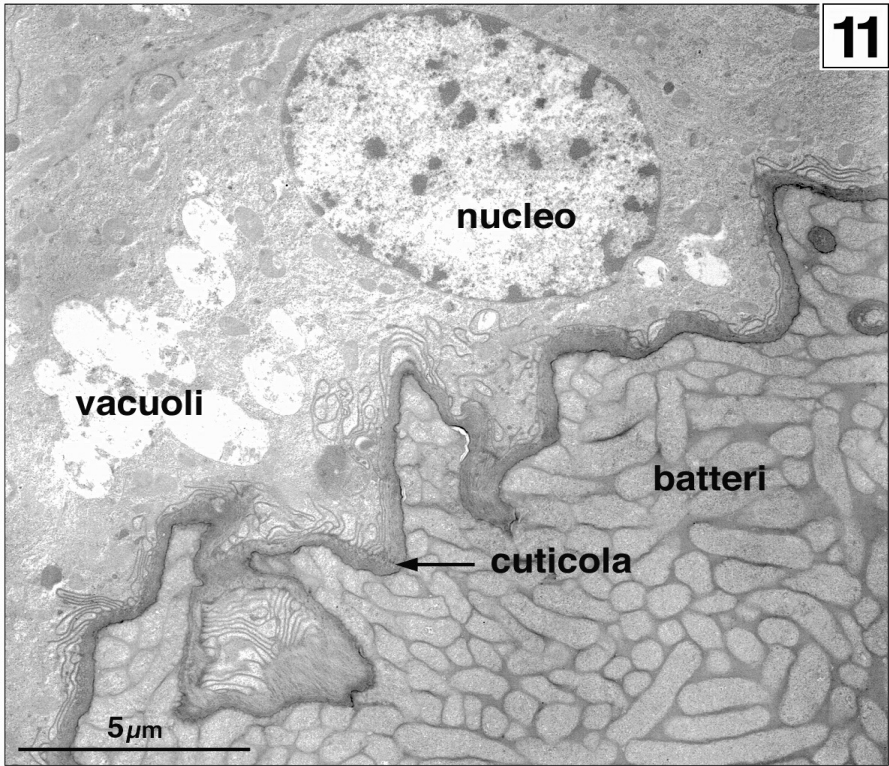


Fig. 10 - Visione al MET della parete e del lume di una delle sacche batteriche in *Lixus punctiventris*.

#### CONSIDERAZIONI

Le sacche batteriche delle Cleonine sono classificabili come ghiandole colateriche trasformate e impegnate nel mantenimento in ambiente extracellulare di una flora batterica apparentemente omogenea; esse presentano una variabilità anatomica nella quale si riconosce una tendenza evolutiva verso l'aumento della superficie cuticolare, cioè verso l'ambiente occupato dai batteri. Tale specializzazione si è affermata in alcune specie con lo sviluppo di setti (nelle sacche “a fisarmonica”), in altre con l'acquisto della forma arborecente.

La visione tradizionale di questi organi come dispositivi per la trasmissione di simbionti alla progenie resta verosimile. L'ampiezza della variabilità anatomica nel genere *Larinus* ci offre un esempio rilevante della plasticità dei Coleotteri nei riguardi dell'endosimbiosi. In particolare, è sorprendente l'assenza delle sacche in *Larinus scolymi*, specie che, rispetto alle congeneri,



Figg. 11-12 - Dettagli dell'epidermide e del contenuto di una delle sacche batteriche in *Lixus punctiventris*.

non presenta evidenti particolarità, né ecologiche né fenologiche, né risulta meno diffusa. Lo studio delle larve potrà dirci se la trasmissione dei simbionti alla progenie da parte di questo *Larinus* è inesistente, o se si realizza comunque, anche senza il concorso di organi femminili specializzati.

#### RIASSUNTO

Viene documentata la diversità anatomica delle sacche batteriche femminili nella subf. Cleoninae, dove è insediata una ricca flora bacillare. Dati istologici sono tratti dallo studio al microscopio elettronico a trasmissione delle ghiandole di *Lixus punctiventris*. Si rileva l'assenza delle sacche in *Larinus scolymi*.

Parole chiave: Curculionidi, Cleoninae, batteri, ghiandole accessorie, ultrastruttura.

#### OPERE CITATE

ABBAZZI & OSELLA, 1992 - Elenco sistematico-faunistico degli Anthribidae, Rhinomaceridae, Attelabidae, Apionidae, Brentidae, Curculionidae italiani. *Redia*, Firenze, 75 (2): 267-414.

BUCHNER P., 1965 - Endosymbiosis of animal with plant microorganisms. Intersciences Publ., New York-London, 909 pp.

DE MARZO L. & A. DE STRADIS, 1995 - Nuove osservazioni morfologiche sulle sacche batteriche femminili nelle Cleonine (Coleoptera Curculionidae). Poster. *Atti XVII Congr. Naz. ital. Entomol.*, Udine 13-18 giugno 1994.

LAWRENCE J. F., 1982 - Coleoptera. In: Synopsis and classification of living organisms, Parker ed., McGraw-Hill Book Co., vol. 2, pp. 482-553.

NARDON P. & A. M. GRENIER, 1989 - Endocytobiosis in Coleoptera: biological, biochemical, and genetic aspects. In: Insect endocytobiosis: morphology, physiology, genetics, evolution, Schwemmler & Gassner edd., CRC Press Inc., Florida, pp. 175-216.