

DE MARZO L., NUZZACI G., SOLINAS M. (*)
Istituto di Entomologia Agraria dell'Università di Bari

ASPETTI ANATOMICI, STRUTTURALI, ULTRASTRUTTURALI
E FISILOGICI DELLE GHIANDOLE GENITALI ACCESSORIE
DEL MASCHIO DI *DACUS OLEAE* GMEL. IN RELAZIONE
ALLA MATURITÀ ED ALL'ATTIVITÀ SESSUALE (**)(***)

RIASSUNTO. - Gli autori nel presente lavoro vogliono dare un contributo alla conoscenza della biologia della riproduzione del *Dacus oleae* Gmel. In particolare si vuole dare una spiegazione su basi anatomo-istologiche e fisiologiche a due fatti importanti: a) i maschi neosfarfallati del *Dacus*, nonostante dispongano già di spermatozoi maturi, non sono sessualmente attivi subito, ma lo diventano solamente dopo un certo numero di giorni (periodo immaginale preriproduttivo); b) i maschi sessualmente maturi non sono in grado di ripetere subito la copula, ma hanno bisogno, tra un accoppiamento e l'altro, di un periodo di riposo relativamente lungo (almeno 24 ore).

Vengono descritti ed illustrati con disegni e fotografie a) l'anatomia topografica dell'apparato genitale maschile di *Dacus oleae*, con particolare riferimento alle ghiandole accessorie; b) l'istologia funzionale dei due tipi di ghiandole presenti (1 paio «sacciformi» e 3 paia «tubulose»), in soggetti appena sfarfallati ed in altri sessualmente maturi, prima e dopo l'accoppiamento; c) l'ultrastruttura dei due tipi di ghiandole nei tre casi menzionati.

Vengono discussi i risultati ottenuti, giungendo sostanzialmente alle conclusioni seguenti.

I maschi neosfarfallati hanno bisogno di un periodo immaginale preriproduttivo per fare maturare le ghiandole genitali accessorie ed accumulare nei serbatoi delle medesime una certa quantità di secreti; la mancanza (o l'insufficienza) dei quali lascia i maschi medesimi sessualmente inattivi. Per la stessa ragione questi ultimi, divenuti maturi ed una volta accoppiatisi, non sono in grado di ripetere la copula se non dopo un periodo di riposo relativamente lungo, necessario alle ghiandole genitali accessorie per la nuova produzione e l'accumulo di secreto in quantità sufficiente.

(*) DE MARZO ha curato in particolare l'aspetto istologico, NUZZACI quello ultrastrutturale, SOLINAS quelli anatomico e fisiologico.

(**) Comunicazione presentata all'XI Congresso Nazionale di Entomologia (Portici-Sorrento 10/15-5-1976).

(***) Lavoro realizzato col contributo finanziario del C.N.R. (contratto n. 75/0202/06/115/7888).

INTRODUZIONE

Il ruolo delle ghiandole accessorie dell'apparato genitale maschile nel comportamento sessuale del maschio ai fini dell'accoppiamento e della fecondazione, come anche l'attività biologica dei secreti di dette ghiandole sulla femmina, una volta trasferiti in questa con la copula, sono stati studiati e messi in luce negli ultimi quindici anni in Blattodei, Ortotteri, Ditteri e Coleotteri. È noto, in sostanza, che in molti insetti i prodotti delle ghiandole genitali accessorie del maschio esplicano nel maschio stesso un'azione di stimolo dell'appetito sessuale (DAPPLES, FOSTER, LEA, 1974; ENGELMANN, 1970; HUIGNARD, 1975; ROUSSEL, 1967) e dell'attività degli spermatozoi (LUM, 1961 a), mentre nella femmina provocano rifiuto della copula (ADAMS, NELSON, 1968; CAVALLORO, DELRIO, 1970; CRAIG, 1967; ENGELMANN, 1970; HISS, FUCHS, 1972; HUIGNARD, 1974 e 1975; MERLE, 1968; RIEMAN, MOEN, THORSON, 1967; RIEMAN, THORSON, 1969; TZANAKAKIS, TSITSIPIS, ECONOMOPOULOS, 1968) e stimolano l'oogenesi (CAVALLORO, DELRIO, l.c.; ENGELMANN, l.c.; HUIGNARD, l.c.; MERLE, l.c.) e la deposizione delle uova (CAVALLORO, DELRIO, l.c.; CRAIG, l.c.; ENGELMANN, l.c.; FRIEDEL, GILLOT, 1976; HISS, FUCHS, l.c.; LEAHY, 1976; MERLE, l.c.).

Anche per il *Dacus oleae* Gmel. è stata dimostrata, in base ad osservazioni etologiche, da TZANAKAKIS, TSITSIPIS ed ECONOMOPOULOS (1968) e da CAVALLORO e DELRIO (1970) l'esistenza di un « fattore » contenuto nel liquido seminale che, trasferito con la copula nella femmina, rende quest'ultima non disponibile ad altra unione per un periodo di tempo più o meno lungo secondo (entro certi limiti) la quantità ricevuta di detto fattore (quantità misurata in base alla durata del coito, o alla lunghezza del periodo di riposo del maschio dopo l'accoppiamento precedente). Lo stesso fattore che induce comportamento monogamico (o meglio oligogamico) nella femmina del *Dacus* provoca nella medesima, parallelamente e sempre proporzionalmente alla quantità inoculata, effetto stimolante l'oogenesi e la deposizione di uova (CAVALLORO e DELRIO, l.c.). Sono stati anche messi in luce altri due fatti importanti: il verificarsi per i maschi del *Dacus* (CAVALLORO e DELRIO, l.c.), come accade per molti altri insetti (DAPPLES, FOSTER, LEA, l.c.; ENGELMANN, l.c.; RICHARD, 1974), di un periodo immaginale pre-riproduttivo, ossia di maturazione sessuale, nonostante la disponibilità nei testicoli di spermatozoi già nella pupa (BACCETTI, 1965), e la necessità di un intervallo di tempo di 24 ore circa (CAVALLORO e DELRIO, l.c.) tra un accoppiamento e l'altro.

Il presente lavoro vuole essere un contributo alla conoscenza delle ghiandole genitali accessorie del *Dacus oleae* Gmel. dal punto di vista anatomico, istologico ed ultrastrutturale, alla ricerca di dati indicativi sulla genesi,

sulla natura e sulla destinazione delle sostanze attive prodotte dalle ghiandole in questione, sostanzialmente al fine di appurare per questa via quanto è stato affermato, sulla base di osservazioni etologiche, circa il ruolo delle ghiandole medesime nella biologia della riproduzione del maschio del *Dacus*. In particolare si vuole trovare una spiegazione della necessità per quest'ultimo di un periodo immaginale preriproduttivo (nonostante la disponibilità di spermatozoi maturi) e di un periodo di riposo relativamente lungo tra una copula e l'altra.

MATERIALI E METODI

Gli adulti del *Dacus*, sfarfallati in laboratorio da pupari raccolti a terra presso frantoi di olive nel mese di dicembre, venivano messi distintamente per sesso in gabbie di legno con pareti di vetro e rete metallica, in condizioni ambientali di laboratorio (23-25°C e 70% circa di umidità relativa), ed alimentati con una poltiglia di miele ed idrolizzato enzimatico di lievito di birra, mentre l'acqua era fornita a parte.

Le prove sono state effettuate su:

- a) maschi vergini appena sfarfallati;
- b) maschi vergini sessualmente maturi (pronti ad accoppiarsi);
- c) maschi sacrificati alcune ore dopo il primo accoppiamento.

Osservazioni in toto sono state eseguite al microscopio ottico in campo chiaro, a contrasto di fase ed a contrasto interferenziale, su organi freschi in soluzione fisiologica (NaCl 0,85%) e su organi fissati per 10' in Metanolo, colorati col metodo May-Grünwald-Giemsa (BECCARI-MAZZI, 1966), disidratati in soluzioni crescenti (25 ÷ 100%) di Etanolo, passati in Xilolo, ed inclusi in balsamo del Canada.

Lo studio istologico al microscopio ottico (Fotomicroscopio Zeiss II) è stato condotto su sezioni semifini (1 µm) colorate col bleu di Toluidina, ottenute all'ultramicrotomo LKB III da materiale fissato ed incluso in Araldite, come si riferisce nel paragrafo seguente.

Per le osservazioni al microscopio elettronico a trasmissione, le ghiandole genitali accessorie, prelevate da maschi dissecati a freddo (temperatura del ghiaccio fondente) in aldeide glutarica 4% in tampone fosfato 0,1 M a pH 7,2, sono state fissate per 3 ore in dette condizioni; sempre a freddo, sono state successivamente lavate per una notte nel medesimo tampone con aggiunta di 5% di saccarosio, postfissate in tetrossido di osmio 1% nello stesso tampone per 2 ore circa, lavate ancora nel medesimo tampone, disidratate in soluzioni crescenti di Etanolo (25 ÷ 100%), passate in ossido di propilene, ed incluse

in Araldite. Sezioni fini (circa 500 Å) ottenute all'ultramicrotomo LKB III, raccolte su griglie di rame e contrastate con acetato di uranile e citrato di piombo, sono state osservate e riprese al microscopio elettronico A.E.I. tipo EM 6b, gentilmente messo a disposizione dall'Istituto di Botanica dell'Università di Bari.

CENNI MORFO-ANATOMICI DELL'APPARATO GENITALE MASCHILE

L'apparato riproduttore del maschio di *Dacus oleae* (fig. 1) è collocato nella parte posteriore dell'addome, in massima parte ancorato mediante corpo adiposo e trachee all'ampolla rettale (dorso-latero-ventralmente con gli organi pari e ventralmente con quelli impari).

Sono presenti due *testicoli* a forma di fuso più o meno ingrossato ed irregolare, di colore giallo-bruno più o meno intenso (secondo l'età del soggetto), protetti alla base da un manicotto di tessuto adiposo ordinariamente di colore bruno.

I *vasi deferenti* (VD) sono semplici, relativamente sottili e di lunghezza mediocre.

Il *canale eiaculatore* (CE) è piuttosto breve, ingrossato a bulbo all'estremità distale (dove confluiscono vasi deferenti e ghiandole genitali accessorie), gradualmente attenuato nel tratto subprossimale, prima di dilatarsi in una relativamente grossa ampolla eiaculatrice (AE) (di forma alquanto schiacciata che ricorda una scure a taglio curvo ed angoli arrotondati), alla quale segue un breve tratto relativamente sottile ed isodiametrico terminante nel pene (che è lungo, robusto ed avvolto a spirale in posizione di riposo). Il canale eiaculatore è rivestito in massima parte da una spessa tunica muscolare che diventa poderosa nell'ampolla eiaculatrice, mentre scompare o quasi nel tratto prossimale dove sbocca una relativamente voluminosa ghiandola prostatica (PR).

Le *ghiandole genitali accessorie* (fig. 1: GS e GT) sboccano nella dilatazione distale del canale eiaculatore e realizzano uno sviluppo cospicuo in prossimità della faccia inferiore dell'ampolla rettale, alla quale insieme risultano ancorate mediante trachee e tessuto adiposo; sono inoltre legate tra loro dalle diramazioni dei nervi dell'ultima coppia di gangli della catena ganglionare ventrale. Dette ghiandole sono presenti in numero di 4 paia⁽¹⁾, delle quali un paio, le più vicine presso lo sbocco ai vasi deferenti, differi-

(1) Nei Ditteri finora studiati sotto questo aspetto è stato trovato un solo paio di ghiandole genitali accessorie maschili.

scono completamente da tutte le altre che risultano invece tra loro simili sia nell'aspetto esteriore che nella struttura. Pertanto abbiamo indicato le prime come « sacciformi » (GS), essendo fatte vagamente a sacco dal collo lungo e stretto e dal corpo più o meno rigonfio, attenuato ed arrotondato all'estremità distale. Abbiamo indicato come « tubulose » (GT) le altre tre paia di ghiandole, per il loro aspetto in buona parte subcilindrico, gradualmente attenuato nel tratto prossimale e visibilmente ingrossato nel tratto distale a fondo cieco. Quest'ultimo tratto risulta spesso diviso in due rami di diametro normale e di lunghezza alquanto variabile, specialmente nei soggetti maturi.

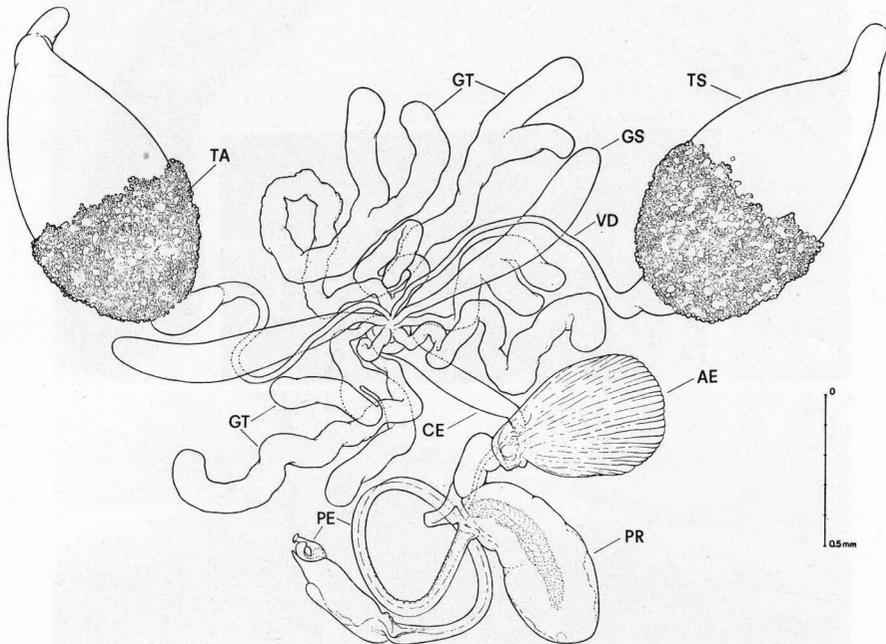


Fig. 1 - *Dacus oleae* Gmel. - Apparato genitale maschile (disegno semischematico eseguito alla camera lucida): AE, ampolla eiaculatrice; VD, vaso deferente; CE, canale eiaculatore; GS, ghiandola sacciforme; GT, ghiandole tubulose; PE, pene; PR, ghiandola prostatica; TA, tessuto adiposo; TS, testicolo.

ISTOLOGIA ED ULTRASTRUTTURA DELLE GHIANDOLE SACCIFORMI

Le ghiandole sacciformi presentano una struttura istologica semplice. Sono rivestite di una tunica peritoneale (fig. 3: TP) alquanto irregolare, riducendosi lo spessore in certi punti a zero o quasi, mentre in altri raggiunge uno

sviluppo cospicuo ed è ivi provvista di fibre muscolari striate, di tracheole e di terminazioni nervose. L'epitelio ghiandolare giace su una membrana basale normale, è formato da un unico strato di grosse cellule a base poligonale e più o meno allungate (colonnari) secondo le condizioni fisiologiche

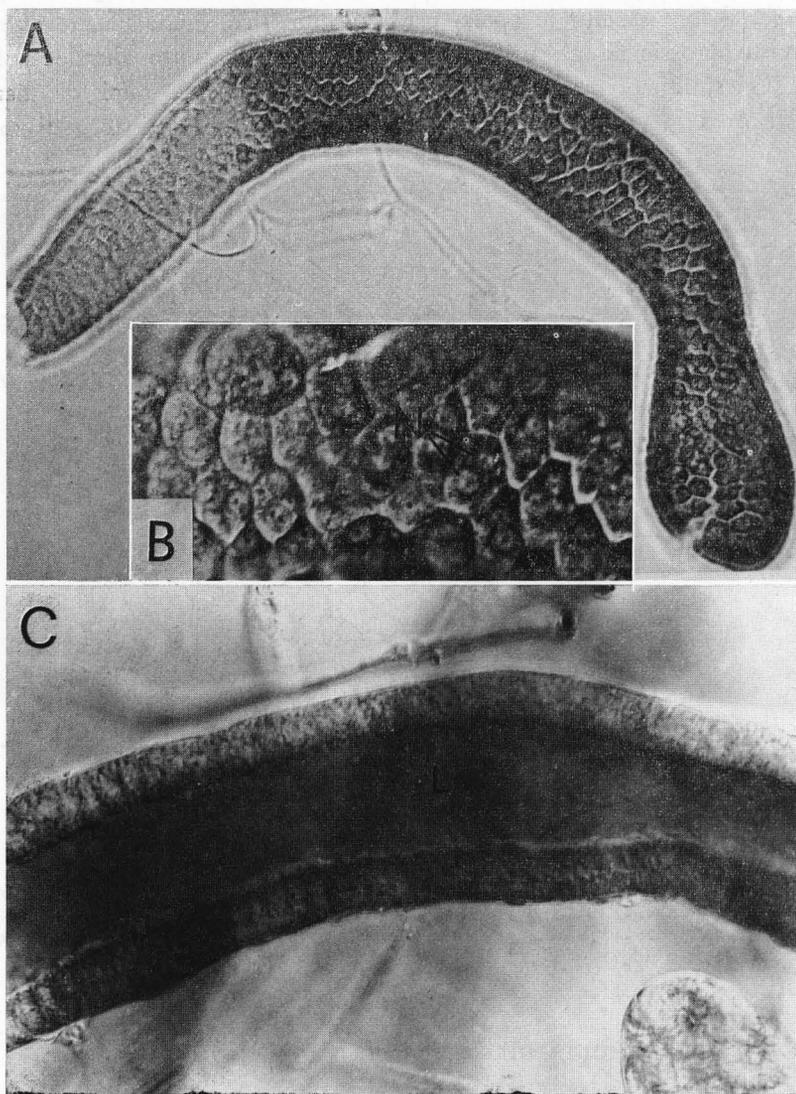


Fig. 2 - *Dacus oleae* Gmel. - Ghiandola sacciforme: A, visione d'insieme (preparato stabile trattato col metodo May-Grünwald-Giemsa); B, particolare a maggiore ingrandimento; C, porzione mediana (preparato fresco in soluzione fisiologica, visto al microscopio ottico a contrasto interferenziale): L, lume; N, nuclei.

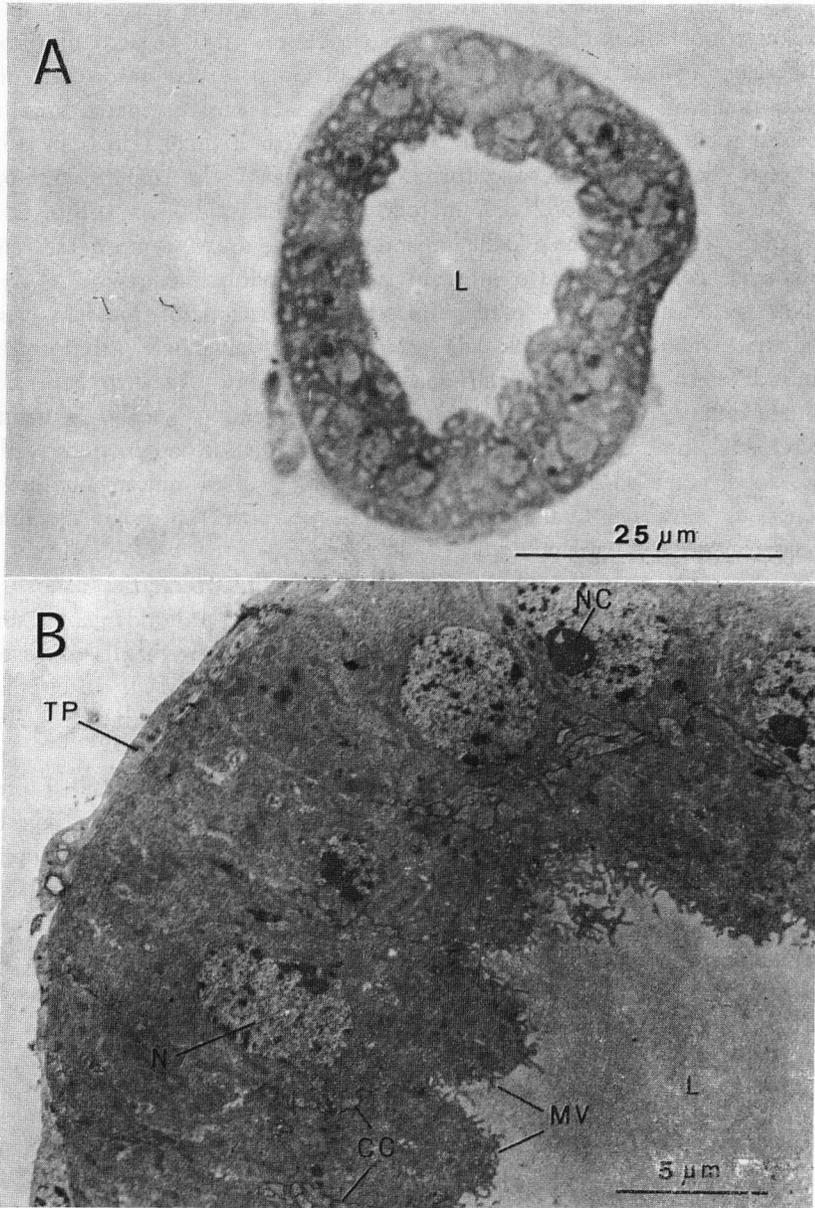


Fig. 3 - *Dacus oleae* Gmel. - Ghiandola sacciforme di maschio neofarfallato: A, sezione trasversale ripresa al microscopio ottico; B, particolare di A, ripreso al microscopio elettronico; CC, confini cellulari; MV, microvilli; N, nucleo; NC, nucleolo, TP, tunica peritoneale.

e di maturazione della ghiandola, come si dirà a presso. Le cellule secretrici sono ben distinte fra loro, provviste ciascuna di due grossi nuclei (figg. 2 e 4) con relativo nucleolo molto evidente, con citoplasma (fig. 4) ricco di ribosomi (sia liberi che associati a membrane), campi di Golgi, e con mitocondri discretamente numerosi in prossimità dei nuclei. È da notare, infine, una certa differenza, forse soltanto fisiologica⁽²⁾ che esiste fra il terzo (circa) prossimale ed il resto delle ghiandole sacciformi. Differenza⁽³⁾ che appare nettamente nei preparati in toto colorati col metodo May-Grünwald-Giemsa (fig. 2: A), nei quali il terzo prossimale della ghiandola risulta quasi sempre assai meno intensamente colorato rispetto al resto della ghiandola medesima.

Nei tre casi presi in esame (maschio neosfarfallato, maschio vergine sessualmente maturo e maschio già accoppiato) le ghiandole sacciformi presentano differenze che riguardano quasi esclusivamente l'aspetto generale ed il volume delle cellule secretrici e la presenza o meno (o meglio la quantità) di secreto nel lume delle ghiandole medesime. La distinzione in queste ultime di due zone, come sopra riferito, risulta assente o quasi unicamente nei soggetti appena nati, nei quali anche le cellule secretrici appaiono ugualmente allungate in tutta la ghiandola.

Nel *maschio vergine appena sfarfallato* le cellule secretrici sono tipicamente colonnari (fig. 3), mostrano i confini laterali profondamente sinuosi (« ingranati »; figg. 3 e 4: CC) e con la parte apicale fortemente convessa ed abbondantemente provvista di microvilli (figg. 3 e 4: MV); il citoplasma appare relativamente compatto. Il lume della ghiandola è privo o quasi di secreto (figg. 2 A, 3 e 4 A).

Nel *maschio vergine sessualmente maturo* le cellule secretrici si presentano cubiformi, con le membrane laterali relativamente distese (non ingranate; fig. 5, C: CC), ed appiattite nella parte apicale (fig. 5, A e B); il citoplasma è alquanto ricco di vacuoli. Il lume della ghiandola è pieno di un secreto omogeneo (tale appare anche a forte ingrandimento; fig. 7, B), incolore⁽⁴⁾ e prontamente solubile nella soluzione fisiologica in cui è stata fatta la dissezione. Detto secreto normalmente presenta in sospensione numerose masserelle di forma irregolare, formate da microvilli staccatisi dall'apice delle cellule secretrici. Anche esteriormente queste ghiandole appaiono rigonfie (fig. 1: GS).

(2) Non abbiamo trovato differenze morfologiche all'infuori dell'altezza delle cellule secretrici, che risulta minore nel tratto prossimale rispetto al resto delle ghiandole medesime.

(3) Una distinzione territoriale di questo tipo è stata messa in evidenza anche nelle ghiandole genitali accessorie del maschio di *Aedes aegypti* (DAPPLES, FOSTER, LEA, 1974).

(4) Nelle sezioni colorate col bleu di Toluidina questo secreto mostra una modesta affinità per detta sostanza (fig. 5 A).

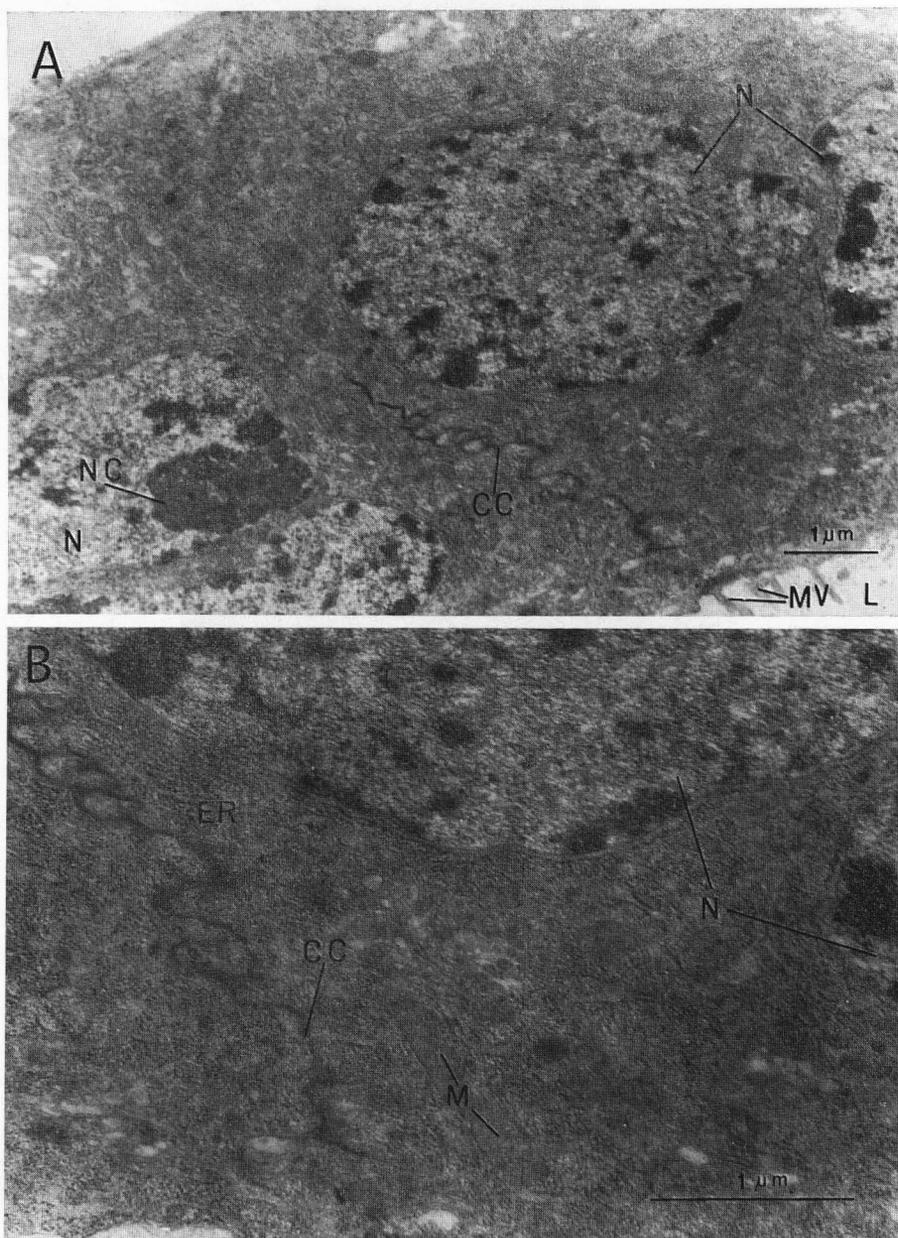


Fig. 4 - *Dacus oleae* Gmel. - Ghiandola sacciforme di maschio neofarfallato; particolari ripresi al microscopio elettronico a maggiore ingrandimento rispetto alla figura precedente: CC, confini cellulari; ER, ergastoplasma; L, lume; M, mitocondri; MV, microvilli; N, nucleo; NC, nucleolo.

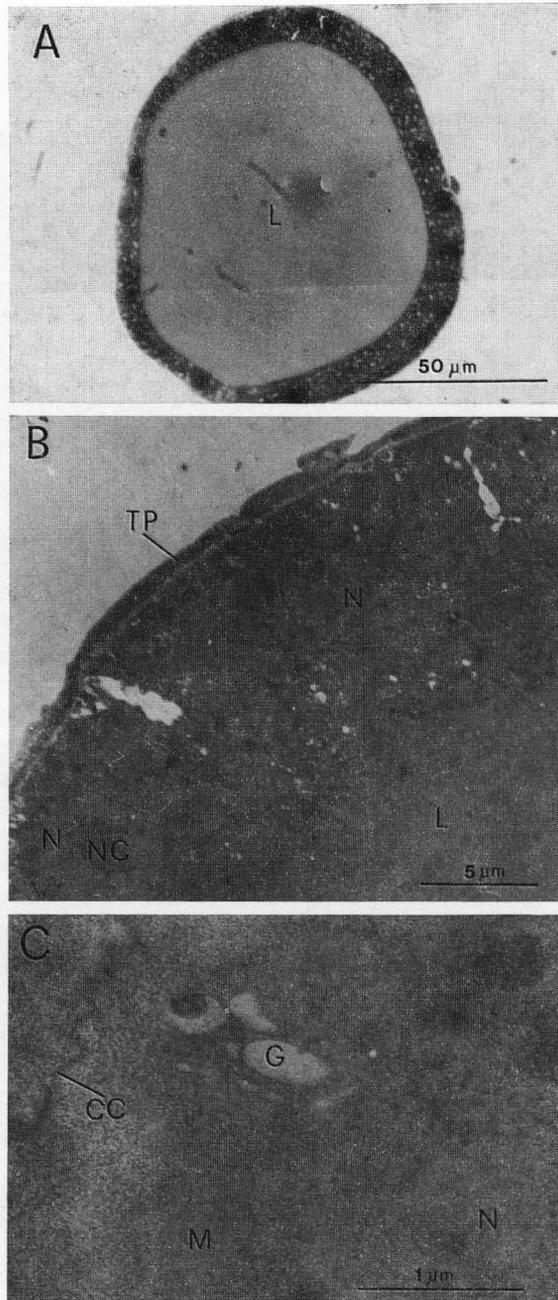


Fig. 5 - *Dacus oleae* Gmel. - Ghiandola sacciforme di maschio vergine sessualmente maturo; sezioni trasversali riprese al microscopio ottico (A) e al microscopio elettronico (B e C): CC, confini cellulari; G, Golgi; L, lume; M, mitocondrio; N, nucleo; NC, nucleolo. TP, tunica peritoneale.

È da notare che le due ghiandole sacciformi non sempre giungono a maturazione contemporaneamente; anzi, in soggetti relativamente giovani, ritenuti per altro sessualmente maturi, è possibile riscontrare (dall'aspetto esteriore e dalle altre caratteristiche sopra esposte) la presenza nello stesso individuo di una ghiandola completamente sviluppata, mentre l'altra è chiaramente arretrata.

Nel *maschio sacrificato alcune ore dopo il primo accoppiamento* le ghiandole sacciformi risultano per un verso simili al primo caso e per un altro al secondo: come nel maschio appena nato, le cellule secretrici appaiono colonnari, con le membrane laterali leggermente ingranate (fig. 7, B: CC)⁽⁵⁾ e con la parte apicale convessa ed abbondantemente provvista di microvilli (figg. 6 e 7); come nel maschio vergine sessualmente maturo, il citoplasma è ricco di vacuoli. Il lume della ghiandola risulta più o meno svuotato, anche se esteriormente questa conserva un aspetto molto simile al caso precedente.

ISTOLOGIA ED ULTRASTRUTTURA DELLE GHIANDOLE TUBULOSE

Le ghiandole tubulose presentano una tunica peritoneale (figg. 9, 12 e 13: TP) più consistente che nelle sacciformi, ricca di tracheole, terminazioni nervose e fibre muscolari (miofibrille striate) variamente orientate (figg. 9 e 10). Le cellule secretrici (fig. 9) poggiano su una membrana basale normale, sono relativamente voluminose, provviste di un grosso nucleo con relativo nucleolo sempre bene evidente e compatto, con citoplasma ricco in organelli (soprattutto mitocondri variamente conformati, e ribosomi liberi, mentre l'ergastoplasma è limitato alla zona perinucleare) e recante un intricato sistema di citomembrane (figg. 9, 10 e 12). I confini tra cellula e cellula non sono facilmente riconoscibili, e pertanto nella parte apicale dette cellule appaiono confluenti attorno al modesto lume ghiandolare. Quest'ultimo è rivestito da un unico strato di granuli (fig. 10: R) elettrondensi, i quali non ricoprono integralmente la superficie del lume stesso ma lasciano qua e là qualche spazio vuoto a mo' di minuta finestra.

Nei tre casi da noi esaminati (maschio neosfarfallato, maschio vergine sessualmente maturo, e maschio dopo il primo accoppiamento) le ghiandole tubulose presentano differenze vistose (strutturali ed ultrastrutturali) soprat-

⁽⁵⁾ Anche nelle ghiandole genitali accessorie dei maschi di *Aedes aegypti* L. è stato osservato un simile comportamento delle membrane di confine delle cellule secretrici, in relazione all'attività sessuale dell'insetto (DAPPLES, FOSTER, LEA, 1974).

tutto tra i maschi appena nati e quelli sessualmente maturi (sia vergini che dopo l'accoppiamento); mentre nell'ambito di questi ultimi le differenze si riducono quasi unicamente alla presenza o meno (o alla quantità) di secreto nelle ghiandole in parola.

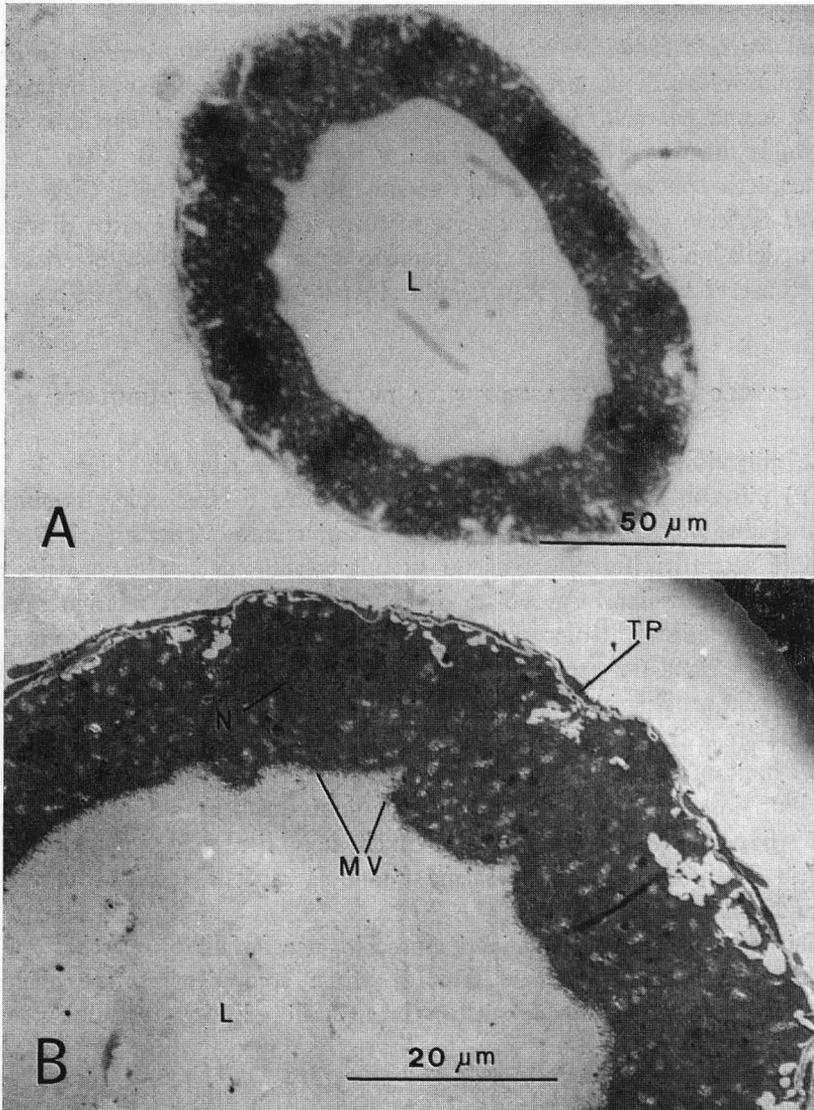


Fig. 6 - *Dacus oleae* Gmel. - Ghiandola sacciforme di maschio sacrificato alcune ore dopo l'accoppiamento; sezioni trasversali riprese al microscopio ottico (A) e all'elettronico (B): L, lume; MV, microvilli; N, nucleo; TP, tunica peritoneale.

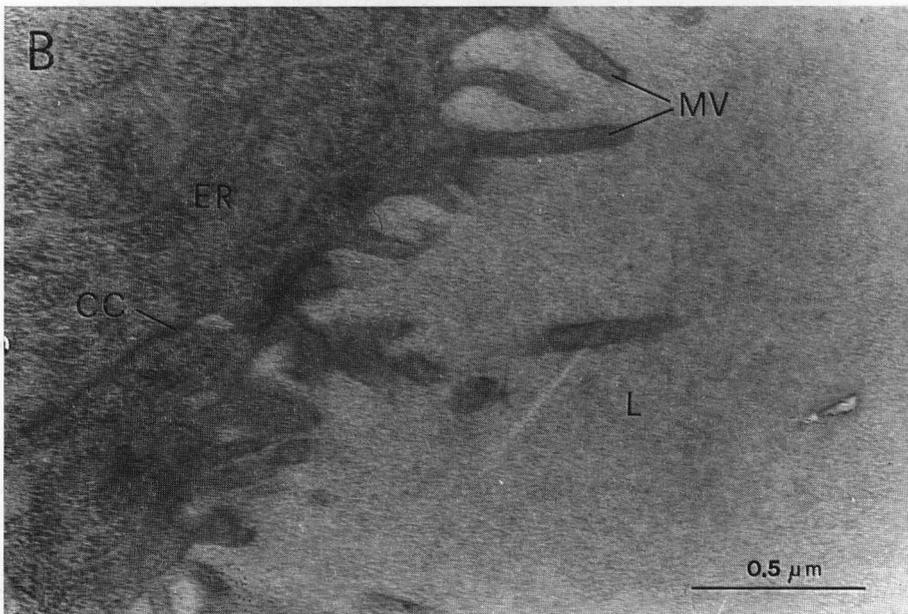
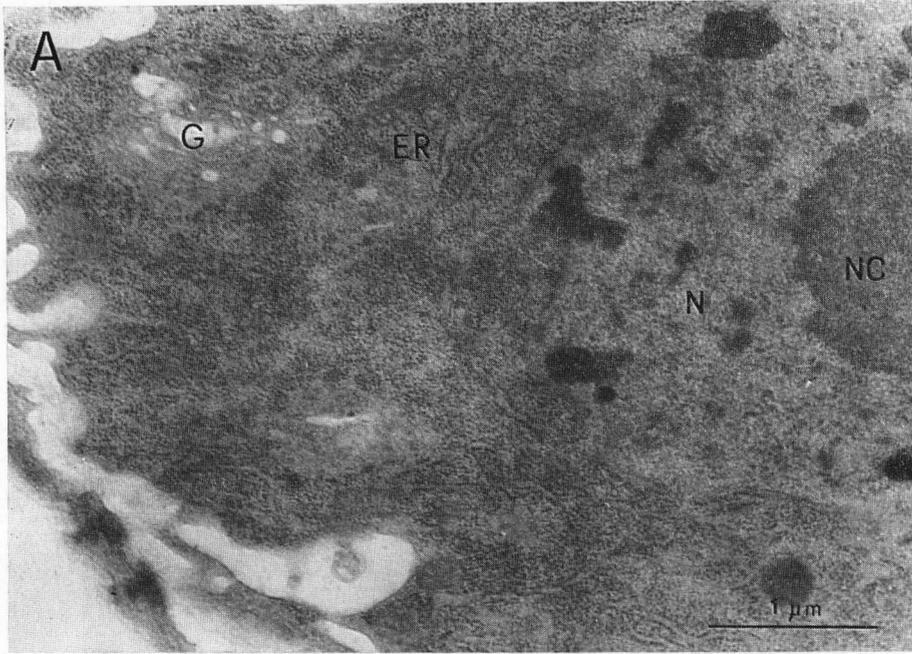


Fig. 7 - *Dacus oleae* Gmel. - Ghiandola sacciforme di maschio sacrificato alcune ore dopo l'accoppiamento; particolare della figura precedente a maggiore ingrandimento; A, parte basale della cellula secretrice; B, parte apicale della medesima: CC, confini cellulari; ER, ergastoplasma; G, Golgi; L, lume; MV, microvilli; N, nucleo; NC, nucleolo.

Nel *maschio appena sfarfallato* le ghiandole tubulose (fig. 8) hanno un diametro poco variabile ($2/3$ circa di quello massimo delle ghiandole sacciformi) per gran parte della loro lunghezza (eccettuato il tratto prossimale che è sempre gradualmente attenuato verso lo sbocco), mostrano una superficie esterna poco accidentata ed un andamento generale abbastanza semplice. Le cellule secernenti (fig. 9) presentano un grosso nucleo sferoidale con carioteca normale, citoplasma relativamente compatto e con mitocondri di forma comune (figg. 9 e 10). Lo strato di materiale elettrondenso che circonda il lume ghiandolare aderisce perfettamente alla superficie apicale delle cellule che l'hanno prodotto (figg. 9 e 10: R).



Fig. 8 - *Dacus oleae* Gmel. - Ghiandola tubulosa di maschio neosfarfallato; preparato fresco in soluzione fisiologica, visto al microscopio ottico a contrasto interferenziale: L, lume; T, trachea.

Nel *maschio vergine sessualmente maturo* (fig. 1: GT) le ghiandole tubulose hanno un diametro gradualmente crescente per quasi tutta la loro lunghezza (eccetto che nel tratto medio dove è abbastanza costante), fino a raggiungere spesso, all'estremità distale, il diametro massimo delle ghiandole sacciformi; hanno un andamento molto tortuoso (difficilmente districabile) e spesso si biforcano nel tratto subdistale. La superficie esterna delle ghiandole appare tutta bitorzolosa, ovvero vescicolosa, per un considerevole rigonfiamento delle singole cellule secernenti.

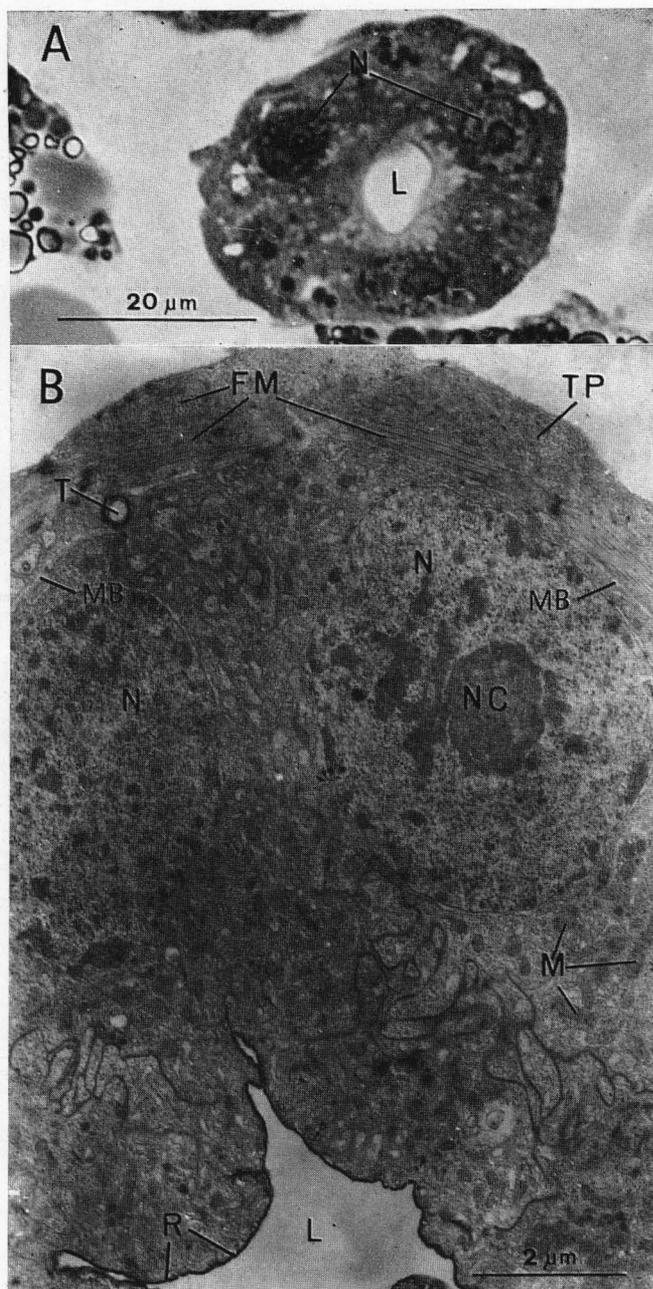


Fig. 9 - *Dacus oleae* Gmel. - Ghiandola tubulosa di maschio neofarfallato; A, sezione trasversale ripresa al microscopio ottico; B, altra sezione trasversale, ripresa al microscopio elettronico: L, lume; M, mitocondri; MB, membrana basale; N, nucleo, NC, nucleolo; R, rivestimento apicale della cellula secernente; TP, tunica peritoneale.

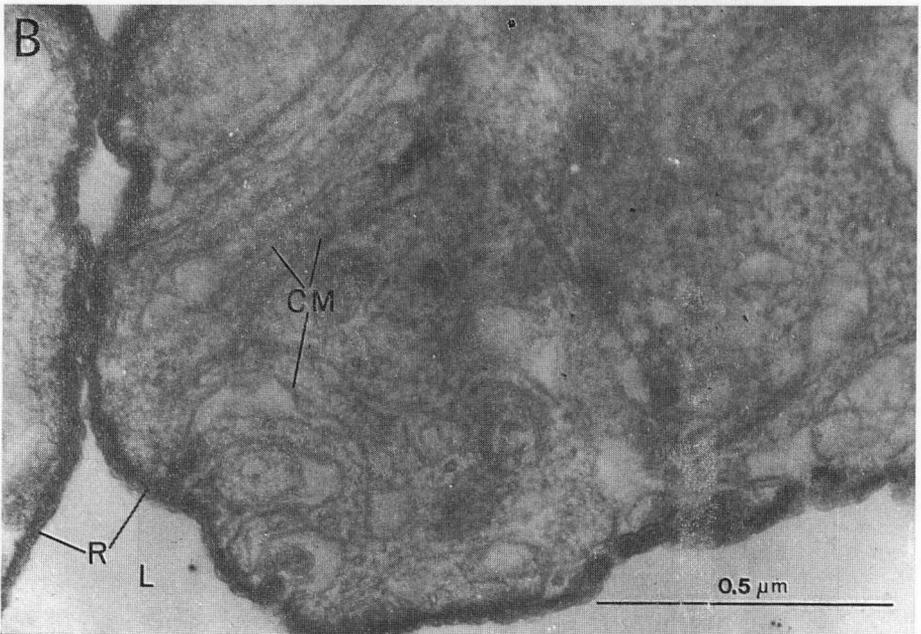
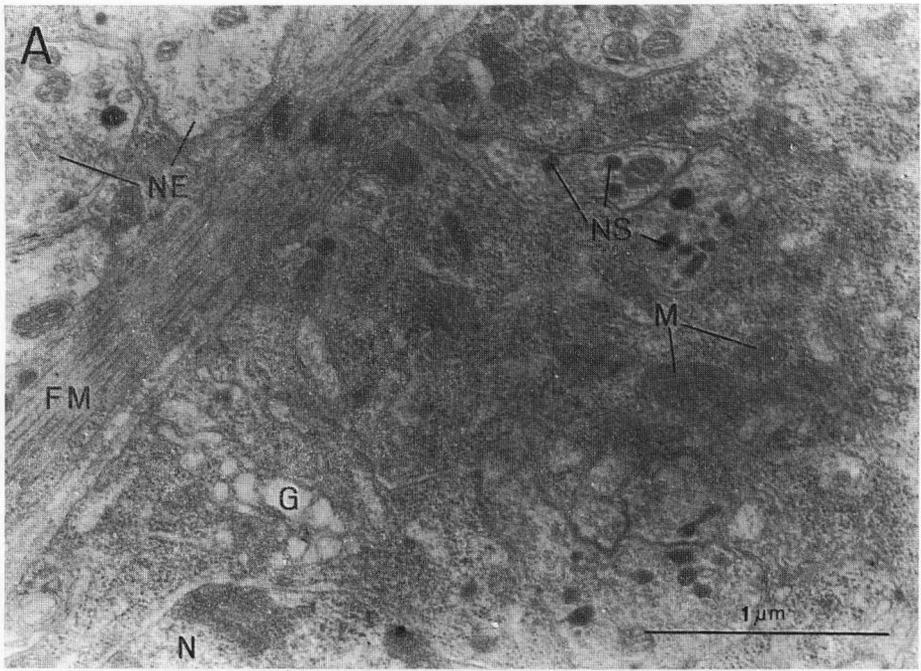


Fig. 10 - *Dacus oleae* Gmel. - Ghiandola tubulosa di maschio neosfarfallato; particolari ripresi al microscopio elettronico, più ingranditi che nella figura precedente: CM, citomembrane; FM, miofibrilla visibilmente striata; G, Golgi; L, lume; M, mitocondri; N, nucleo; NE, terminazioni nervose; NS, neurosecreto; R, rivestimento apicale della cellula secernente.

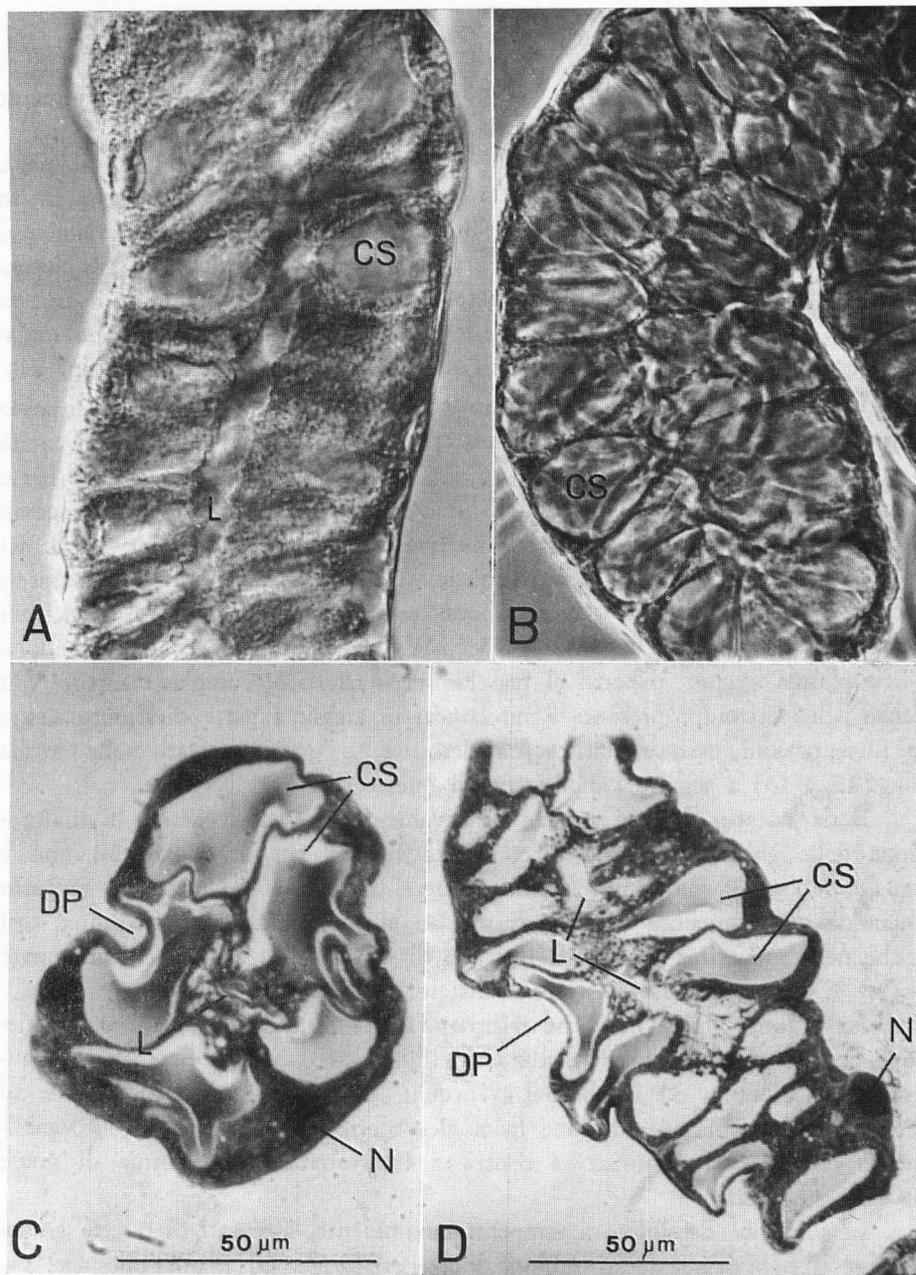


Fig. 11 - *Dacus oleae* Gmel. - Ghiandola tubulosa di maschio vergine sessualmente maturo; A, porzione intermedia vista al microscopio ottico a contrasto interferenziale; B, porzione distale vista a contrasto di fase (A e B, preparati freschi in soluzione fisiologica); C e D, sezioni trasversale e longitudinale, riprese al microscopio ottico a contrasto di fase; CS, cavità (serbatoi) di raccolta del secreto; DP, depressione peristaltica; L, lume; N, nucleo.

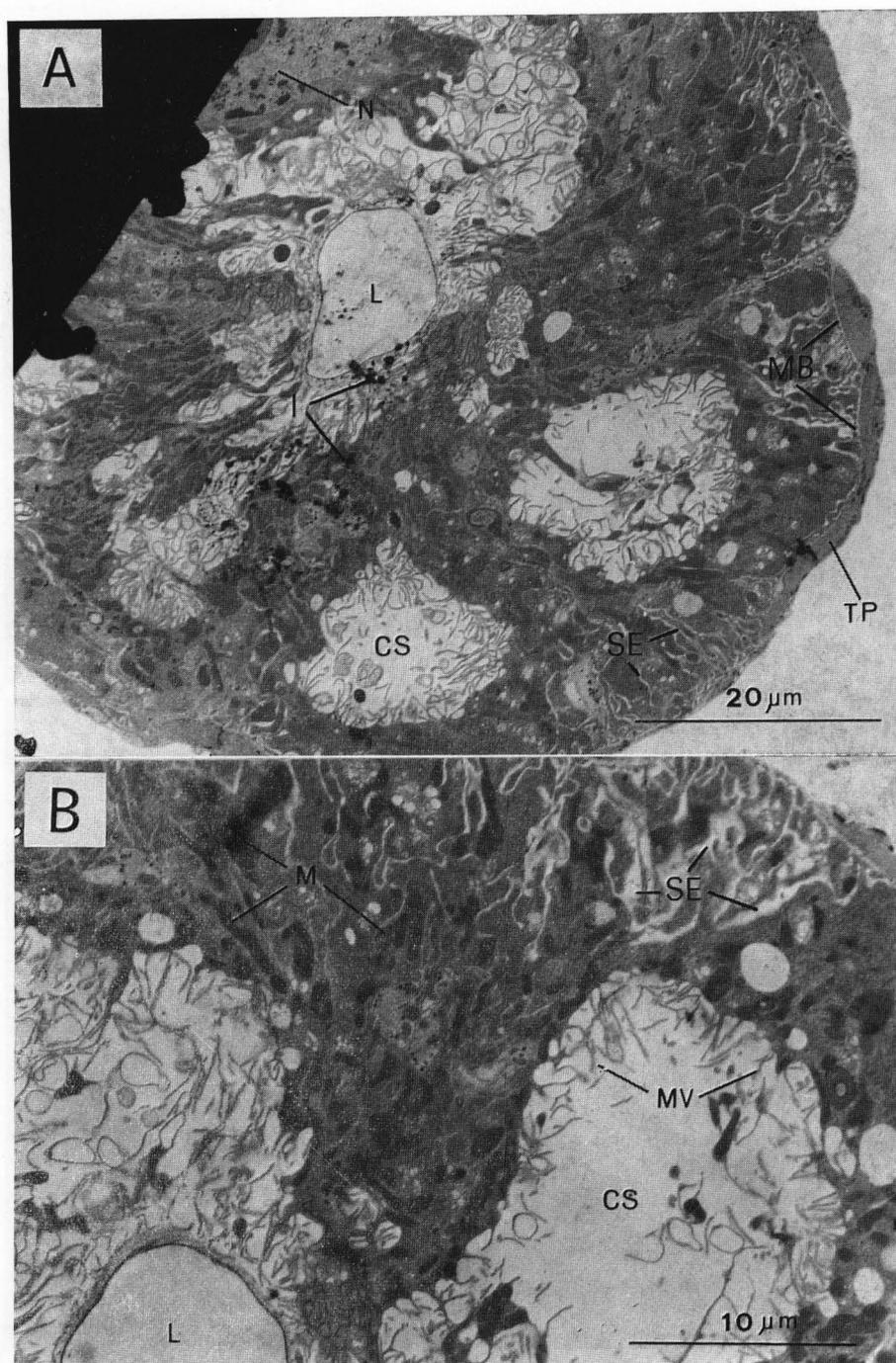


Fig. 12 - *Dacus oleae* Gmel. - Ghiandola tubulosa di maschio vergine sessualmente maturo; sezioni trasversali riprese al microscopio elettronico; A, visione d'insieme; B, particolare a maggiore ingrandimento: CS, cavità di raccolta del secreto; I, impurezze; L, lume; M, mitocondri; MB, membrana basale; MV, microvilli; N, nucleo; SE, spazi extracellulari.

La tunica peritoneale (figg. 12 e 13: TP) ha uno spessore notevolmente variabile ed in molti punti appare discontinua.

Le cellule secretrici presentano sul lato basale la membrana (in parte lo è anche la membrana basale; fig. 12: MB) profondamente introflessa in un intricato sistema di invaginazioni (delimitanti spazi extracellulari, ovviamente; fig. 12: SE) di forma molto irregolare, le quali si spingono nel citoplasma fino alla parte subapicale delle singole cellule. Queste presentano il nucleo di forma notevolmente irregolare (nelle sezioni la carioteca mostra un andamento molto sinuoso) e confinato all'estremità basale della cellula (fig. 11).

Il citoplasma si trova distribuito come uno strato più o meno spesso attorno ai lati ed alla base della cellula, per dare spazio ad una vistosa cavità o serbatoio di raccolta del secreto (figg. 11 e 12: CS) che invade la parte centrale ed apicale della cellula fino al lume ghiandolare, intorno al quale spesso non rimane altro che lo strato inerte che rivestiva inizialmente (figg. 9 e 10: R) la superficie apicale delle cellule secretrici. Detto serbatoio presenta le pareti provviste di microvilli più o meno abbondanti in ragione inversa al grado più o meno avanzato (cfr. figg. 12 e 13: MV) di maturazione della ghiandola. Il citoplasma appare, rispetto al maschio neosfarfallato, complessivamente più denso agli elettroni e presenta i mitocondri in massima parte distribuiti lungo le invaginazioni extracellulari sopra descritte, e quasi adattati nella forma (figg. 12 e 13) a seguire l'andamento di queste.

È da notare, che nei maschi relativamente giovani il grado di maturazione delle ghiandole tubulose (come già riferito per le sacciformi) non è uguale per tutte, ma capita frequentemente di trovare nello stesso soggetto ghiandole perfettamente mature accanto ad altre notevolmente arretrate; così anche nella medesima ghiandola, il grado di maturazione è spesso visibilmente scalare e crescente verso l'estremità distale.

Sia il lume ghiandolare che i serbatoi delle cellule sono pieni del medesimo secreto che a forte ingrandimento (fig. 13, B) appare finemente granuloso, è incolore⁽⁶⁾ ed insolubile in acqua: presso lacerazioni provocate ad arte sulla ghiandola in soluzione fisiologica, detto secreto si accumula visibilmente (al microscopio ottico a contrasto interferenziale) in forma di gocce di varia grandezza.

In soluzione fisiologica a temperatura ambiente, i tessuti di queste ghiandole restano vivi per molti minuti dopo l'estrazione ed è possibile così osservare al microscopio ottico i movimenti peristaltici, per effetto dei quali

⁽⁶⁾ Nelle sezioni colorate col bleu di Toluidina questo secreto mostra una forte affinità per detta sostanza (come può vedersi anche nella fig. 11, C e D).

sulle convessità esterne sopra menzionate si formano e riformano ripetutamente depressioni ed inflessioni più o meno ampie e profonde, in corrispondenza delle quali, nelle sottostanti cellule secretrici il secreto viene compresso nel serbatoio e costretto a versarsi nel lume della ghiandola. Di tale comportamento rimane indicazione anche nel materiale fissato, come mostrano le figure 11 (C e D: DP) e 13 (A).

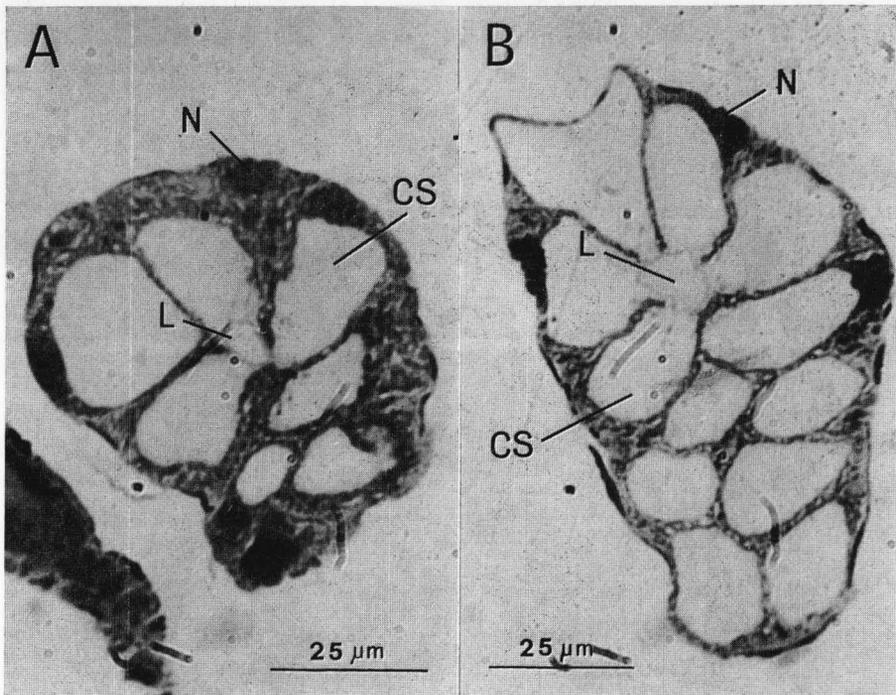


Fig. 14 - *Dacus oleae* Gmel. - Ghiandola tubulosa di maschio sacrificato alcune ore dopo l'accoppiamento; sezioni trasversali riprese al microscopio ottico: CS, cavità di raccolta del secreto; L, lume; N, nucleo.

Nel maschio sacrificato alcune ore dopo il primo accoppiamento, le condizioni delle ghiandole tubulose appaiono in tutto simili (figg. 14 e 15) a quelle del caso precedente, con la sola differenza che sia il lume ghiandolare che i serbatoi di raccolta del secreto risultano in massima parte vuoti, come può vedersi anche nelle sezioni colorate col bleu di Toluidina (cfr. figg. 11 C e D e 14).

Sembra da notare anche il fatto che nel materiale fissato ed incluso manchino praticamente segni dei movimenti peristaltici sopra riferiti.

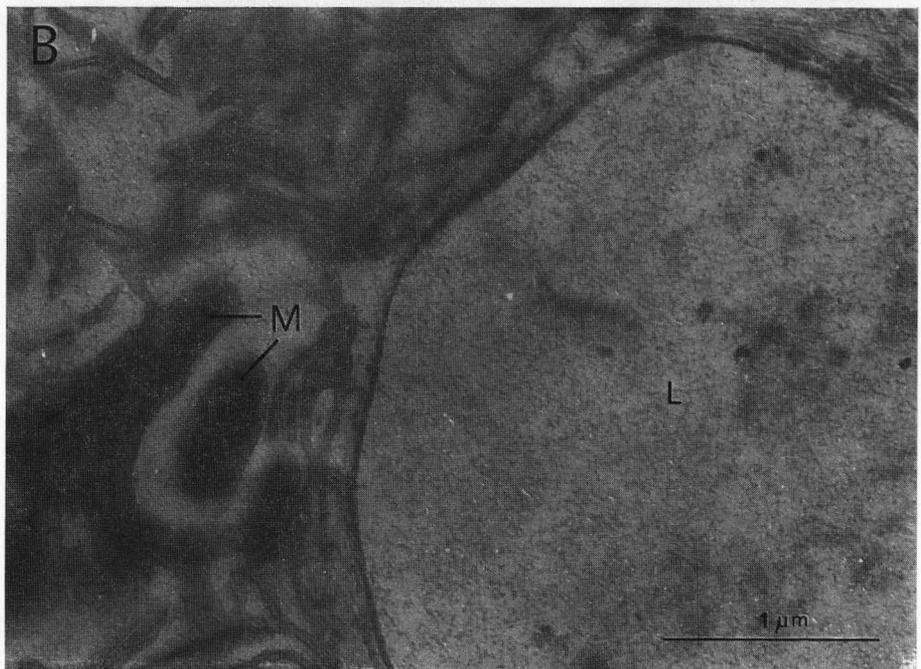
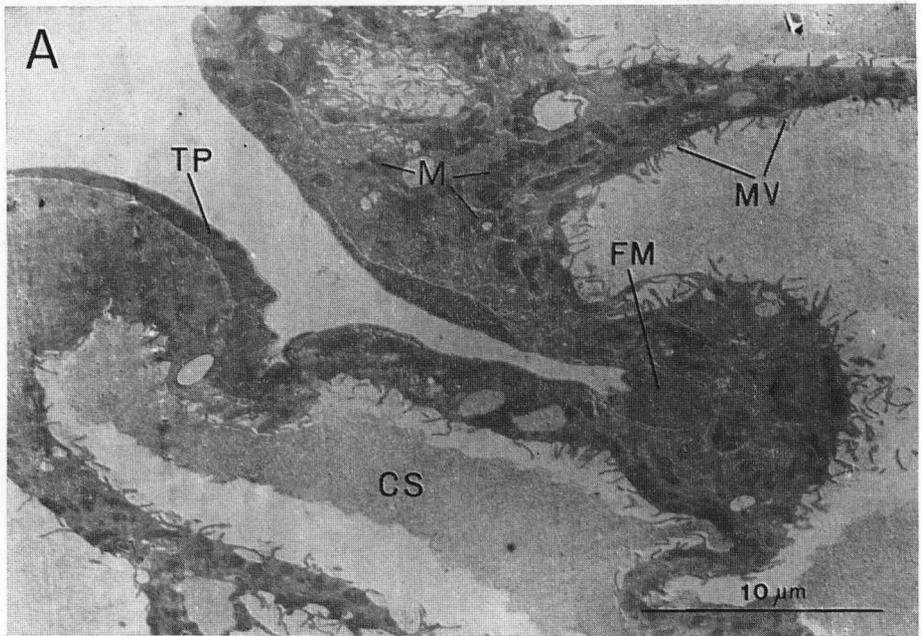


Fig. 13 - *Dacus oleae* Gmel. - Ghiandola tubulosa di maschio vergine sessualmente maturo; particolari a maggiore ingrandimento che nella figura precedente: CS, cavità di raccolta del secreto; FM, fibra muscolare; L, lume; M, mitocondri; MV, microvilli; TP, tunica peritoneale.

DISCUSSIONE

Le osservazioni dirette al microscopio ottico su apparati genitali isolati (abbastanza integri), effettuate nei minuti di vita che gli organi manifestano in soluzione fisiologica, possono dare già una buona idea dei meccanismi di funzionamento dell'insieme e dei singoli organi. È stato così possibile osservare movimenti peristaltici nei testicoli (soprattutto nella parte basale), nei vasi deferenti e nel canale eiaculatore (particolarmente vivaci e potenti nell'ampolla eiaculatrice), oltre che, come è stato sopra ampiamente illustrato, nelle ghiandole genitali accessorie.

Già da queste osservazioni preliminari, ripetute comparativamente nel maschio appena nato, nel maschio vergine sessualmente maturo e nel maschio sacrificato alcune ore dopo il primo accoppiamento, si ha una sufficiente indicazione dell'importanza del grado di sviluppo, o meglio della disponibilità di secreto nelle ghiandole genitali accessorie, al fine della disponibilità del maschio all'accoppiamento, sia la prima volta che le volte successive.

In tal modo, infatti, è possibile vedere al microscopio ottico (preferibilmente a contrasto interferenziale) come nel maschio appena nato, contemporaneamente alla presenza nei testicoli di spermatozoi maturi, le ghiandole genitali accessorie sono palesemente immature: le sacciformi (fig. 2, C) relativamente sottili e con cellule secrettrici allungate ed apicalmente sporgenti nel lume modesto e quasi vuoto⁽⁷⁾; le tubulose (fig. 8) pure alquanto sottili, esternamente lisce e con cellule secrettrici ancora sprovviste di serbatoio di raccolta del secreto.

Nel maschio vergine sessualmente maturo la situazione appare ben diversa: le ghiandole sacciformi (fig. 1: GS) si presentano alquanto rigonfie e con cellule secrettrici relativamente basse ed apicalmente non sporgenti nel lume divenuto ampio e pieno di secreto⁽⁸⁾; le ghiandole tubulose (fig. 1: GT) appaiono notevolmente ingrossate, particolarmente nel tratto distale, ed esternamente bitorzolute per il rigonfiamento basale delle singole cellule secrettrici in seguito alla formazione di un vistoso serbatoio di raccolta del secreto (fig. 11: CS).

Negli stessi preparati viene facilmente in evidenza la diversa natura dei secreti relativi ai due tipi di ghiandole. Infatti, nella soluzione fisiologica, il secreto delle ghiandole sacciformi è prontamente solubile, mentre quello

(7) Ciò viene facilmente evidenziato mediante piccoli spostamenti del vetrino coprioggetto, ovvero per schiacciamento graduale del preparato durante l'osservazione.

(8) L'osservazione è facilitata anche dalla presenza in sospensione nel secreto di frammenti di microvilli che seguono ed indicano gli spostamenti del secreto medesimo durante i movimenti peristaltici della ghiandola.

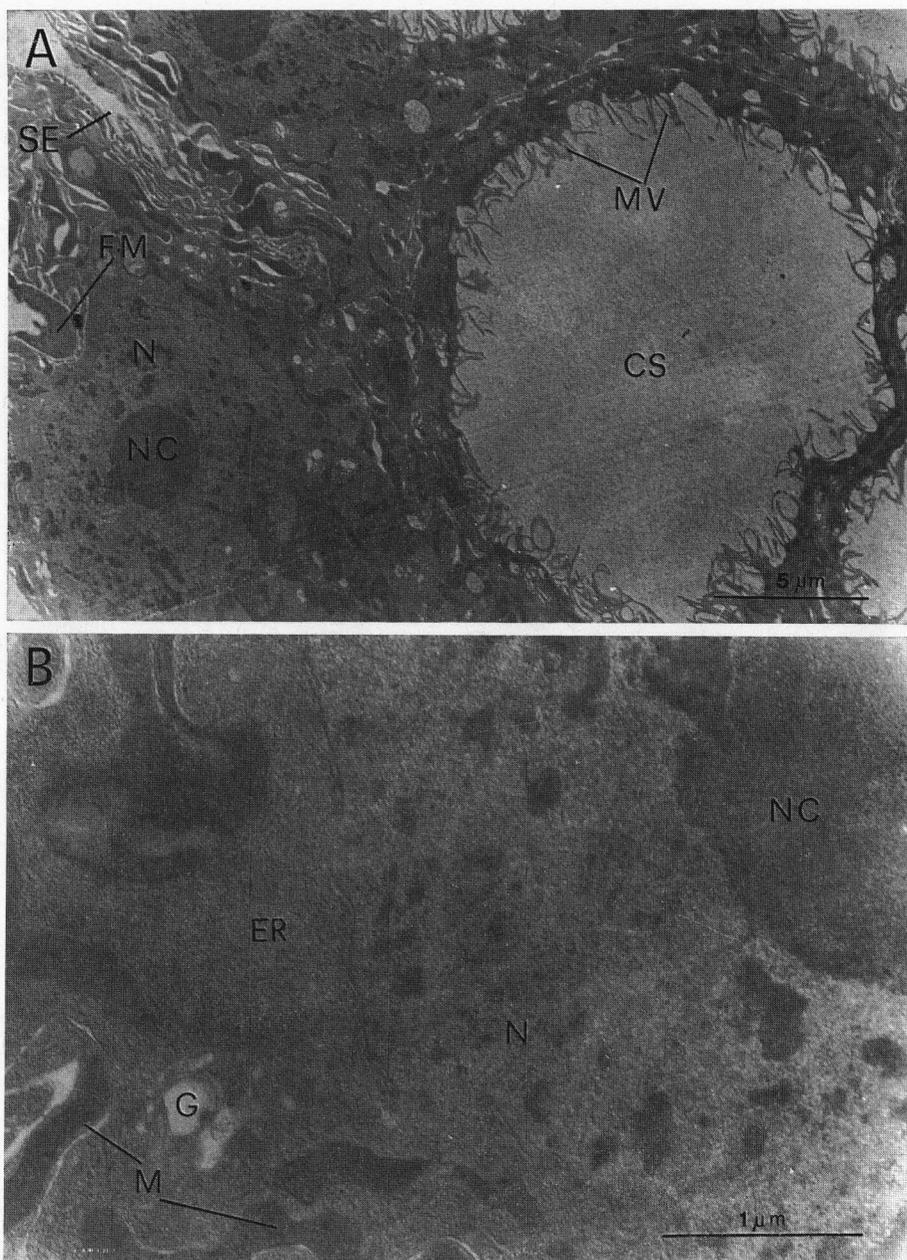


Fig. 15 - *Dacus oleae* Gmel. - Ghiandola tubulosa di maschio sacrificato alcune ore dopo l'accoppiamento; sezioni trasversali riprese al microscopio elettronico: CS, cavità di raccolta del secreto; ER, ergastoplasma; FM, fibra muscolare; G, Golgi; M, mitocondri; MV, microvilli; N, nucleo; NC, nucleolo.

delle tubulose rimane distinto in gocce di varia grandezza. Tale comportamento dei due secreti nella soluzione salina acquosa fa pensare a proteine ed a mucopolisaccaridi acidi come costituenti principali (se non esclusivi) dei prodotti delle ghiandole sacciformi e delle tubulose rispettivamente. Ciò anche in analogia con quanto è stato messo in luce in molti insetti (Blattodei, Ortoteri, Lepidotteri, Ditteri, Coleotteri, Imenotteri) finora studiati sotto questo aspetto (CANTACUZÈNE, 1967; HISS e FUCHS, 1972; HUIGNARD, 1974).

Nel maschio sacrificato alcune ore dopo il suo primo accoppiamento, il quadro generale è tanto simile a quello precedente da non potersi in pratica distinguere da questo se non per l'assenza, o la presenza in quantità modestissima, di secreto nel lume delle ghiandole sacciformi e nel lume e nel serbatoio di raccolta delle ghiandole tubulose (?).

Le osservazioni su materiale fresco ci consentono, dunque, di affermare che: *a*) il periodo immaginale preriproduttivo nel maschio del *Dacus oleae* è richiesto per la maturazione e per l'accumulo di secreto nelle ghiandole genitali accessorie; *b*) il periodo di riposo relativamente lungo tra un accoppiamento e l'altro è necessario per la nuova produzione e l'accumulo di secreto nelle stesse ghiandole.

Lo studio istologico effettuato su sezioni al fotomicroscopio ha confermato, con aggiunta di importanti particolari e di qualche fatto nuovo, i reperti ottenuti su organi freschi. Viene data per questa via una più esauriente dimostrazione delle condizioni di sviluppo e del funzionamento (di fatto ad intermittenza) delle ghiandole sacciformi e delle tubulose, ed è messo in luce il comportamento delle cellule secretrici: apocrino in quelle e merocrino in queste. Il diverso grado di affinità al bleu di Toluidina dei due secreti: mediocre nelle ghiandole sacciformi (fig. 5, A) e decisamente forte nelle tubulose (fig. 11, C e D), conferma la probabile natura proteica del secreto nel primo caso e la presenza di mucopolisaccaridi acidi nel secondo.

Lo studio delle ultrastrutture al microscopio elettronico ha confermato ulteriormente ed in certo senso ha completato i reperti ottenuti coi primi due metodi di indagine. Così nelle ghiandole sacciformi è stato facilmente confermato il comportamento apocrino, ed è stata avvalorata l'ipotesi della natura proteica del secreto dalla presenza di ergastoplasma (figg. 4 e 7: ER) notevolmente abbondante e diffuso nelle cellule secretrici. Nelle ghiandole tubulose è stato messo in evidenza nei dettagli il processo di maturazione delle cellule secretrici, il quale consiste essenzialmente in uno sviluppo enorme come superficie della membrana cellulare di base (mediante numerosissime inflessioni che penetrano, spostando il citoplasma, fino alla parte subapicale della cellula) e di quella apicale (mediante la formazione del vistoso serbatoio di raccolta del secreto, internamente rivestito di microvilli), mentre i mitocondri

(divenuti molto numerosi) vengono a trovarsi distribuiti lungo dette membrane ed adattati nella forma a seguirne l'andamento, ciò chiaramente al fine di fornire l'energia (ATP) necessaria per il trasporto attivo di ioni attraverso le membrane medesime, ed in definitiva dal sangue alla cellula secretrice e da questa al relativo serbatoio e quindi al lume della ghiandola. Tutto ciò conferma esaurientemente il comportamento merocrino (o addirittura diacrino) delle ghiandole tubulose.

Altri fatti importanti messi in luce da queste indagini sono: *a*) la presenza ancora una volta di miofibrille striate (fig. 10) nei muscoli splancnici; e *b*) la presenza nelle terminazioni nervose (che attraversano la tunica peritoneale e s'insinuano con le sinapsi, spingendo la membrana basale e quella cellulare, più o meno profondamente nelle singole cellule secretrici) di neuro-secreto (fig. 10: NS) proveniente, è presumibile, dalle cellule neurosecretori dell'ultima coppia di gangli della catena ganglionare ventrale. Il che significa una dipendenza diretta dello sviluppo e della funzionalità delle ghiandole medesime dal sistema nervoso centrale. In Ortotteri (PENER, 1974) è stata dimostrata la dipendenza diretta (oltre che indiretta via « Corpora allata ») dalle cellule neurosecretori cerebrali dello sviluppo e della funzionalità delle ghiandole genitali accessorie maschili.

CONCLUSIONI

Sulla base di quanto abbiamo sopra riferito è possibile trarre le conclusioni seguenti:

1) I maschi di *Dacus oleae* Gmel. sfarfallano con le ghiandole genitali accessorie immature ed è questa la ragione per cui non sono in grado di accoppiarsi se non dopo un certo numero di giorni di vita immaginale (periodo preriproduttivo).

2) I processi di maturazione nei due tipi di ghiandole presenti, le sacciformi e le tubulose, consistono: per le prime, quasi unicamente nell'accumulo di secreto nel lume ghiandolare che funge anche da serbatoio; per le seconde, in profonde trasformazioni morfologiche e fisiologiche delle cellule secretrici e nell'accumulo di secreto negli appositi serbatoi di raccolta e nel lume ghiandolare. Lo sviluppo e la funzionalità delle ghiandole genitali accessorie dipendono direttamente dal sistema nervoso centrale.

3) Le ghiandole sacciformi hanno comportamento apocrino e producono un secreto di natura (molto probabilmente) proteica.

4) Le ghiandole tubulose hanno comportamento merocrino e producono un secreto formato (molto probabilmente) da mucopolisaccaridi acidi.

5) La disponibilità di secreto nelle ghiandole accessorie è indispensabile perché il maschio cerchi la femmina e si accoppi con essa. Durante l'accoppiamento i serbatoi (lume e serbatoi propriamente detti) delle ghiandole genitali accessorie vengono quasi interamente svuotati ed è questa la ragione per cui i maschi del *Dacus* non sono in grado di ripetere subito la copula, ma ridiventano sessualmente attivi soltanto dopo un periodo di riposo relativamente lungo (almeno 24 ore) richiesto dalle ghiandole medesime per produrre ed accumulare nuovamente i secreti in quantità sufficiente.

6) Le ghiandole genitali accessorie, una volta sviluppate, sembrano in grado di funzionare in continuazione (come ipotizzato da CAVALLORO e DELRIO, 1970), ma, di fatto, le cellule secrettrici interrompono la secrezione quando lume e serbatoi ghiandolari sono pieni di secreto (come avviene nei maschi vergini sessualmente maturi), per riprendere la secrezione medesima non appena lume e serbatoi ghiandolari si svuotano con la copula (come si osserva nei maschi sacrificati alcune ore dopo l'accoppiamento).

7) È molto probabile che la ridotta competitività sessuale osservata in maschi di *Dacus* trattati con differenti dosi di radiazioni gamma (CAVALLORO, DELRIO, 1973) sia da attribuire ad una maggiore o minore gravità di danni (diretti od indiretti) prodotti da tali radiazioni alle ghiandole genitali accessorie.

SUMMARY

ANATOMICAL, STRUCTURAL, ULTRASTRUCTURAL AND PHYSIOLOGICAL ASPECTS OF THE MALE ACCESSORY REPRODUCTIVE GLANDS OF *Dacus oleae* GMEL., IN RELATION TO SEXUAL MATURITY AND ACTIVITY

In the present work the authors explain on anatomical and physiological bases, some known ethological findings about male reproductive biology of *Dacus oleae* Gmel., e.g.: 1) neonate *Dacus* males, although mature spermatozoa are present in their testicoli, do not exhibit sexual activity soon after emergence, but only some days later; 2) sexually mature males after a mating do not resume sexual activity before a relatively long (some 24 h) time has elapsed.

The following features are described and illustrated in detail: a) the topographical anatomy of the male reproductive system of *Dacus oleae*, with particular regard to the accessory glands (4 pairs); b) physiological histology both in the «sacciform» (1 pair) and «tubulose» (3 pairs) accessory glands, in neonate males, in sexually mature males, before and after mating; c) ultrastructure of sacciform and tubulose glands in the three cases considered above.

The results obtained are discussed, and the following conclusions are drawn:

1) *Dacus oleae* males emerge with immature accessory reproductive glands. This is why they do not mate soon after emergence, but only some days later.

2) The maturation process of these glands consists: a) for the sacciform glands,

almost solely in producing and accumulating secretion into the lumen; *b*) for the tubulose glands, in an evident modification of the morphology and physiology of secretory cells in addition to the production and accumulation of secretion into peculiar cellular reservoirs and in the lumen.

Both development and functionality of the accessory glands are directly controlled by the central nervous system.

3) The sacciform glands are of the apocrine type and they give a (most probably) proteinaceous secretion.

4) The tubulose glands are of the merocrine type and they give a secretion that most probably consists of carboxylate mucopolisaccarides.

5) The presence of secretion in the accessory glands is required by the *Dacus* male in the search female for mating.

BIBLIOGRAFIA

- ADAMS T.S., NELSON D.R., 1968 - Bioassay of crude extracts for the factor that prevents second matings in female *Musca domestica*. *Ann. Ent. Soc. Am.*, vol. 61, pp. 112-116.
- BACCETTI B., 1963 - Indagini ultramicroscopiche sul problema della costituzione delle tuniche peritoneali ovariche e dell'esistenza negli insetti di fibre muscolari lisce. *Redia*, vol. XLVIII, pp. 1-13.
- BACCETTI B., 1965 - Advances in insect population control by the sterile male technique. IAEA, Vienna, STI/DOC/10/44, pp. 8-11.
- BLAINE W.D., DIXON S.E., 1973 - The effect of juvenile hormone on the function of the accessory gland of the adult male cockroach *Periplaneta americana*. *Can. Ent.*, Vol. 105, pp. 1275-1280.
- CANTACUZÈNE A.N., 1967 - Histologie des glandes annexes mâle de *Schistocerca gregaria* F. (Orthopteres). Effet de l'allatectomie sur leur structure et leur activité. *C. R. Acad. Sc. Paris*, Vol. 264, pp. 93-96 (serie D).
- CAVALLORO R., DELRIO G., 1970 - Rilievi sul comportamento sessuale di *Dacus oleae* Gmelin (*Diptera*, *Trypetidae*) in laboratorio. *Redia*, Vol. LII, pp. 201-230.
- CAVALLORO R., DELRIO G., 1973 - La radiosterilizzazione di *Dacus oleae* Gmelin e prospettive di lotta mediante la tecnica del maschio sterile. *Redia*, Vol. LIV, pp. 153-167.
- CRAIG G.B. Jr., 1967 - Mosquitoes: Female monogamy induced by male accessory Gland Substance. *Science*, Vol. 156, pp. 1499-1501.
- DAPPLES C.C., FOSTER W.A., LEA A.O., 1974 - Ultrastructure of the accessory gland of the male Mosquito, *Aedes aegypti* (L.) (*Diptera*: *Culicidae*). *Int. J. Insect Morphol. & Embryol.*, Vol. III, pp. 279-291.
- ENGELMANN F., 1970 - The physiology of insect reproduction. Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, Sydney, Braunschweig.
- FOX A.S., MEAD C.B., MUNYON I.L., 1959 - Sex peptide of *Drosophila melanogaster* (L.). *Science*, N. York, Vol. 129, pp. 1489-1490.
- FRIEDEL T., GILLOTT C., 1976 - Male accessory gland substance of *Melanoplus sanguinipes*: an oviposition stimulant under the control of the corpus allatum. *J. Insect Physiol.*, Vol. 22, pp. 489-495.
- FUCHS M.S., CRAIG G.B., DESPOMMIER D.D., 1969 - The protein nature of the substance inducing female monogamy in *Aedes aegypti*. *J. Insect Physiol.*, Vol. 15, pp. 701-709.
- GILLOTT C., FRIEDEL T., 1976 - Development of accessory reproductive glands and its control by the corpus allatum in adult male *Melanoplus sanguinipes*. *J. Insect Physiol.*, Vol. 22, pp. 365-372.

- HISS E. A., FUCHS M. S., 1972 - The effect of matrone on oviposition in the mosquito, *Aedes aegypti*. *J. Insect Physiol.*, Vol. 18, pp. 2217-2227.
- HUIGNARD J., 1974 - Influence de la copulation sur la fonction reproductrice femelle chez *Acanthoscelides obtectus* (Coléoptère Bruchidae). I. Copulation et spermatophore. *Ann. Sc. Nat. Zool. Paris*, 12^a Serie, Tome 16, pp. 361-434.
- HUIGNARD J., 1975 - Influence de la copulation sur la fonction reproductrice femelle chez *Acanthoscelides obtectus* (Coléoptère Bruchidae). II. Analyse expérimentale. *Ann. Sc. Nat. Zool. Paris*, 12^a Serie, Tome 17, pp. 1-66.
- LEAHY S. M. G., 1967 - Non specificity of the male factor enhancing egg-laying in Diptera. *J. Insect Physiol.*, Vol. 13, pp. 1283-1292.
- LEAHY M. G., LOWE M. L., 1967 - Purification of the male factor increasing egg deposition in *D. melanogaster*. *Life Sc.*, Vol. 6, pp. 151-156.
- LEFEVRE G., JONSSON U. B., 1962 - Sperm transfer, storage, displacement, and utilization in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, Vol. 47, pp. 1719-1736.
- LUM P. T. M., 1961 - The reproductive system of some Florida Mosquitoes. I. The male reproductive tract. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, Vol. 54, pp. 397-401.
- LUM P. T. M., 1961 a - The reproductive system of some Florida Mosquitoes. II. The male accessory glands and their role. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, Vol. 54, pp. 430-433.
- MERLE J., 1968 - Fonctionnement ovarien et réceptivité sexuelle de *Drosophila melanogaster* après implantation de fragments de l'appareil génital male. *J. Insect Physiol.*, Vol. 14, pp. 1159-1168.
- PENER M. P., 1974 - Neurosecretory and corpus allatum controlled effects on male sexual behaviour in acridids. In BROWNE L. B. « Experimental Analysis of Insect Behaviour ». pp. 264-277, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- RICHARD G., 1974 - Sequential analysis and regulation of insect reproductive behaviour. In BROWNE L. B. « Experimental Analysis of Insect Behaviour », pp. 7-15, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- RIEMANN J. G., MOEN D. J., THORSON B. J., 1967 - Female monogamy and its control in houseflies. *J. Insect Physiol.*, Vol. 13, pp. 407-418.
- RIEMANN J. G., THORSON B. J., 1969 - Effect of male accessory material on oviposition and mating by female house flies. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, Vol. 62, pp. 828-834.
- ROUSSEL J. P., 1967 - Fonctions des corpores allata et contrôle de la pigmentation chez *Gryllus bimaculatus* De Geer. *J. Insect Physiol.*, Vol. 13, pp. 113-130.
- TZANAKAKIS M. E., 1967 - Duration of sperm fertilizing capacity within the female of *Dacus oleae*, and fecundity of females isolated after mating (Diptera: Tephritidae). *Ann. Entom. Soc. Am.*, Washington, Vol. 60, pp. 285-286.
- TZANAKAKIS M. E., TSITSIPIS J. A., ECONOMOPOULOS A. P., 1968 - Frequency of mating in females of the olive fruit fly under laboratory conditions. *J. Econ. Entomol.*, Vol. 61, pp. 1309-1312.