

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

STUDIO ANATOMICO, ISTOLOGICO, ULTRASTRUTTURALE
E FISILOGICO DEL RETTO ED OSSERVAZIONI ETOLOGICHE
IN RELAZIONE ALLA POSSIBILE PRODUZIONE DI FEROMONI
SESSUALI NEL MASCHIO DI *DACUS OLEAE* GMEL. (**)

INTRODUZIONE

La produzione e la conservazione di feromoni sessuali in ghiandole associate all'ampolla rettale è stata messa in luce per la prima volta da FLETCHER (1968) nel maschio di *Dacus tryoni* (Froggatt).

Secondo i reperti di questo Studioso (1968 e 1969) i maschi del *Dacus tryoni* presentano un'ampolla rettale con due diverticoli ventrali ineguali (il posteriore più piccolo e meglio differenziato), il cui epitelio è tipicamente ghiandolare negli esemplari neosfarfallati, ma in quelli sessualmente maturi rimane tale solamente nel diverticolo posteriore (« sacco secretorio »), mentre regredisce a semplice epitelio pavimentoso nel diverticolo anteriore che pertanto assume nome e funzione di serbatoio. Nei maschi sessualmente maturi il « sacco secretorio » ed il « serbatoio » contengono goccioline di una « sostanza vischiosa » di colore bruno-giallastro e di odore caratteristico che i maschi del *D. tryoni* emettono durante l'attività sessuale (al crepuscolo). La medesima sostanza, assorbita in dischi di carta bibula, attira ed eccita vivamente le femmine vergini sessualmente mature del *D. tryoni* al crepuscolo (ora in cui le medesime sono sensibili al richiamo sessuale), mentre non ha alcun effetto sulle femmine accoppiate e pertanto sessualmente non recettive. Detta sostanza evidentemente contiene uno o più feromoni di attrazione e di eccitazione ses-

(*) DE MARZO ha svolto la parte riguardante: fissazione, inclusione, allestimento preparati istologici (per il microscopio ottico e per l'elettronico), allestimento e cura degli allevamenti di *D. oleae*, costruzione dell'olfattometro semioriginale; ha contribuito alla discussione ed alla revisione critica del testo. NUZZACI ha realizzato la documentazione elettronica-micrografica, ha contribuito all'interpretazione, alla discussione ed alla revisione critica del testo. SOLINAS ha ideato ed organizzato il lavoro, ha svolto personalmente le indagini, ha realizzato la stesura del testo.

(**) Lavoro eseguito col contributo finanziario del C.N.R. (Contributo n. 76/0624 assegnato al prof. M. SOLINAS per il 1976).

suale. All'esame gas cromatografico essa mostra la presenza di composti volatili (presumibilmente la frazione attiva) insieme con altri a bassa volatilità (presumibilmente veicoli, « carriers »).

SCHULTZ e BUSH (1971), sulla base di osservazioni puramente anatomiche ed istologiche, ipotizzano una situazione analoga a quella descritta per *Dacus tryoni* anche per *Dacus dorsalis* Hendel, *D. curcubitae* Coquillet e *Dacus oleae* Gmel.

Anche ECONOMOPOULOS, GIANNAKAKIS, TZANAKAKIS e VOYADJOGLOU (1971) trovano nell'ampolla rettale del maschio di *D. oleae* strutture ghiandolari simili a quelle descritte per il *D. tryoni*, ma con qualche differenza, nel senso che in *D. oleae* mancherebbe un « serbatoio » differenziato e l'epitelio ghiandolare interesserebbe, oltre che il « sacco secretorio », anche una regione più o meno estesa delle adiacenti pareti ventrale e laterali dell'ampolla. Questi Autori notano nel retto dei maschi di *Dacus oleae* (ed anche nelle femmine) sessualmente maturi la presenza di goccioline di una « sostanza oleosa », analogamente a quanto osservato da FLETCHER in *D. tryoni*, ma, diversamente da questo, il contenuto delle ampolle rettali, estratto in diverse ore della giornata (fino al crepuscolo), non presenterebbe il caratteristico odore che i maschi del *D. oleae* emettono durante l'attività sessuale, né detta sostanza oleosa, assorbita in dischi di carta bibula, sarebbe in grado di attirare e di stimolare le femmine vergini sessualmente mature della stessa specie. Viene anche sottolineato il fatto che i maschi di *Dacus oleae* non sarebbero in grado di riconoscere l'altro sesso se non all'atto del tentativo di introdurre il fallo. ECONOMOPOULOS e Coll. (l.c.) affermano che in *D. oleae* esiste una certa coincidenza tra emissione di odore caratteristico al crepuscolo, presenza di goccioline oleose nel retto e maturità sessuale, e concludono il citato lavoro lasciando aperto il discorso su tre punti: *a*) se l'odore emesso dai maschi (come anche quello emesso dalle femmine) durante l'attività sessuale abbia funzione di feromone; *b*) se questo odore abbia a che fare con la « sostanza oleosa » dell'ampolla rettale; *c*) se sia quest'ultima la sede di produzione di detta sostanza e dei prodotti che infine generano l'odore (o meglio gli odori) in questione.

HANIOTAKIS (1974 e 1977) afferma, in base ad osservazioni etologiche di laboratorio e di campo, che nel *D. oleae* esercitano attrazione sessuale (al crepuscolo) soprattutto, se non esclusivamente, le femmine. Lo stesso Autore aggiunge inoltre che le femmine del *Dacus oleae*, in seguito alla copula, perdono la capacità di attirare i maschi, ma la riacquistano (in laboratorio) dopo 7 giorni circa.

HANIOTAKIS, MAZOMENOS e TUMLINSON (1977) dimostrano infine che le femmine del *D. oleae* producono ed emettono un feromone (chimicamente da

definire) di attrazione sessuale, analogamente a quanto avviene, secondo FLETCHER (l.c.), nei maschi del *D. tryoni*.

Sembra dunque di poter concludere che l'incontro tra i sessi nel *D. oleae* sia determinato, almeno in larga misura⁽¹⁾, da richiami olfattivi emessi dai maschi e dalle femmine, ma soprattutto da queste, durante le ore (al crepuscolo) in cui si svolge in natura l'attività sessuale della specie. Rimane però la difficoltà di conciliare i reperti anatomici ed istologici di SCHULTZ e BUSH (l.c.) e di ECONOMOPOULOS, GIANNAKAKIS, TZANAKAKIS e VOYADJOGLOU (l.c.) con le osservazioni etologiche di questi ultimi e soprattutto con quelle di HANIOTAKIS (l.c.) e di HANIOTAKIS, MAZOMENOS e TUMLINSON (l.c.). Quale ruolo avrebbero le sopra menzionate strutture ghiandolari rettali del maschio del *Dacus oleae*? Al fine di trovare una risposta a questo interrogativo, come pure a quelli lasciati aperti da ECONOMOPOULOS e Coll. (l.c.), abbiamo intrapreso questo lavoro di anatomia, istologia, ultrastruttura e fisiologia del retto del maschio di *D. oleae*, unitamente ad osservazioni etologiche complementari, condotte comparativamente su maschi neosfarfallati e su altri sessualmente maturi, prima e dopo la copula.

MATERIALI E METODI

Il materiale oggetto di studio era costituito da adulti di *Dacus oleae* sfarfallati in laboratorio da olive infestate, raccolte su piante circostanti la Facoltà di Agraria nel mese di settembre, e da pupari raccolti a terra nei frantoi della zona di Bari nei mesi di novembre, dicembre, gennaio e febbraio.

Le osservazioni sui maschi neosfarfallati venivano effettuate utilizzando esemplari appena usciti dal pupario ed ancora col tegumento poco consistente e scarsamente pigmentato.

Per le prove successive, gli adulti del *Dacus* venivano raccolti allo sfarfallamento e tenuti in vita, separati per sesso e per data di nascita, in gabbie (fig. 1) parallelepipedo (cm 30 x 30 x 60), fatte con scheletro di legno, pareti laterali (apribili) di vetro, fondo e copertura di rete metallica verniciata, in condizioni ambientali di laboratorio (23-25°C, con rare punte minime di 16°C e massime di 28°C; 50-60% di umidità relativa; luce naturale proveniente da un'ampia finestra esposta ad ovest), alimentati con poltiglia di miele ed idrolizzato enzimatico di lievito di birra; l'acqua era fornita a parte.

(¹) Tenuto conto che esiste anche un richiamo sessuale acustico emesso dai maschi mediante sfregamento delle ali su due ciuffi di setole disposte a pettine ai lati del 3° tergite (FERON, 1960; FERON e ANDRIEU, 1962).

Le prove fondamentali consistevano in osservazioni *in toto* ed attraverso sezioni istologiche degli organi considerati, effettuate su maschi:

- a) vergini, neosfarfallati;
- b) vergini, di 7 giorni di età;
- c) vergini, di 16 giorni di età;
- d) di 16 giorni di età, sacrificati 12 ore circa dopo il primo accoppiamento;
- e) vergini, di 28 giorni di età.

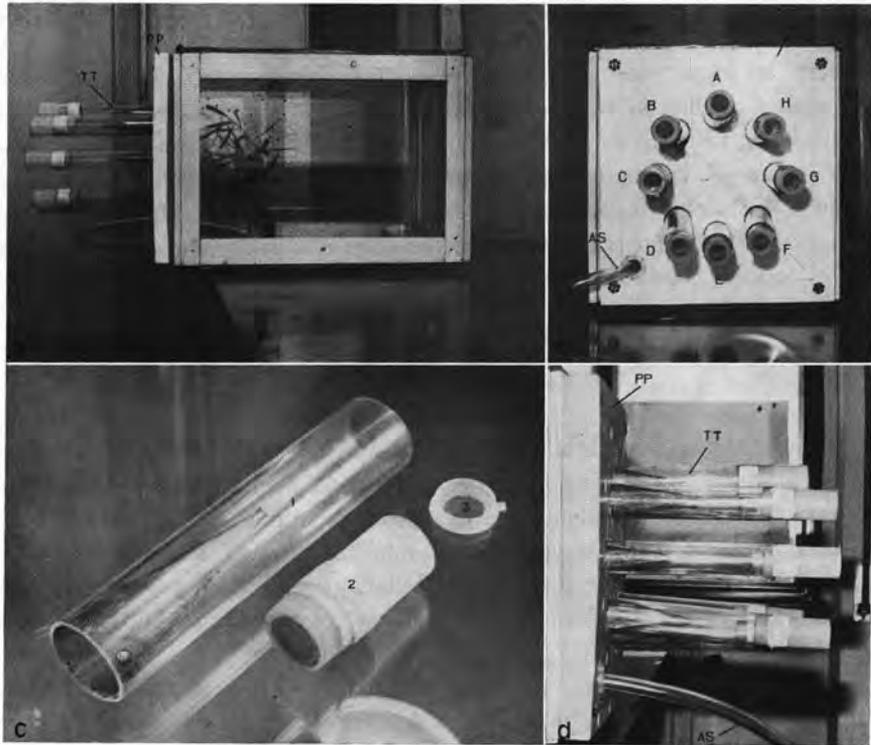


Fig. 1 - a) Gabbia olfattometro per *Dacus oleae* Gmel. vista dal lato da cui proviene la luce; b) particolare della precedente vista dal lato dei tubi-trappola; c) tubo-trappola smontato; d) stesso particolare di b), visto di fianco. AS, tubo aspirante aria dalla gabbia; PP, parete di polistirolo espanso; A, B, C, ... H, TT, tubi-trappola; 1, trappola; 2, contenitore esca; 3, chiusura esterna (distale).

Le osservazioni *in toto* venivano 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

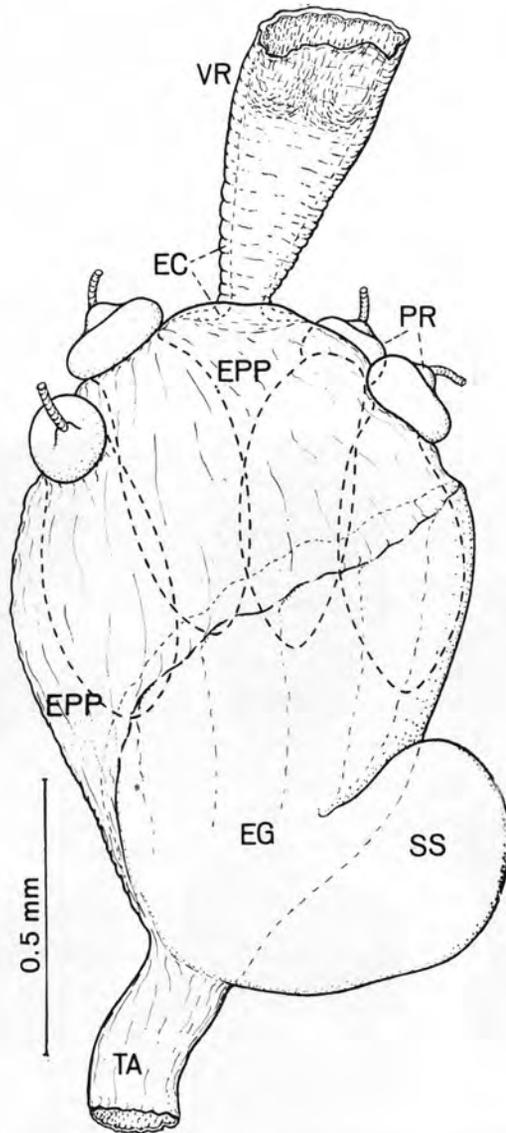


Fig. 2 - Retto del maschio di *Dacus oleae* Gmel., visto dal lato destro (disegno semi-schematico, eseguito alla camera lucida).

in soluzioni crescenti (25÷100%) di Etanolo, passati in Xilolo, ed inclusi in Balsamo del Canada.

Lo studio istologico al microscopio ottico (Fotomicroscopio Zeiss III) è stato condotto su sezioni semifini (1 μ m) colorate con 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 ampolle rettali, prelevate da maschi dissecati a freddo (temperatura del ghiaccio fondente) in Glutaraldeide 4% in tampone fosfato 0,1 M a pH 7,2, venivano fissate per 3 ore in dette condizioni; sempre a freddo, venivano successivamente lavate per una notte nel medesimo tampone con aggiunta di 5% di Saccarosio,

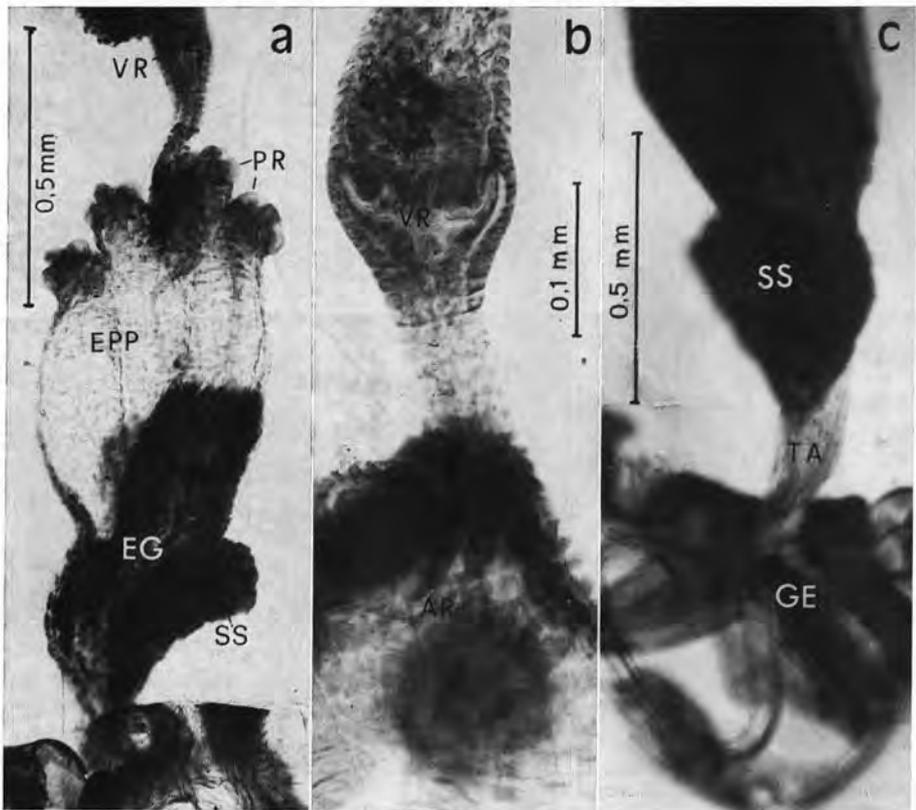


Fig. 3 - Preparati *in toto* da un esemplare sessualmente maturo, fissati e colorati col metodo May-Grünwald-Giemsa, ripresi al fotomicroscopio in campo chiaro: a) retto, visto dal lato destro; b) particolare anteriore con valvola rettale; c) particolare posteriore con tubo anale e genitali esterni, visti dal ventre.

postfissate in Osmio tetrossido 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 (300-500 Å) ottenute all'ultramicrotomo LKB III, raccolte su griglie di rame

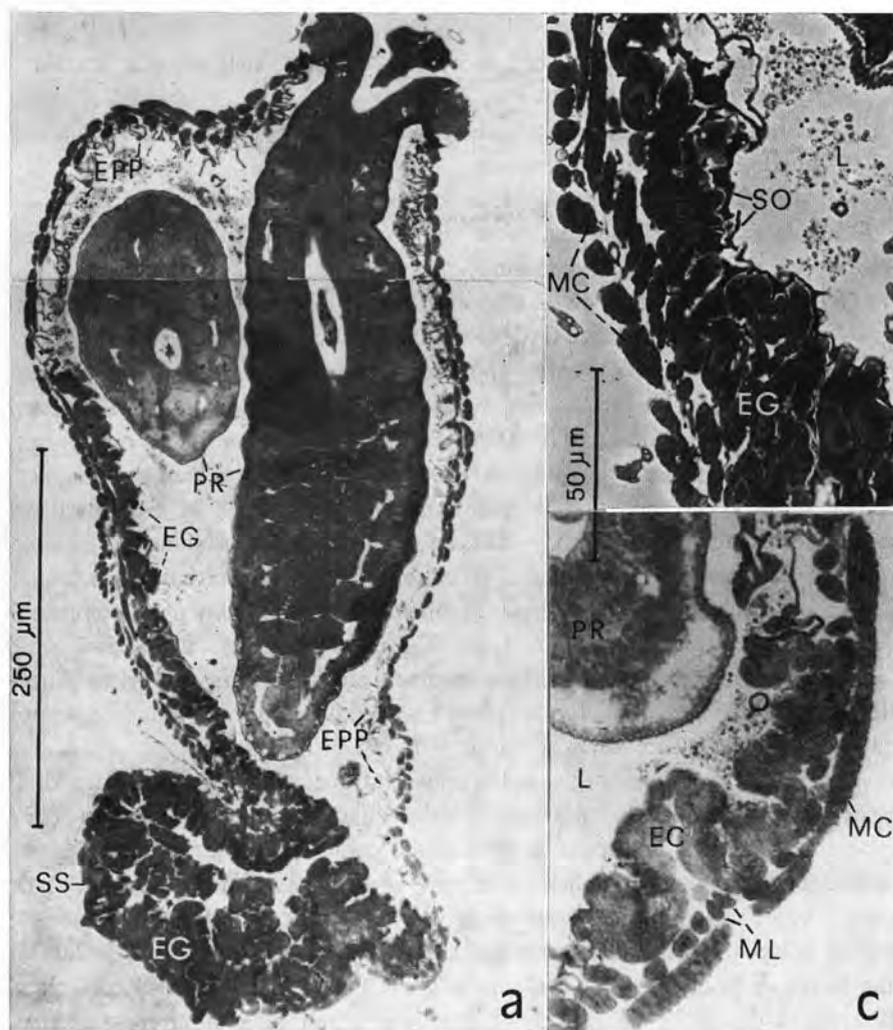


Fig. 4 - Ampolla rettale di maschio neofarfallato. a) sezione sagittale (submediana), vista dal lato sinistro; b) particolare della precedente, appena innanzi al « sacco secretorio », ripreso in contrasto di fase e mostrante l'epitelio ghiandolare ricoperto della « sostanza oleosa » a mo' di vernice; c) particolare anteriore dell'ampolla, in sezione trasversale, mostrante l'epitelio tipico del colon (b e c sono ugualmente ingranditi).

e contrastate con Uranile acetato e Piombo citrato, venivano osservate e riprese al microscopio elettronico Hitachi tipo HU II B, gentilmente messo a disposizione dall'Istituto di Patologia Vegetale dell'Università di Bari.

Parallelamente ed a complemento di dette prove si facevano osservazioni anatomiche, fisiologiche ed etologiche in relazione alla:

- 1) maturità ed attività sessuale dei maschi (sia in assenza, che in presenza di femmine, coetanee);
- 2) presenza e quantità di « sostanza oleosa » nell'ampolla rettale dei maschi;
- 3) emissione di odore caratteristico da parte dei maschi, particolarmente nelle ore di attività sessuale;
- 4) associazione o meno di detto odore alla « sostanza oleosa »;
- 5) attrazione sessuale da parte dei maschi nei confronti delle femmine vergini sessualmente mature;
- 6) potere attrattivo delle ampolle rettali maschili contenenti « sostanza oleosa », nei confronti delle femmine sessualmente recettive.

La maturità sessuale veniva appurata in base al comportamento etologico ed (a posteriori, ovviamente) allo sviluppo delle ghiandole genitali accessorie, per i maschi (DE MARZO, NUZZACI, SOLINAS, 1976), e degli ovari, per le femmine. La presenza e la quantità di « sostanza oleosa » nell'ampolla rettale veniva rilevata direttamente al microscopio stereoscopico in esemplari uccisi per congelamento in freezer a -20°C ⁽²⁾ e poi dissecati in soluzione fisiologica o in acqua *fontis*. L'emissione dell'odore sessuale caratteristico era saggiata fiutando direttamente nelle gabbie di allevamento dei maschi e, comparativamente, in quelle corrispondenti (per età) delle femmine. L'associazione dell'« odore sessuale » maschile alla « sostanza oleosa » veniva saggiata fiutando direttamente le singole ampolle rettali, appena estratte e quindi spappolate tra il pollice e l'indice di una mano.

Le prove di attrazione sessuale erano fatte durante le ultime ore di luce naturale, impiegando un olfattometro del tipo descritto da NATION (1975), opportunamente modificato, ossia utilizzando come olfattometro (fig. 1) le stesse gabbie di allevamento contenenti femmine vergini sessualmente mature. A dette gabbie veniva temporaneamente sostituito il vetro di una delle due pareti laterali (disposte perpendicolarmente alla finestra da cui proveniva la luce) con una lastra di polistirolo espanso, nella quale erano stati aperti 8 fori circolari di 3 cm di diametro, distribuiti ad intervalli uguali lungo una circonferenza di

⁽²⁾ Questo metodo era necessario per evitare con certezza che i maschi, appena afferrati, si liberassero del contenuto rettale (compresa la « sostanza oleosa » eventualmente presente), come spesso avviene manipolando esemplari vivi non anestetizzati.

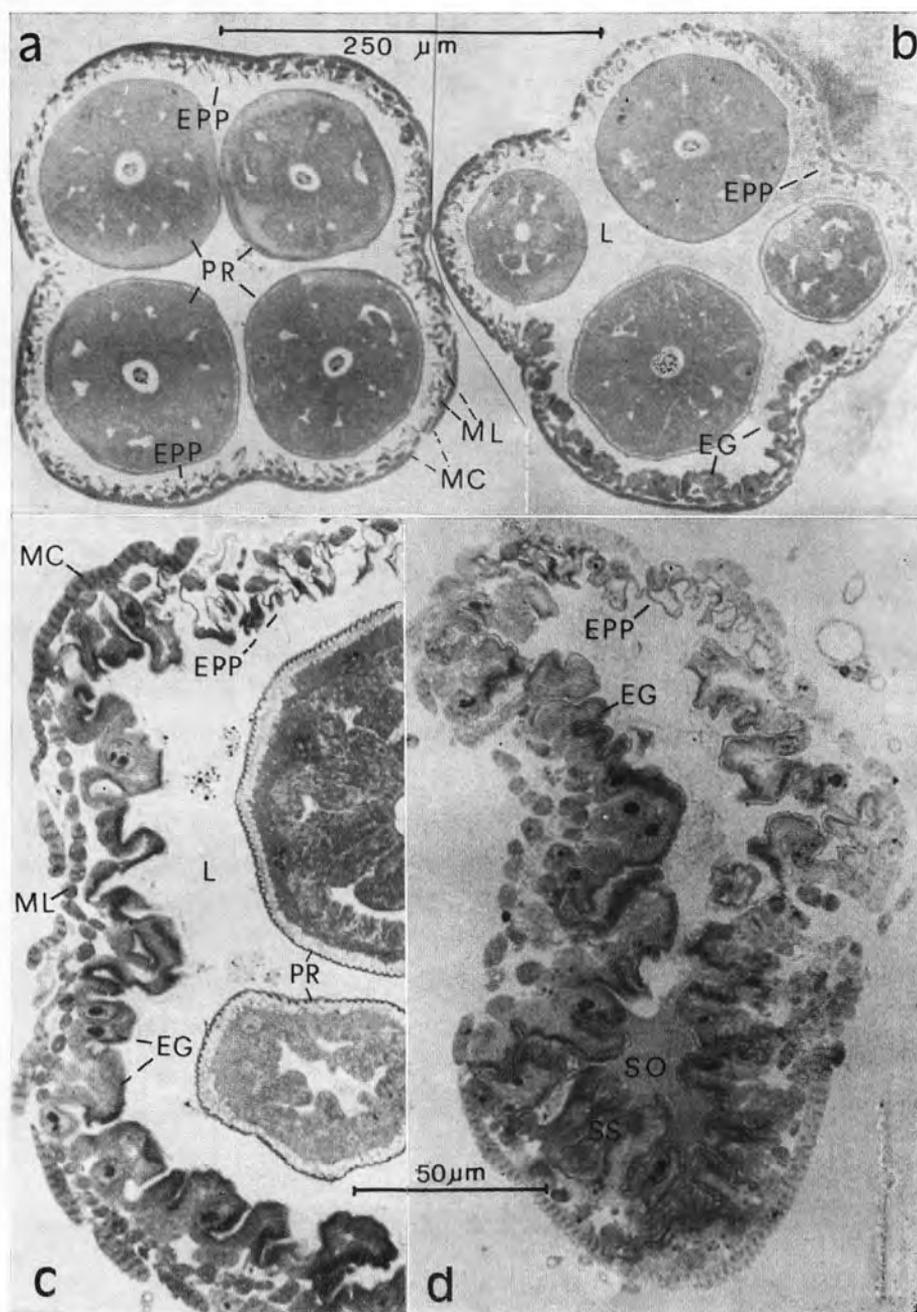
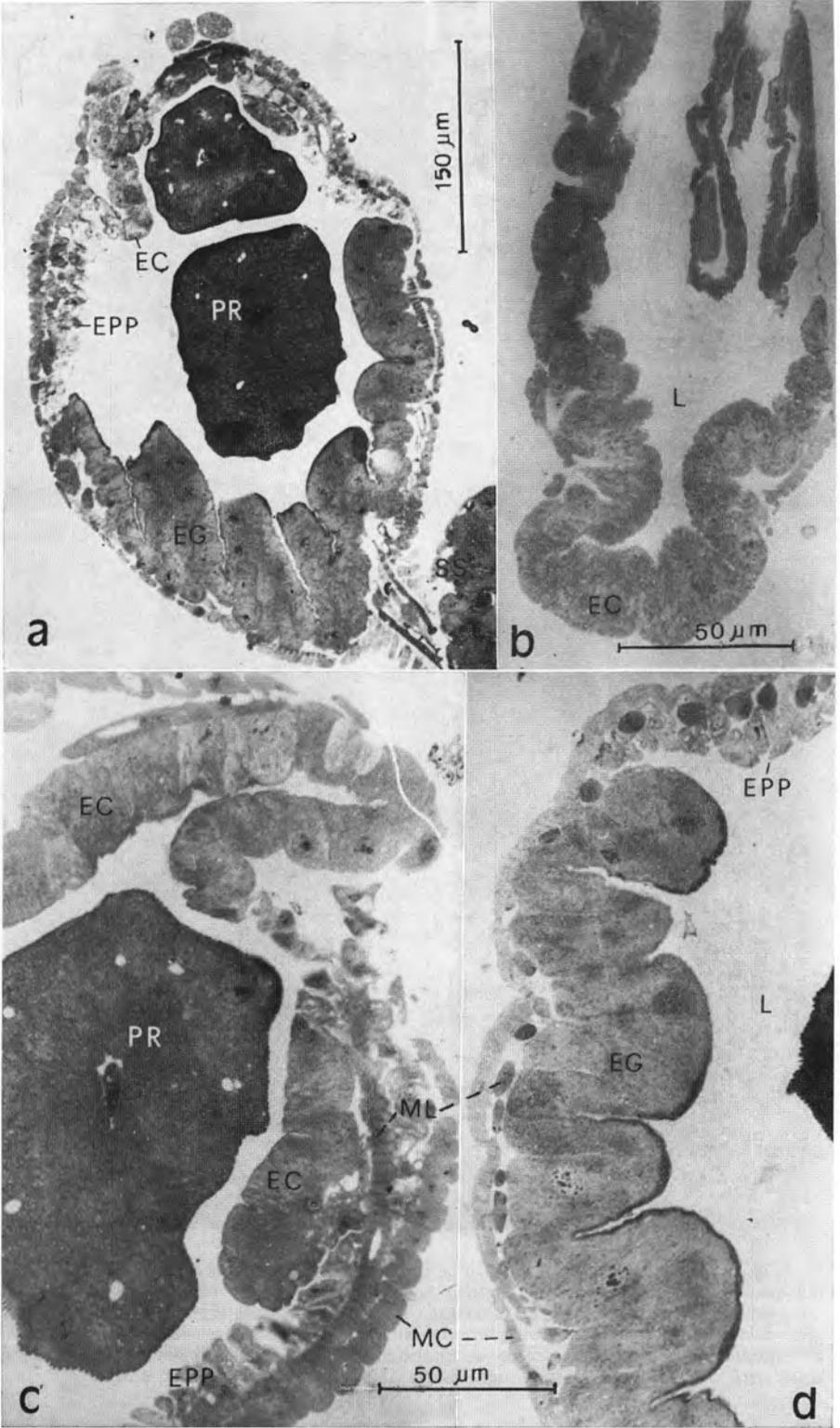


Fig. 5 - Sezioni trasversali dell'ampolla rettale di maschio neosfarfallato: a) effettuata nel quarto anteriore e mostrante epitelio unicamente di tipo pavimentoso; b) effettuata nel terzo anteriore e mostrante ventralmente (lato inferiore della figura) l'inizio dell'epitelio ghiandolare; c) particolare, a maggiore ingrandimento, di sezione analoga alla precedente; d) effettuata alla base del «sacco secretorio», nel quale inizia appena a raccogliersi la «sostanza oleosa» (a e b sono ugualmente ingrandite; così anche c e d).



16 cm di diametro. In ciascuno di detti fori veniva inserita una trappola formata da un tubo cilindrico trasparente di materiale plastico, lungo 20 cm, aperto verso la gabbia (ed ivi provvisto internamente di una valvola ad imbuto di rete di ottone, onde consentire il passaggio delle mosche solamente in uscita dalla gabbia), e chiuso all'altra estremità (a mo' di tappo) da un cilindro (porta esca) più piccolo (di polietilene), avente le due basi di rete metallica (onde lasciare libero il passaggio dell'aria e di eventuali odori), delle quali una apribile per consentire l'introduzione dell'esca.

Durante queste prove, chiusi ermeticamente fondo e soffitto della gabbia-olfattometro con fogli di polietilene, veniva fatta entrare in quest'ultima, solamente attraverso le 8 trappole, una corrente d'aria moderata e continua mediante applicazione di una pompa aspirante, il cui tubo di collegamento (schermato a monte con rete metallica per evitare che venissero aspirate mosche) era collocato nella gabbia vicino alla parete opposta a quella delle trappole, onde ottenere la migliore diffusione nella gabbia medesima dell'aria e degli eventuali odori provenienti dalle trappole.

Per ogni prova, delle 8 trappole disponibili nell'olfattometro (contrassegnate con le lettere A, B, . . . , H, partendo dalla prima superiore e ruotando verso la finestra da cui proveniva la luce) una o più (fino a 3) venivano innestate col materiale da saggiare, mentre le rimanenti servivano tutte da testimoni.

Il materiale saggiato come attrattivo sessuale, nei confronti delle femmine vergini sessualmente mature (presumibilmente, in base all'età) del *Dacus oleae* contenute nella gabbia-olfattometro, in numero di 150-250 per ogni prova, era costituito da:

- I - maschi vergini sessualmente immaturi (neosfarfallati, in numero di 20 circa per trappola);
- II - maschi vergini sessualmente maturi (10-20 giorni di età; in numero di 20 circa per trappola);
- III - maschi vergini sessualmente maturi (10-20 giorni di età; in numero di 20 circa per trappola), separati verso la gabbia da un sottile diaframma di polietilene, applicato al fondo del cilindro porta-esca, in modo da bloccare il passaggio degli odori, ma non la trasmissione del noto richiamo sessuale acustico;

Fig. 6 - Ampolla rettale di maschio vergine di 7 giorni di età: a) sezione frontale (subventrale); b) sezione longitudinale (inferiormente obliqua) dell'ultimo tratto del colon; c) particolare, a maggiore ingrandimento, di sezione analoga alla prima (a), mostrante l'estendersi all'imboccatura dell'ampolla, dell'epitelio tipico del colon; d) sezione trasversale effettuata nel terzo anteriore dell'ampolla; particolare mostrante l'inizio dell'epitelio glandolare (b, c e d, ugualmente ingrandite).

- IV - maschi vergini sessualmente maturi (10-20 giorni di età; in numero di 20 circa per trappola), privati delle ali (« dealati ») onde bloccare l'emissione del richiamo sessuale acustico, ma non la diffusione dell'eventuale richiamo olfattivo;
- V - ampolle rettali (30 circa per ogni prova) estratte da maschi vergini sessualmente maturi (uccisi per congelamento nelle ore di attività sessuale, appena prima della prova) e schiacciate direttamente su un disco (di 5,5 cm di diametro) di carta da filtro.

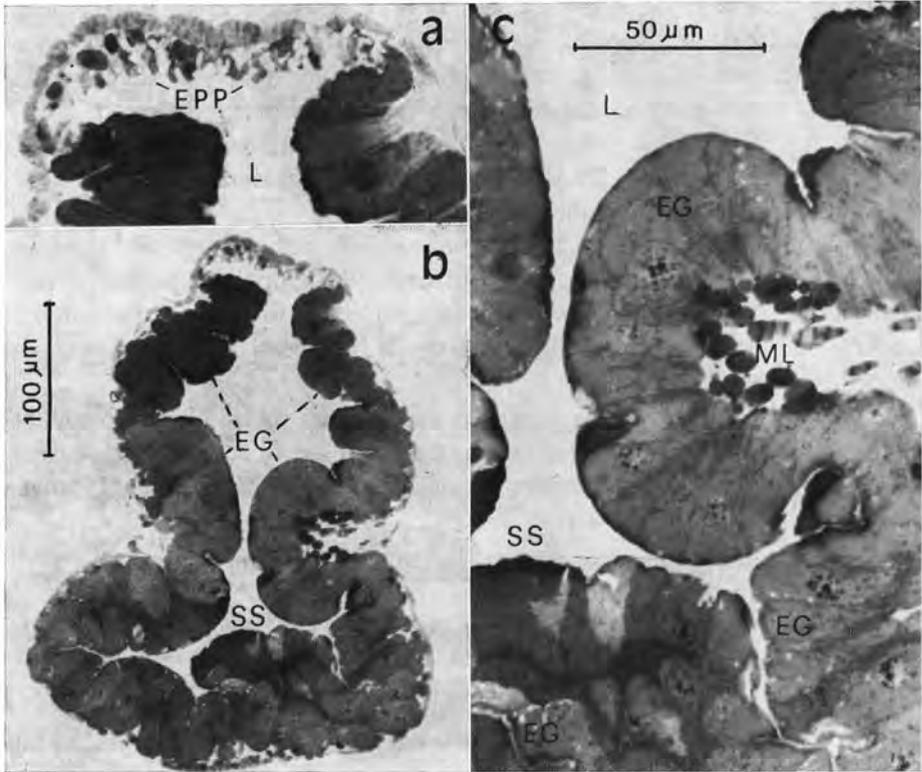


Fig. 7 - Ampolla rettale di maschio vergine di 16 giorni di età: b) sezione trasversale all'altezza del « sacco secretorio »; a) particolare dorsale della precedente, a maggiore ingrandimento; c) particolare, allo stesso ingrandimento del precedente, mostrandone l'ingresso del « sacco secretorio ».

Quando non è indicato diversamente nella didascalia, le figure relative allo studio istologico al microscopio ottico (figg. 3÷9) si riferiscono a sezioni semifini riprese in campo chiaro; le figure relative allo studio ultrastrutturale

(figg. 10 ÷ 40) rappresentano una parte scelta della documentazione elettronmicrografica, realizzata coi materiali e metodi sopra menzionati.

Il significato dei simboli riportati nelle figure è il seguente:

A, banda anisotropa	fologicamente simili a lipidi
AR, ampolla rettale	M, mitocondri
AS, assoni	MA, membrana plasmatica apicale
C, connettivi	MB, membrana plasmatica basale
CC, confini cellulari	MC, muscoli circolari
CL, citolisoma (<i>sensu</i> DE DUVE e WATTIAUX, 1966)	ML, muscoli longitudinali
D, diade	MN, membrana nucleare
DE, desmosomi	MT, microtubuli
DS, giunzioni serrate con desmosomi settati	N, nucleo
E, emocele	NL, nucleolo
EC, epitelio tipico del colon	NR, nervo
ED, emidesmosomi	NT, neurotubuli
EG, epitelio ghiandolare	PN, pori nucleari annulati
EN, endocuticola	PR, papille rettali
EP, epicuticola	PT, membrana peritrofica
EPP, epitelio pavimentoso	R, ribosomi
ER, ergastoplasma	RE, reticolo endoplasmico liscio
ET, elementi tubolari	RS, reticolo sarcoplasmico
G, complesso di Golgi	S, sinapsi neuromuscolare
GE, genitali esterni	SE, spazio extracellulare
GL, glicogeno	SO, sostanza oleosa
GO, giunzioni occludenti (<i>zonulae occludentes</i>)	SP, spazio perinucleare
H, banda omonima	SR, sarcolemma
I, banda isotropa	SS, sacco secretorio (<i>sensu</i> FLET- CHER, 1968)
IA, introflessioni della membrana plasmatica apicale	T, tubuli del sistema trasverso
IB, introflessioni della membrana plasmatica basale	TA, tubo anale
IN, intima	TD, triade
L, lume intestinale	TR, tracheola
LB, lamina basale	US, urosferiti
LM, lemnoblasti	VN, vescicole contenenti neurose- creto
LP, vacuoli contenenti sostanze mor-	VP, vescicole micropinocitiche
	VR, valvola rettale
	Z, disco z

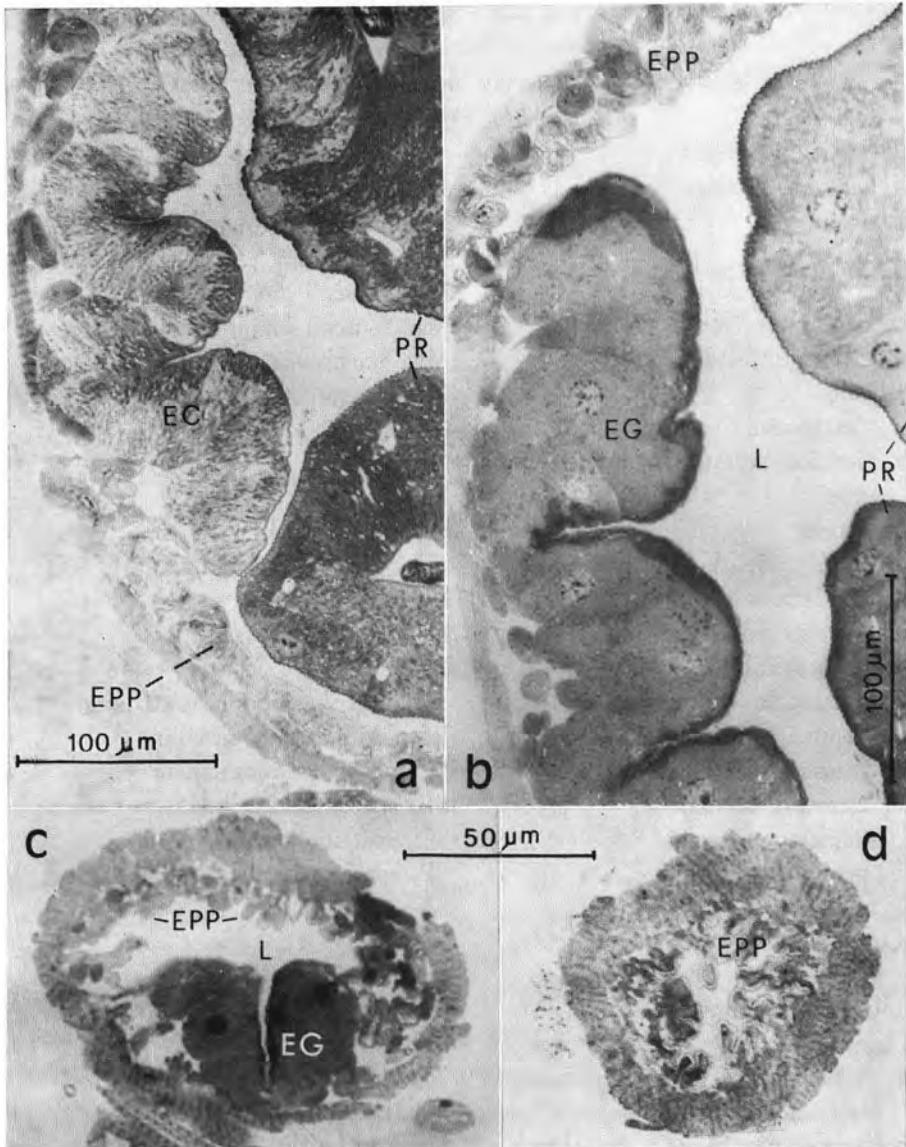


Fig. 8 - Sezioni trasversali del retto di maschio di 16 giorni di età, sacrificato 12 ore dopo il primo accoppiamento: a) effettuata all'imboccatura dell'ampolla rettale e mostrante l'epitelio tipico del colon; b) effettuata all'altezza del terzo anteriore dell'ampolla e mostrante l'inizio dell'epitelio ghiandolare; c) effettuata all'imbocco del tubo anale e mostrante (ventralmente) un residuo o prolungamento posteriore dell'epitelio ghiandolare; d) effettuata un po' più caudalmente della c. (a, b, c, e, d, tutte ugualmente ingrandite).

RISULTATI

Anatomia ed organizzazione funzionale del retto

Il proctodeo del maschio di *Dacus oleae* presenta un tratto anteriore tubolare e pressoché isodiametrico, comprendente ileo e colon tra loro indistinti, ed un tratto posteriore, il retto (figg. 2 e 3a), anteriormente ben delimitato (fig. 3) da una valvola rettale e comprendente una cospicua ampolla rettale ed un modesto tubo anale.

La *valvola rettale* (fig. 3b) è formata da una serie di pieghe dell'epitelio del colon, il quale epitelio va oltre detta valvola e si estende nell'ampolla rettale fino a rivestirne l'imboccatura anteriore. Dette pieghe epiteliali sporgono notevolmente nel lume intestinale e vengono facilmente a reciproco contatto per azione di potenti muscoli circolari che, contraendosi, chiudono la valvola ermeticamente.

L'*ampolla rettale* (figg. 2 e 3a) ha l'aspetto di un sacco di forma molto variabile (in relazione al grado di contrazione della tunica muscolare nelle diverse parti dell'ampolla), recante ventralmente in prossimità dell'apice una estroflessione globosa più o meno ampia, corrispondente al « sacco secretorio » di FLETCHER (l.c.).

In corrispondenza del quarto anteriore dell'ampolla rettale si elevano internamente quattro papille rettali villiformi⁽³⁾ che (nella maggioranza dei casi) occupano gran parte della metà anteriore del volume dell'ampolla.

Quest'ultima, osservata *in toto* allo stato fresco in soluzione fisiologica, mostra al microscopio la parete del terzo anteriore (talora fino alla metà ed oltre) e di una striscia dorsale mediana e posteriore (che giunge fino al tubo anale) notevolmente più sottile e trasparente rispetto al resto dell'organo. Preparati *in toto* fissati e colorati col metodo May-Grünwald-Giemsa mostrano chiaramente (fig. 3a) che il maggior spessore delle pareti posteriore (compreso il « sacco secretorio ») e ventrale e laterali mediane dell'ampolla è dovuto allo sviluppo in altezza delle cellule epiteliali.

Nei medesimi preparati *in toto* si vede bene, anche al microscopio stereoscopico, la potente tunica muscolare che avvolge quasi interamente (ad eccezione della base delle papille rettali) l'ampolla. In organi vivi in soluzione fisiologica si possono osservare, al microscopio, movimenti peristaltici selettivi,

⁽³⁾ Per la struttura e la funzione di queste papille si rimanda allo studio di BACCETTI, MAZZI e MASSIMELLO (1963).

ossia che interessano solamente la parte anteriore e dorsale dell'ampolla, oppure solamente il « sacco secretorio » ed i territori ad esso circostanti dell'ampolla medesima.

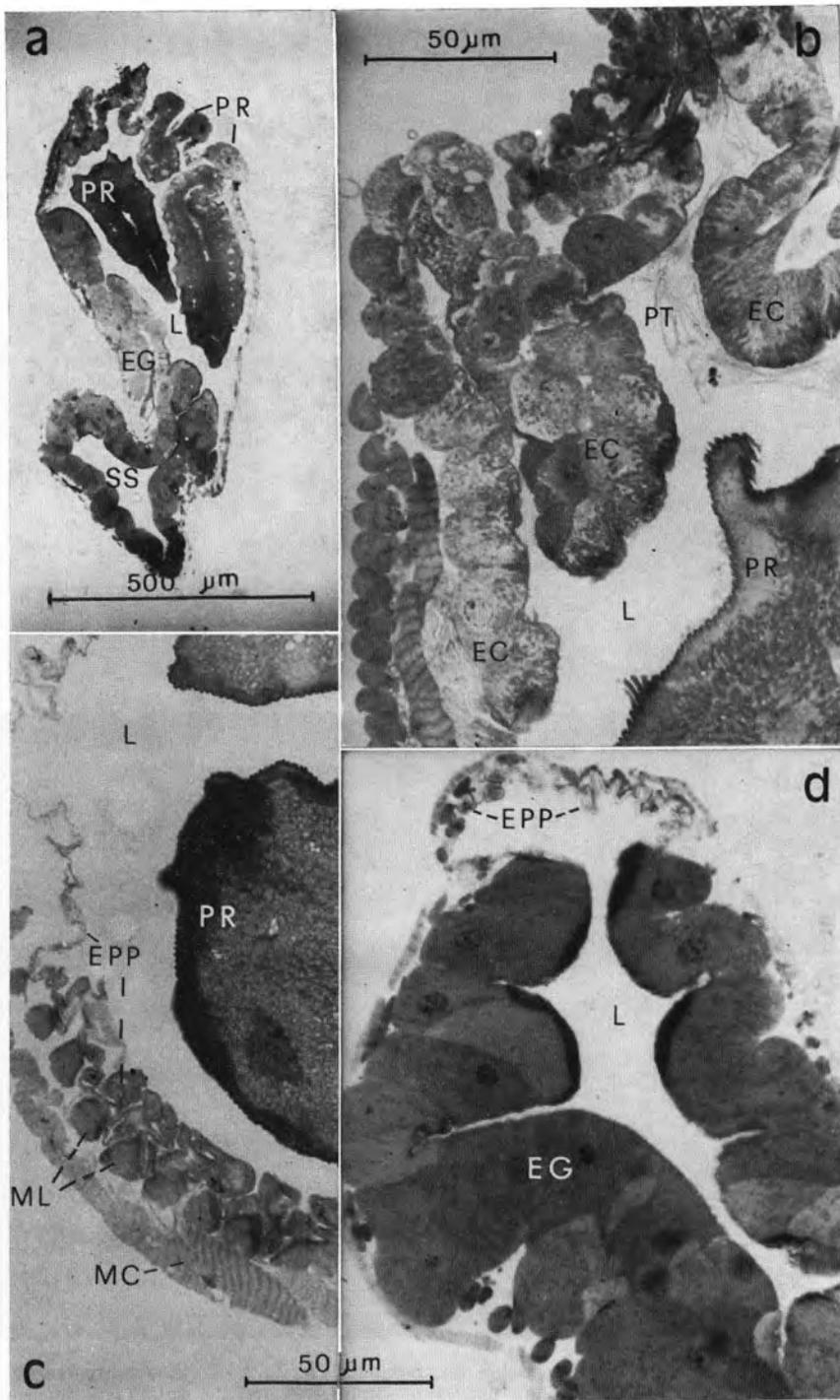
Il *tubo anale* è relativamente breve (fig. 3c) e quasi isodiametrico. Nei preparati *in toto*, sia freschi che fissati e colorati col metodo May-Grünwald-Giemsa, esso mostra le pareti strutturalmente simili a quelle del terzo anteriore e della striscia dorsale dell'ampolla. Anche il tubo anale è rivestito di potente tunica muscolare, facilmente visibile al microscopio stereoscopico anche in preparati freschi.

Istologia, ultrastruttura e fisiologia del retto

Come fatto generale, procedendo dall'interno verso l'esterno, si riscontra nel retto (come nel resto del proctodeo) un'intima, un epitelio, una lamina basale ed una tunica muscolare. Per quest'ultima, come pure per la lamina basale e per l'intima, si può fare un discorso unico riguardante tutto il retto; mentre per le cellule epiteliali è opportuno trattare distintamente almeno tre condizioni sostanzialmente diverse, sia sul piano morfologico che fisiologico, più una quarta di transizione tra due condizioni ben definite.

1. - La *tunica muscolare* che riveste il retto, analogamente a quella del tratto anteriore del proctodeo, è formata da uno strato esterno piuttosto serrato di fibre disposte circolarmente e da uno interno alquanto discontinuo di fibre disposte longitudinalmente (figg. 4÷9 e 13). Si tratta sempre di fibre afribillari, striate, uninucleate, tipiche dei muscoli splanchnici degli insetti. Sono rivestite da un sarcolemma che risulta alquanto sottile e regolare sulle parti libere della fibra (e su quelle adiacenti a cellule epiteliali od a nervi: figg. 12 e 15), dove si distinguono chiaramente la lamina basale e la membrana cellulare, mentre ha uno spessore maggiore e variabile in corrispondenza delle zone di contatto tra fibra e fibra, a causa dello sviluppo irregolare dello strato di connettivo (*glycocalyx*: fig. 27). Il nucleo è situato quasi sempre al centro della fibra, ha un nucleolo relativamente grosso ed è circondato da una quantità variabile di sarcoplasma particolarmente ricco di mitocondri (fig. 13a), analogamente a quanto si verifica nelle fibre del miocardio (ELDER, l.c.). I

Fig. 9 - Ampolla rettale di maschio vergine di 28 giorni di età: a) sezione sagittale (submediana), vista dal lato sinistro; b) particolare, a maggiore ingrandimento, di sezione analoga alla prima, mostrante il prolungamento dell'epitelio tipico del colon all'imboccatura dell'ampolla; c) particolare di sezione trasversale effettuata all'altezza del quarto anteriore dell'ampolla; d) particolare mediano e dorsale di sezione trasversale effettuata all'altezza del « sacco secretorio ». (b, c e d, ugualmente ingranditi).



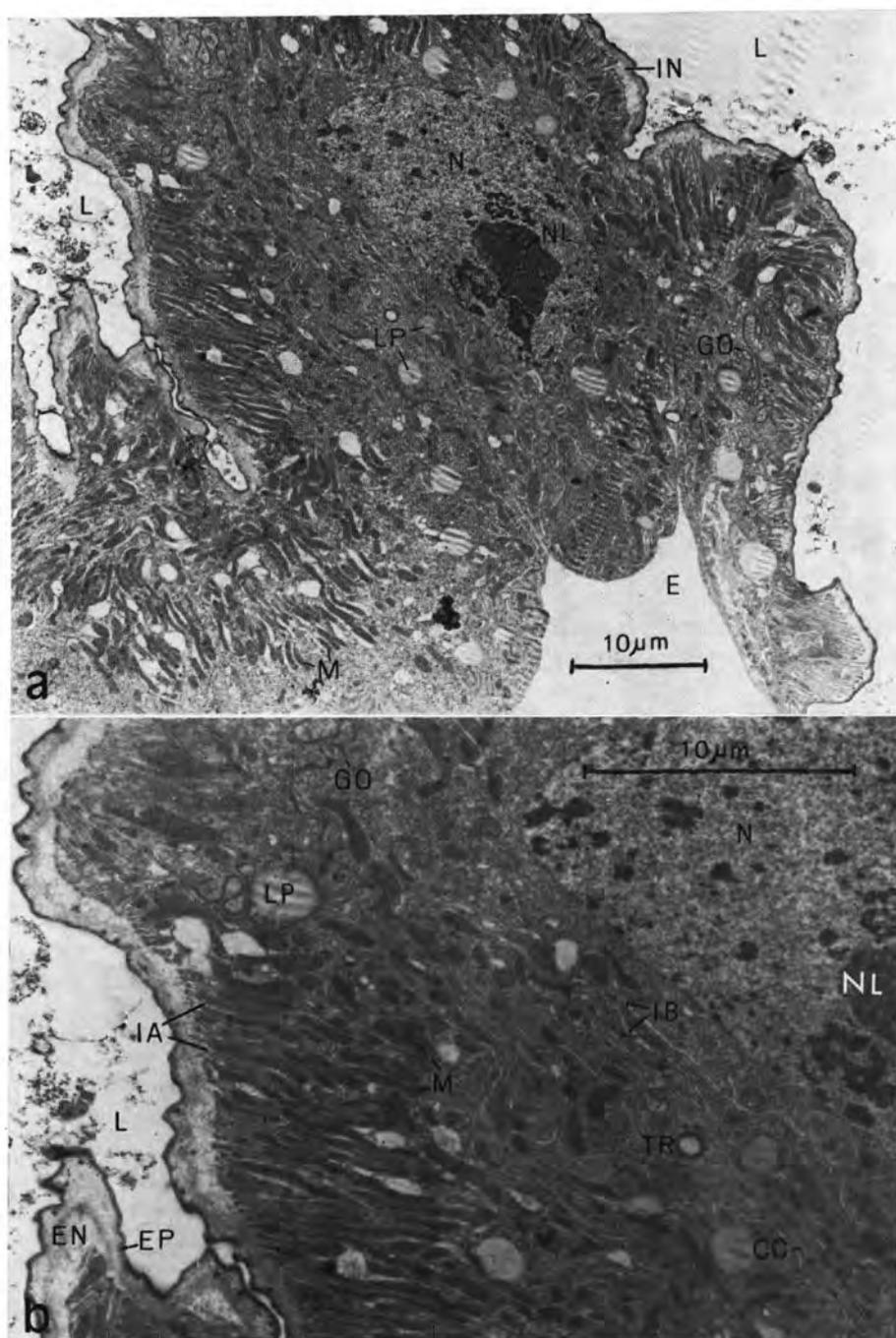


Fig. 10 - Ampolla rettale di maschio neofarfallato: a) parte di sezione trasversale effettuata all'imboccatura dell'ampolla e mostrante l'epitelio tipico del colon; b) particolare della precedente, a maggiore ingrandimento. Si vedono bene le numerose e profonde inflessioni della membrana plasmatica basale e quelle (ancor più fitte) della membrana apicale, alle quali risultano strettamente associati un gran numero di mitocondri opportunamente conformati.

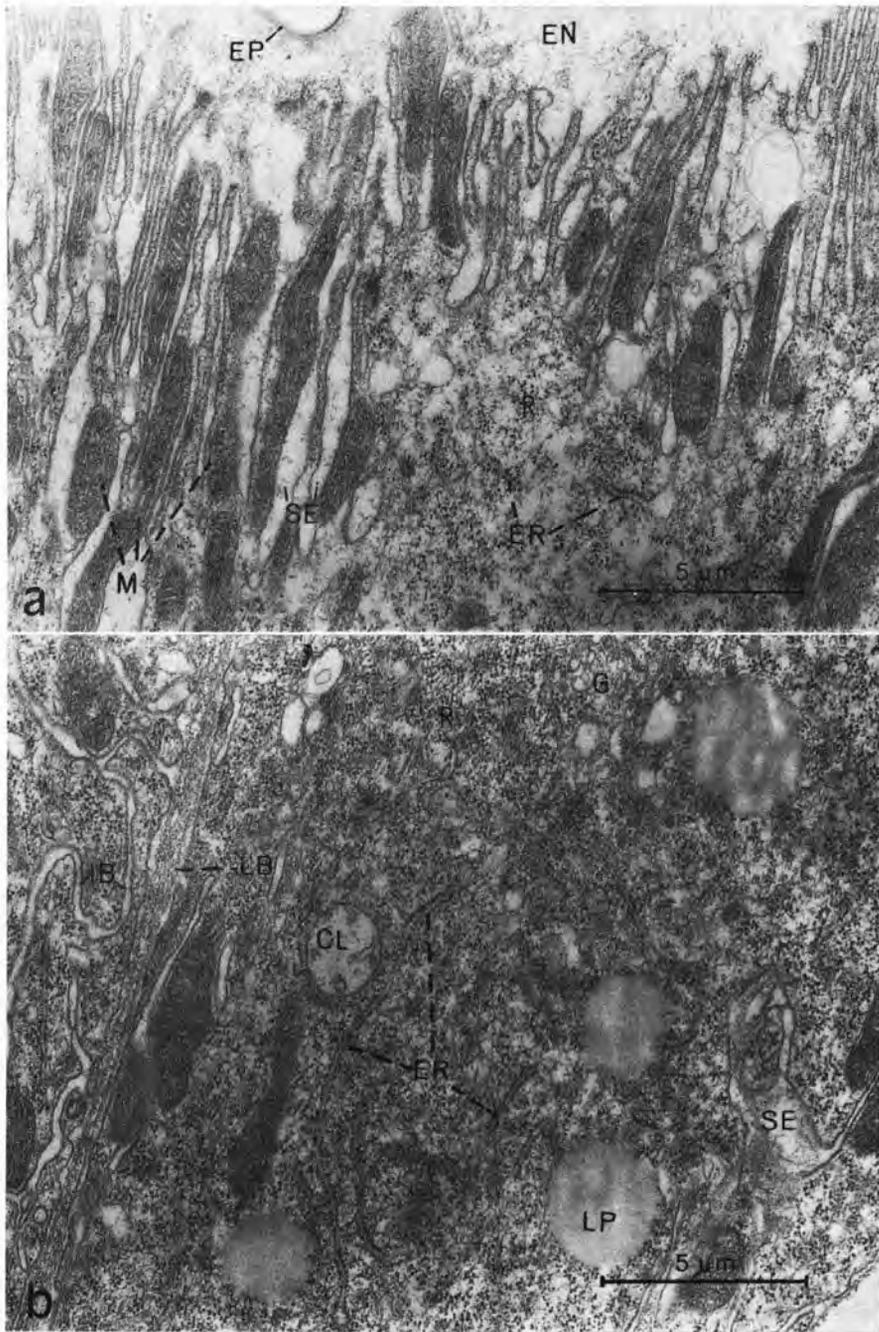


Fig. 11 - Particolare di sezione analoga alla precedente, a ingrandimento ancora maggiore. Si vedono bene: l'adattamento morfologico e l'orientamento delle creste dei mitocondri associati alle introflessioni delle membrane plasmatiche apicale (a) e basale (b); la grande abbondanza di ribosomi, sia liberi che riuniti in poliribosomi, che associati a citomembrane; i grossi vacuoli contenenti sostanze simili a lipidi.

sarcomeri sono discretamente lunghi (5 μm circa), presentano dischi Z abbastanza regolari (figg. 13 e 24) e chiaramente perforati (figg. 15 e 16): indice della supercontrattilità delle fibre in questione (RICE, 1970); mentre le bande A, I e H sono mal definite e risultano bene riconoscibili solamente nelle sezioni trasversali al microscopio elettronico (figg. 12, 15, 16, 24b e 27b). I filamenti di miosina presentano (in sezione trasversale) una disposizione esagonale più o meno irregolare e risultano circondati ciascuno da 10-12 filamenti di actina (figg. 12 e 15), disposti irregolarmente. Questi ultimi risultano spesso chiaramente collegati a desmosomi posti tra fibre adiacenti (figg. 26 e 27b). Ciò sarebbe indicativo (NAGAI e BROWN, 1969) della proprietà miogenica di contrazione posseduta da queste fibre muscolari. Benché non vi sia una vera divisione della massa di filamenti in fibrille, tuttavia si nota spesso (dove il reticolo sarcoplasmico è più sviluppato) come una tendenza alla formazione di queste (figg. 12, 15 e 26). Talvolta si riscontrano nella stessa fibra gruppi di filamenti orientati ad angolo retto (o quasi) rispetto agli altri (fig. 24a), analogamente a quanto è stato osservato nel miocardio di *Romalea* e nei muscoli tonici che controllano il volo in *Vespa* (ELDER, 1975) ed anche in muscoli lisci di Vertebrati (DEVINE e SOMLYO, 1971). Il sistema tubulare trasverso (sistema T) è abbastanza sviluppato e così anche il reticolo sarcoplasmico (RS) con le relative connessioni a diade ed a triade (figg. 12 e 15). I mitocondri (a parte quelli vicini al nucleo, sopra considerati) sono relativamente pochi ma abbastanza grossi e ben distribuiti lungo i tubuli trasversi e lungo le cisterne del reticolo sarcoplasmico (figg. 12, 15 e 21). Al modesto numero di mitocondri si aggiunge, nelle stesse fibre muscolari, una scarsissima frequenza di tracheole, a conferma del metabolismo essenzialmente anaerobico di questi muscoli. Male si accorda, però, con queste osservazioni, una notevole frequenza di grosse gocce lipidiche (almeno all'apparenza morfologica: figg. 13, 24, 26 e 27) che si riscontra nelle stesse fibre degli esemplari neosfarfallati. La tunica muscolare è servita da nervi del simpatico caudale, relativamente grossi, rivestiti di lamina basale più o meno spessa (fig. 15), recanti ciascuno fino a 4-5 assoni motori tipicamente tunicati (rivestiti di lemnoblasti), nei quali abbondano neurotubuli, mitocondri e vescicole trasparenti agli elettroni (figg. 15, 21b e 28b).

2. - La *lamina basale* che sostiene l'epitelio del retto è costituita ovunque da materiale finemente granuloso e con filamenti estremamente sottili (non periodati), ha uno spessore alquanto variabile, indipendentemente dal tipo delle cellule cui fa da supporto: di regola è più sottile dove risulta esternamente libera (figg. 11b, 15a, 17b, 22b, 23b) ed appare più o meno inspessita (e difficilmente distinguibile da altri materiali di sostegno: figg. 12, 14b, 24b, 27b) nelle zone di contatto con fibre muscolari e lungo i confini tra cellule

e cellula dell'epitelio medesimo. Precisamente, in questo caso, la lamina basale segue la membrana plasmatica basale nello spazio intercellulare che si determina a seguito della increspatura dell'epitelio rettale, per cui la faccia basale di una cellula e la medesima della cellula accanto possono contemporaneamente slittare (insieme con la lamina basale) verso il piano che divide le due cellule ed assumere, dette facce (parzialmente o totalmente), posizione laterale, una di fronte all'altra (figg. 10, 14, 21b, 26, 32b, 38, 40). La lamina basale segue spesso la membrana plasmatica basale anche nelle inflessioni (« infoldings ») che questa forma sia in corrispondenza della parte visibilmente basale della cellula, che di quelle apparentemente laterali (nel senso ora esposto).

3. - *L'intima* presenta la superficie libera notevolmente accidentata, con frequenti punte, creste, onde e pieghe di vario genere e di varia estensione

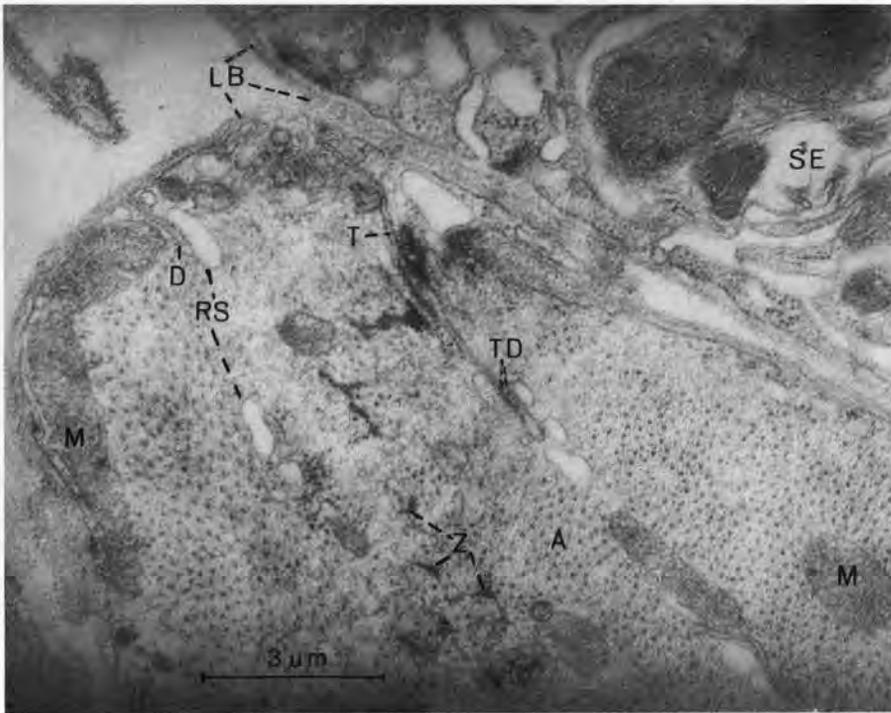


Fig. 12 - Tunica muscolare del retto di maschio vergine di 7 giorni di età. Sezione trasversale di fibra longitudinale effettuata all'altezza dell'imboccatura dell'ampolla rettale. Si notino lo sviluppo del reticolo sarcoplasmico, le cui cisterne formano spesso diadi e triadi con i tubuli trasversi, e l'elevato rapporto filamenti di actina/filamenti di miosina. In alto a destra, saldata alla fibra muscolare mediante connettivo, si vede la parte basale di una cellula dell'epitelio tipico del colon.

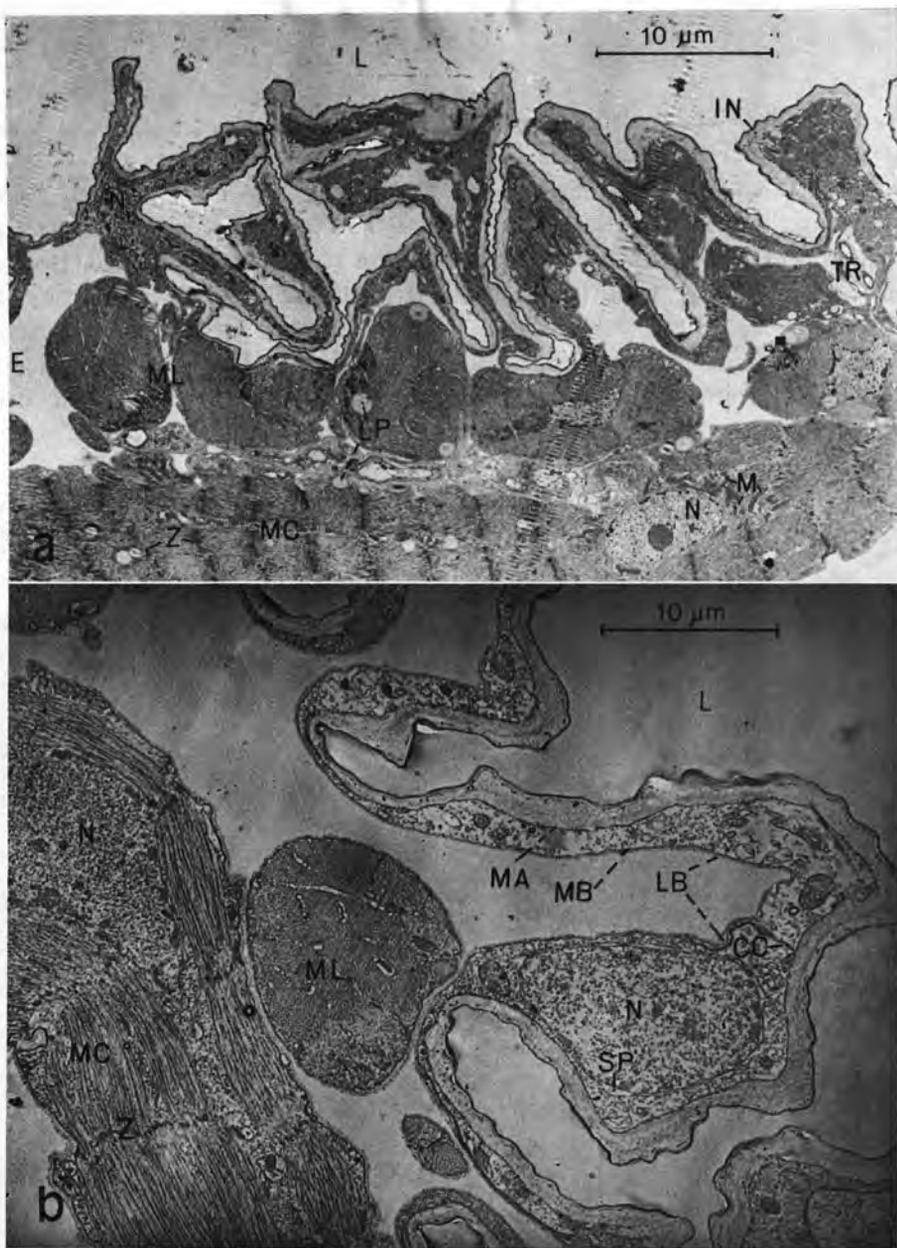


Fig. 13 - Ampolla rettale di maschio neosfarfallato: a) parte di sezione trasversale effettuata nel terzo anteriore dell'ampolla, mostrante l'epitelio pavimentoso, fortemente increspato ed assai variabile nello spessore, e la tunica muscolare con fibre circolari all'esterno e longitudinali all'interno (si noti nella fibra circolare la regolarità dei dischi Z e l'abbondanza di mitocondri nel sarcoplasma perinucleare); b) particolare, a maggiore ingrandimento, di sezione analoga alla precedente, effettuata in corrispondenza della striscia dorsale posteriore dell'ampolla.

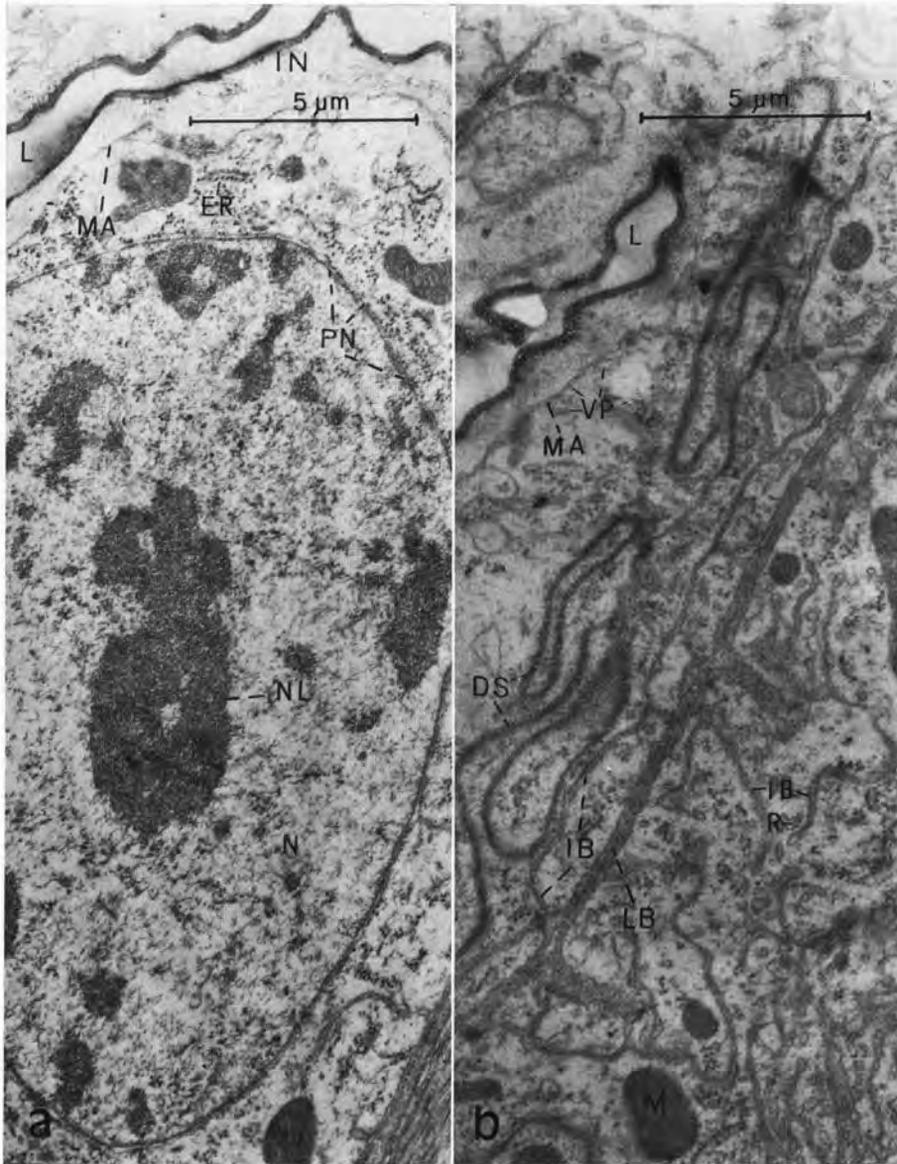


Fig. 14 - Sezioni trasversali effettuate in un tratto relativamente spesso dell'epitelio pavimentoso, nel terzo anteriore dell'ampolla rettale di maschio di 16 giorni di età, sacrificato 12 ore dopo l'accoppiamento: a) particolare mostrante, tra l'altro, un voluminoso nucleo; b) particolare mostrante l'andamento assai tortuoso del confine laterale tra due cellule, la forte osmio-affinità delle membrane contigue con relative giunzioni serrate, e lo sviluppo enorme delle introflessioni della membrana plasmatica basale. È da notare anche, lungo la membrana plasmatica apicale, la presenza di vescicole micropinocitiche.

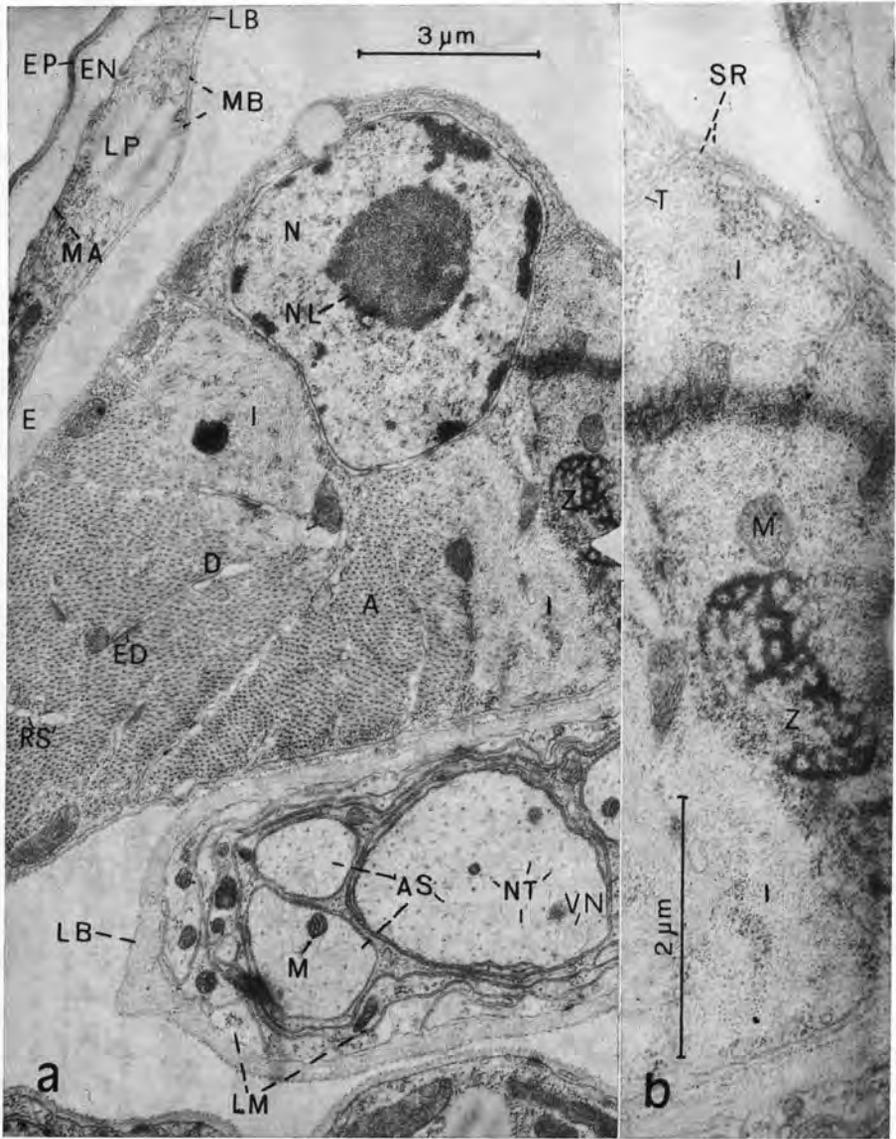


Fig. 15 - Tunica muscolare del retto di maschio neofarfallato: a) sezione trasversale di fibra longitudinale, effettuata nel terzo anteriore dell'ampolla rettale (inoltre: all'angolo superiore sinistro è visibile un tratto fortemente appiattito dell'epitelio pavimentoso; in basso è presente un grosso nervo rivestito di lamina basale molto spessa e contenente almeno 4 assoni motori); b) particolare della precedente, a maggiore ingrandimento, in corrispondenza della banda I della fibra muscolare. Sono da notare lo sviluppo del reticolo sarcoplasmico ed i relativi rapporti con i tubuli trasversi, e lo stato perforato del disco Z, indice di supercontrattilità della fibra.

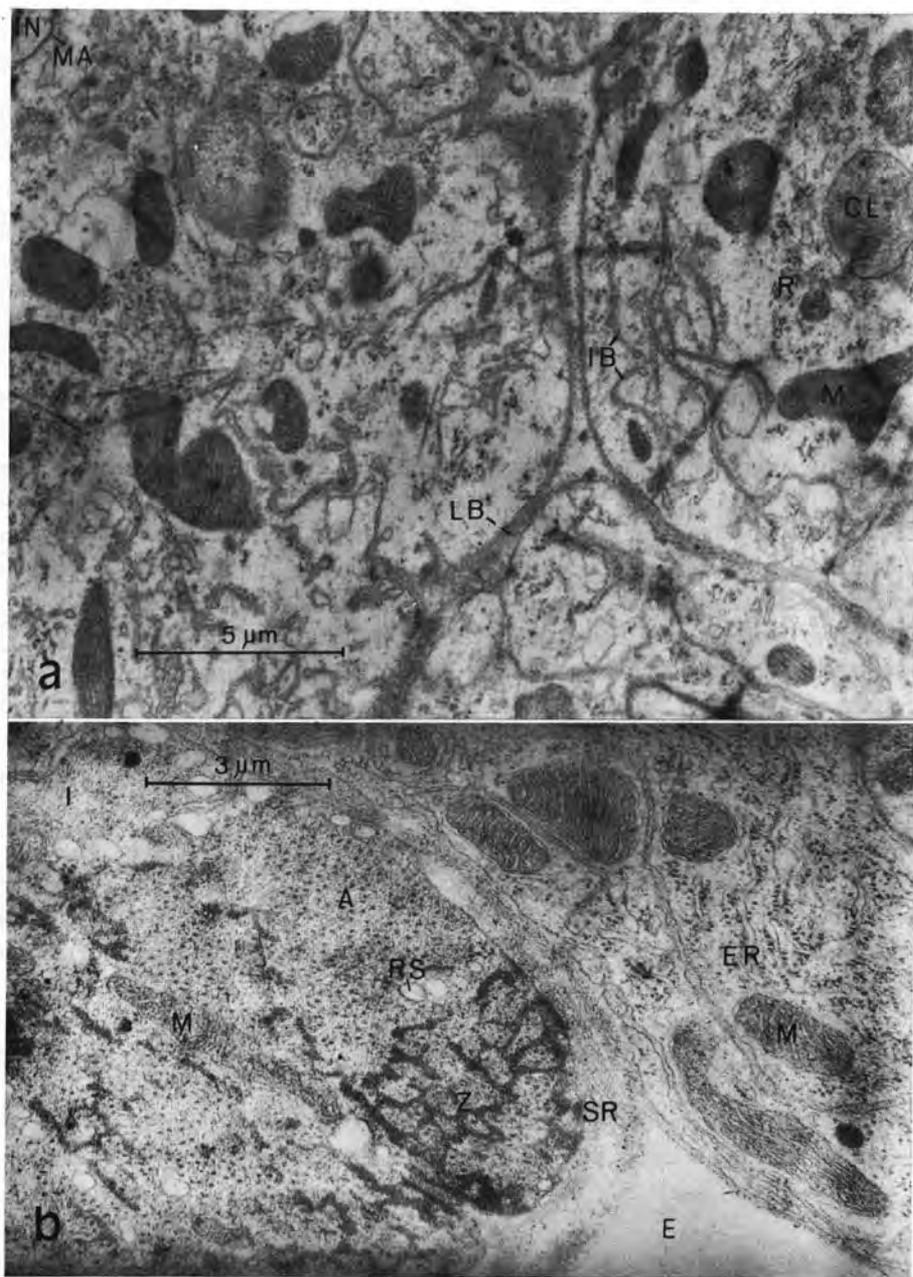


Fig. 16 - a) Sezione analoga alla 14b, mostrandone i confini apparentemente (non morfologicamente) laterali fra tre cellule divenute contigue in seguito all'increspatura dell'epitelio (sono da notare la scarsità di reticolo endoplasmico ed una discreta frequenza di mitocondri con creste serrate, e di citolisomi); b) sezione analoga alla precedente mostrandone (a destra) la parte basale (eccezionalmente ricca di ergastoplasma) di una cellula dell'epitelio pavimentoso; ed (a sinistra) una parte di sezione trasversale di fibra longitudinale della tunica muscolare, mostrandone parte di un disco Z distintamente perforato.

(figg. 10, 13, 21, 26, 29, 32, 40), per cui raramente si verifica un andamento parallelo di detta superficie con quella apicale delle cellule sottostanti. Dette formazioni chiaramente concorrono a dare robustezza e possibilità di ampia distensione alle pareti del retto. L'intima è costituita da due strati (figg. 14, 15a, 22a, 23a, 27a, 30a, 31a, 34, 37, 40) ben definiti: uno superiore (esterno) elettroneopaco (fortemente osmiofilo, soprattutto in superficie), di spessore modesto ($0,2 \mu\text{m}$ circa) ma poco variabile, corrispondente all'epicuticola del dermascheletro; ed uno inferiore, molto trasparente agli elettroni (scarsamente osmiofilo), visibilmente fibroso e granuloso, di spessore molto variabile ($0,1 \div 2 \mu\text{m}$, indipendentemente dal tipo di cellule epiteliali che esso ricopre), corrispondente alla endocuticola del dermascheletro. La superficie limite tra i due strati cuticolari è sempre ben definita; mentre quella inferiore dello strato endocuticolare, raramente e solo sull'epitelio basso dell'ampolla, appare delimitata da una linea di demarcazione netta e continua; ma, nella massima parte dei casi, essa risulta più o meno introflessa nelle cellule epiteliali, seguendo (in parte) l'andamento della membrana plasmatica apicale delle medesime. Nell'intima non abbiamo riscontrato soluzioni di continuità di alcun genere. Pertanto il passaggio dal lume intestinale alle cellule (e viceversa) sarebbe consentito unicamente all'acqua e ad altre sostanze (come sali minerali, zuccheri semplici, aminoacidi, ecc.) le cui molecole o ioni abbiano una grandezza relativamente modesta (WIGGLESWORTH, 1974).

4. - L'*epitelio* rettale è formato da un'unica assise di cellule, anche se, in seguito a forte increspatura, può apparire talora pluristratificato. Esso presenta (come sopra accennato) condizioni sostanzialmente differenti, sia sul piano morfologico che fisiologico, nelle zone seguenti:

- a) dalla valvola rettale all'imboccatura dell'ampolla rettale;
- b) nel terzo (talora $1/2$ o più) anteriore e lungo una striscia dorsale mediana e posteriore (fino al tubo anale) dell'ampolla rettale;
- c) nel tratto mediano e posteriore dell'ampolla rettale (compreso il « sacco secretorio » ed esclusa la striscia dorsale sopra menzionata);
- d) nel tubo anale.

a. - Dalla valvola rettale all'imboccatura dell'ampolla rettale, le cellule epiteliali sono prismatiche, relativamente alte (figg. 4c, 6b, 6c, 8a, 9b) e presentano l'aspetto tipico delle cellule proctodeali adibite all'assorbimento di acqua e di altre sostanze provenienti soprattutto dai tubi malpighiani. Dette cellule (figg. 10, 11, 12) mostrano la membrana plasmatica basale con numerose e profonde introflessioni che arrivano fino alla zona perinucleare. I confini

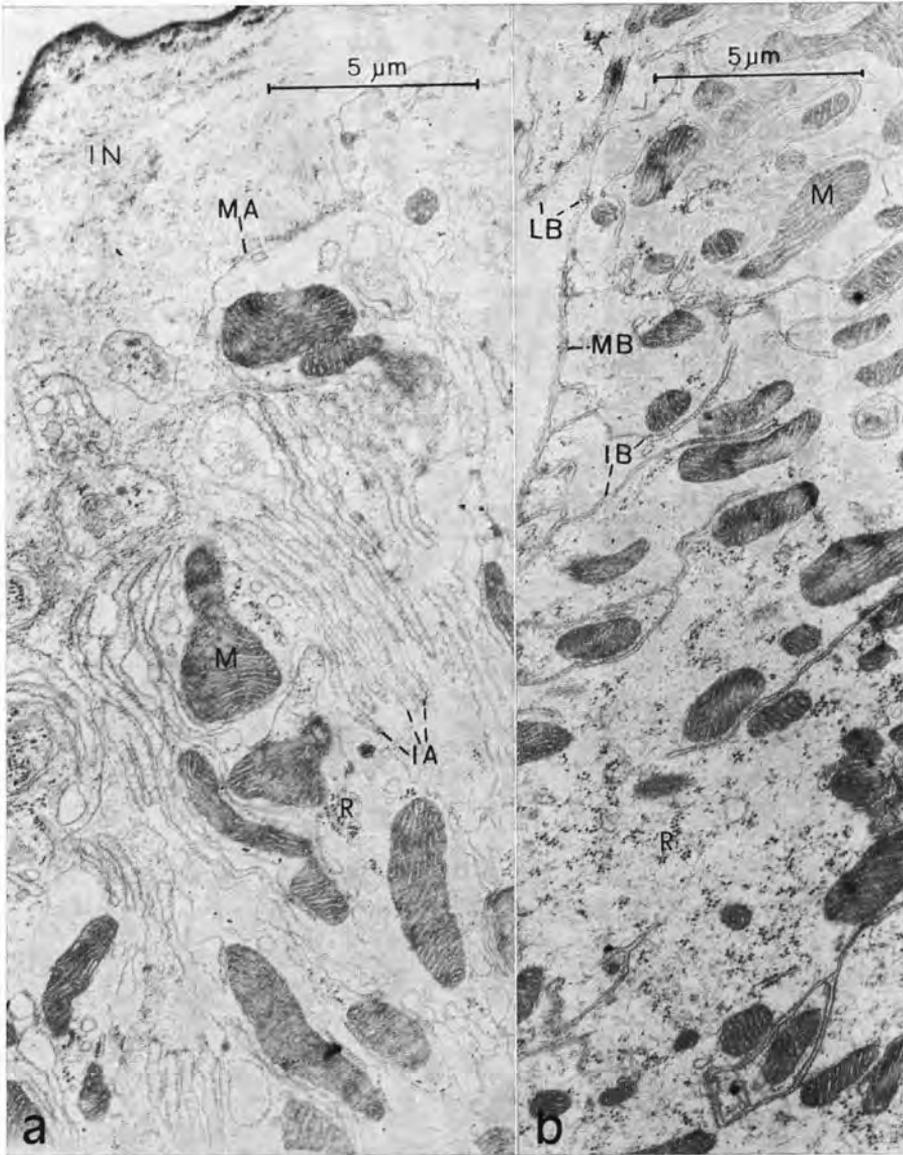


Fig. 17 - Ampolla rettale di maschio di 16 giorni di età, sacrificato 12 ore dopo la copula: sezione trasversale effettuata nella zona di confine tra l'epitelio proveniente dal colon e quello pavimentoso: a) parte apicale di cellula epiteliale ricoperta dall'intima e mostrante la membrana plasmatica apicale con numerosissime e profonde introflessioni; b) parte basale della stessa cellula, mostrante la membrana plasmatica basale con numerose e profonde introflessioni, alle quali risultano associati numerosi mitocondri. Si noti la scarsità di altri organelli cellulari.

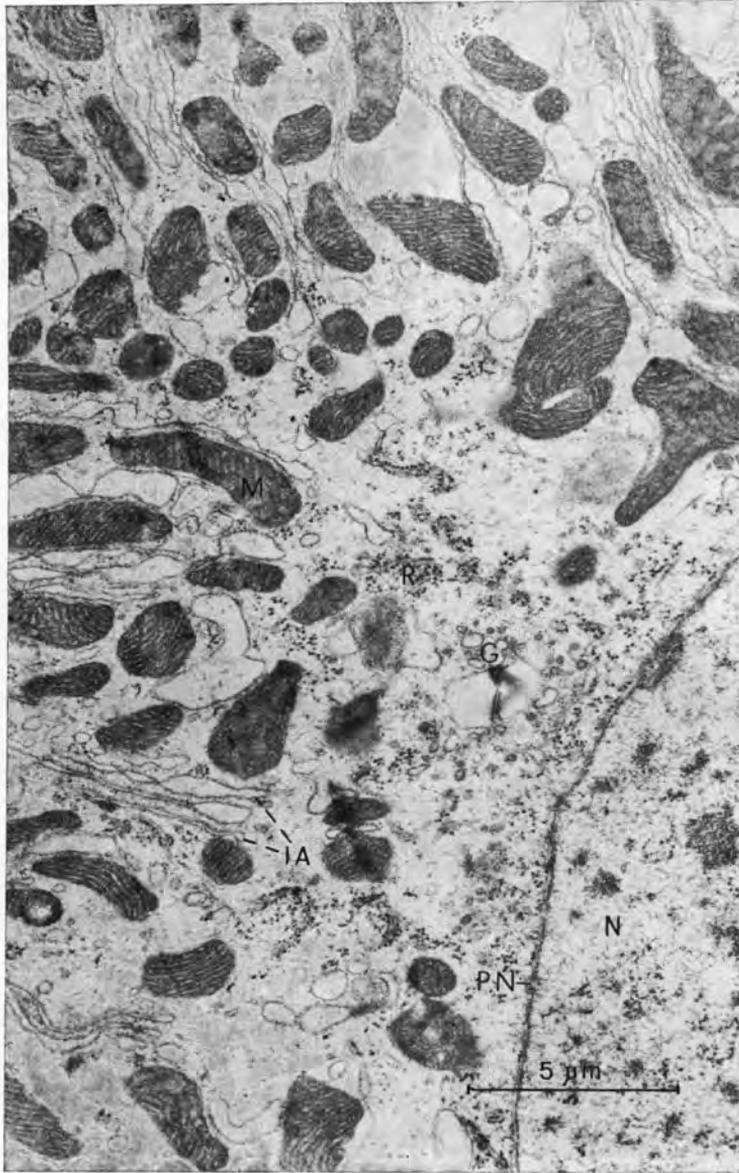


Fig. 18 - Parte sopranucleare della stessa cellula della figura 17, mostrandone fin dove arrivano le introflessioni della membrana plasmatica apicale, alle quali risultano associati numerosi mitocondri. Nella zona perinucleare si nota una relativa concentrazione di reticolo endoplasmico, di ribosomi (liberi, riuniti in poliribosomi ed associati a membrane) e complessi di Golgi.

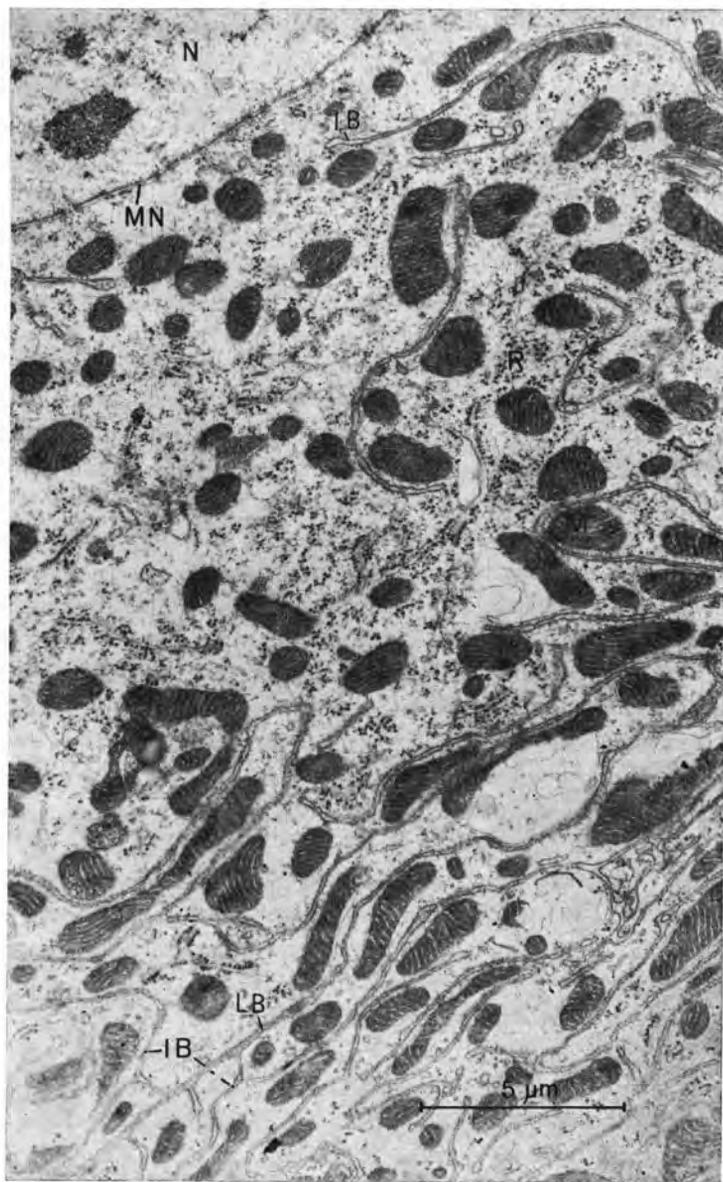


Fig. 19 - Parte sottocellulare della stessa cellula della figura 17, mostrante fin dove arrivano le introflessioni della membrana plasmatica basale, alle quali risultano pure associati un grande numero di mitocondri.

lateralmente (morfologicamente) tra cellula e cellula sono alquanto tortuosi, con spazio intercellulare ordinariamente modesto, ma relativamente più ampio alle due estremità basale ed apicale; le membrane plasmatiche laterali sono fortemente osmiofile, e mostrano frequenti giunzioni occludenti e desmosomi settati, nel tratto medio e subapicale (fig. 10). La membrana plasmatica apicale, analogamente a quella basale, presenta un grande numero di introflessioni profonde, tra loro subparallele e quasi perpendicolari alla soprastante cuticola, le quali arrivano fino alla zona perinucleare, dove incontrano le introflessioni basali sopra menzionate. Ne deriva che il citoplasma è attraversato a tutto spessore (o quasi) da un folto sistema di spazi o canalicoli extracellulari delimitati rispettivamente dalla membrana plasmatica basale e da quella apicale. Il nucleo è abbastanza grosso, con membrana nucleare duplice e con spazio perinucleare ordinariamente modesto e regolare; è provvisto di nucleolo di grandezza media. I mitocondri costituiscono la parte più vistosa degli organelli cellulari presenti. Sono grossi, provvisti di creste fitte ed orientate per lo più trasversalmente (figg. 11 e 12) rispetto all'asse del mitocondrio medesimo, variamente conformati ed adattati a seguire la membrana cellulare lungo le introflessioni basali ed apicali sopra menzionate. Soprattutto presso queste ultime, i mitocondri risultano in massimo numero concentrati. Il reticolo endoplasmico è prevalentemente del tipo granuloso (ergastoplasma) e risulta particolarmente abbondante negli individui appena sfarfallati (fig. 11), nei quali anche i ribosomi liberi ed i poliribosomi sono alquanto più numerosi che negli individui di età maggiore⁽⁴⁾. Il reticolo liscio è modestamente sviluppato, spesso direttamente collegato all'ergastoplasma (fig. 11) e dilatato in vescicole più o meno ampie. I complessi di Golgi (fig. 11) sono abbastanza frequenti, ma non sempre chiaramente distinguibili. Si riscontrano con bassa frequenza citolisomi, mentre, negli esemplari neosfarfallati, piuttosto numerosi risultano certi grossi vacuoli apparentemente privi di membrana avvolgente ed a contenuto morfologicamente simile a lipidi (figg. 10 e 11) (molto simili a quelli sopra descritti, trattando delle fibre muscolari della tunica).

b. - L'epitelio che tappezza il terzo anteriore (talora fino a metà ed oltre) ed una striscia dorsale mediana e posteriore dell'ampolla rettale è di tipo pavimentoso, con cellule più o meno fortemente appiattite (figg. 3÷9 e 13). Esse presentano una membrana plasmatica basale che si comporta diversa-

⁽⁴⁾ Ciò si verifica anche per gli altri tipi di cellule epiteliali trattati nel presente lavoro, e si può spiegare anche col fatto che, negli individui appena sfarfallati, la produzione di proteine cuticolari è ancora in atto.

mente secondo lo spessore della cellula (fig. 13). È assolutamente semplice dove la cellula risulta più fortemente appiattita (figg. 13b e 15a) e sostanzialmente ridotta alle due membrane plasmatiche, basale ed apicale, separate da un modesto strato di citoplasma, anch'esso estremamente semplificato e quasi totalmente privo di organelli cellulari. Ma, nelle parti in cui lo spessore della cellula è relativamente cospicuo, la membrana plasmatica basale (sia nei tratti visibilmente basali che in quelli apparentemente laterali, nel senso sopra illustrato, trattando della lamina basale) presenta un gran numero di introflessioni profonde, tortuose, varicose e ramificate, le quali finiscono per inglobare in una sorta di reticolato gran parte del citoplasma (figg. 14b e 16). Tra le due condizioni estreme ora esposte, si riscontra tutta una gamma di passaggi gradualmente intermedi (fig. 13a). Anche per i confini laterali tra cellula e cellula si riscontrano comportamenti che vanno gradualmente da quello più semplice e lineare, nei punti in cui lo spessore della cellula è minimo (fig. 13b), a quello più tortuoso, con membrane contigue fortemente osmiofile e con giunzioni serrate (desmosomi settati), nelle parti in cui la cellula risulta più spessa (fig. 14b). La membrana plasmatica apicale ha un andamento lineare, tale da costituire una demarcazione netta e continua nei confronti della soprastante cuticola, nelle parti in cui la cellula è più fortemente appiattita (figg. 13b e 15a); mentre risulta notevolmente accidentata e perfino con introflessioni, benché poco profonde e non tanto frequenti, nelle parti in cui la cellula è relativamente spessa (fig. 13a, 14 e 16a). Il nucleo è bene sviluppato, di forma regolare nelle cellule maggiormente appiattite e più distese (figg. 13b e 14a), mentre assume le forme più svariate ed irregolari nelle cellule relativamente più alte e più increspate (fig. 13a). È regolarmente avvolto da membrana duplice, con pori relativamente frequenti e con spazio perinucleare spesso dilatato e comunicante con il reticolo endoplasmico (fig. 13b e 14a). Il nucleolo è di grandezza mediocre ma sempre bene evidente anche al microscopio ottico. Gli organelli cellulari sono estremamente diradati (come già accennato) dove la cellula è particolarmente appiattita (figg. 13b e 15a), ma risultano discretamente rappresentati nelle parti in cui il citoplasma è relativamente spesso (figg. 13a, 14, 16). In questo caso sono presenti soprattutto mitocondri (di forma e grandezza molto variabili, con creste serrate e variamente orientate, talora vescicolosi), citolisomi e ribosomi (elementi liberi e poliribosomi; raramente associati a membrane), mentre il reticolo endoplasmico è quasi sempre notevolmente ridotto, ed i complessi di Golgi non sono presenti nella forma tipica. Anche in queste cellule, benché con frequenza assai minore rispetto al tipo precedente, si riscontrano, sempre limitatamente ai soggetti neosfarfallati, grossi vacuoli apparentemente privi di membrana avvolgente e contenenti

sostanze simili a lipidi (fig. 18a). Inoltre, in corrispondenza delle rare e modeste introflessioni della membrana plasmatica apicale, si osservano vescicole micropinocitiche (fig. 14b).

Nella zona di passaggio dal primo al secondo tipo di epitelio fin qui descritti (topograficamente corrispondente alla regione dalla quale si sollevano le papille rettali: figg. 2 e 3), si riscontra la presenza di cellule con caratteristiche morfologiche e fisiologiche intermedie rispetto a quelle di detti epiteli. In particolare, queste cellule presentano le membrane plasmatiche basale, laterali ed apicale (figg. 17, 18 e 19) a comportamento molto simile a quello dell'epitelio tipico del colon. Sembra da notare però un fatto nuovo, ossia una presenza massiccia di microtubuli variamente orientati (fig. 20), in prossimità dei confini laterali, soprattutto verso la parte apicale, di dette cellule. Ciò al fine, probabilmente, di rendere l'epitelio meccanicamente più idoneo a sostenere le voluminose papille rettali. I mitocondri sono molto numerosi e visibilmente associati alle introflessioni delle membrane plasmatiche basale ed apicale, analogamente a quanto riferito per il primo tipo di epitelio, ma, contrariamente a questo, nelle cellule « di transizione » i mitocondri risultano più concentrati nella parte mediana e basale che in quella apicale della cellula stessa. I complessi di Golgi (fig. 18) sono relativamente frequenti, come nel primo epitelio considerato. Per quanto riguarda, invece, il reticolo endoplasmico, i ribosomi ed i citolisomi, le cellule « di transizione » appaiono in condizioni molto più simili a quanto abbiamo riferito per le cellule dell'epitelio pavimentoso, relativamente ai tratti più spessi del medesimo (figg. 14 e 16).

c. - L'epitelio che tappezza il tratto mediano e quello posteriore dell'ampolla rettale, compreso il « sacco secretorio » (ed esclusa la striscia dorsale già esaminata) costituisce l'oggetto principale del presente lavoro, essendo questo il territorio già segnalato (si veda l'Introduzione) come probabile sede di produzione di feromoni sessuali da parte del maschio di *Dacus oleae*. Allo studio di questo epitelio abbiamo perciò dedicato un'attenzione tutta particolare, al fine di appurare nel medesimo la presenza o meno di caratteri morfologici e fisiologici sicuramente indicativi dell'avvenuto adattamento ad una funzione completamente nuova quale la produzione di feromoni sessuali.

Un primo sintomo positivo molto importante in tal senso lo abbiamo riscontrato nel fatto che questo epitelio, oltre ad essere in ogni caso più alto degli altri sopra esaminati, mostra una vistosa differenza di sviluppo tra gl'individui neosfarfallati (sessualmente immaturi: DE MARZO, NUZZACI, SOLINAS, 1976) e quelli sessualmente maturi; come può facilmente rilevarsi anche dal semplice confronto delle figure 4 e 5 (esemplari neosfarfallati) con le figure

7, 8 e 9 (esemplari sessualmente maturi). Altro fatto molto indicativo (anch'esso facilmente osservabile al microscopio ottico) è dato dalla struttura tipicamente ghiandolare (aspetto generale ipertrofico; nucleo e relativo nucleolo particolarmente vistosi; ecc.) delle cellule epiteliali in questione; confermata anche dalla presenza di un secreto oleoso⁽⁵⁾, il quale inizialmente, ossia negli individui appena sfarfallati, ricopre appena dette cellule (verso il lume intestinale) come uno strato di vernice (fig. 4b), poi via via (nei giorni successivi) aumenta di quantità e si raccoglie nel lume dell'ampolla rettale (a cominciare dal « sacco secretorio »: fig. 5d) fino ad occuparne, negli individui sessualmente maturi (di oltre 7 giorni di età, nelle nostre condizioni di esperienza), 1/3 circa dell'intero volume.

Riguardo alle cellule di questo epitelio ghiandolare, al microscopio ottico non abbiamo riscontrato differenze morfologiche importanti, nell'ambito dei maschi sessualmente maturi, né in relazione all'attività sessuale (ossia tra maschi vergini ed altri che hanno compiuto un accoppiamento, sacrificati, entrambi i gruppi, contemporaneamente, alcune ore dopo detto accoppiamento), né in relazione all'età dei medesimi (ossia dal 7° al 28° giorno di vita immaginale); come si può vedere anche dall'esame comparato delle figure 6, 7, 8 e 9.

Anche per quanto riguarda la presenza della « sostanza oleosa » nell'ampolla rettale, abbiamo visto che, negli individui sessualmente maturi, essa è quasi sempre positiva. Ma la quantità di tale sostanza nell'ampolla rettale varia sensibilmente nelle 24 ore, essendo massima 1-2 ore prima del tramonto (ossia all'inizio dell'orario giornaliero di attività sessuale del *Dacus*) e minima poco dopo il tramonto medesimo, indipendentemente dal fatto che i maschi nel frattempo abbiano attuato o meno la copula. A ciò si aggiunge il fatto che, schiacciando tra due dita e fiutando l'ampolla rettale di un maschio sessualmente maturo sacrificato al pomeriggio (ma non di quelli sacrificati al mattino, né di soggetti sessualmente immaturi), si avverte per alcuni secondi (poi svanisce) l'odore caratteristico, vagamente ammoniacale, che si riscontra nelle gabbie di allevamento dei maschi sessualmente maturi, solamente durante l'ora di attività sessuale dei medesimi. Entrambi questi fatti dimostrano che la « sostanza oleosa » viene utilizzata dall'insetto che la produce, durante il tempo di ricerca dell'altro sesso.

L'esame ultrastrutturale delle cellule dell'epitelio in questione conferma

⁽⁵⁾ Si tratta certamente della « sostanza oleosa » segnalata da ECONOMOPOULOS e Coll. (l.c.). Detta sostanza appare quasi incolore all'origine ma può assumere tonalità diverse di giallo o rossastro a contatto con le feci, con le quali però non si mescola. Ha un peso specifico notevolmente inferiore a quello dell'acqua, in seno alla quale forma gocce di varia grandezza che rapidamente emergono e, giunte alla superficie libera, esplodono, lasciando su quest'ultima una miriade di minutissime gocce.

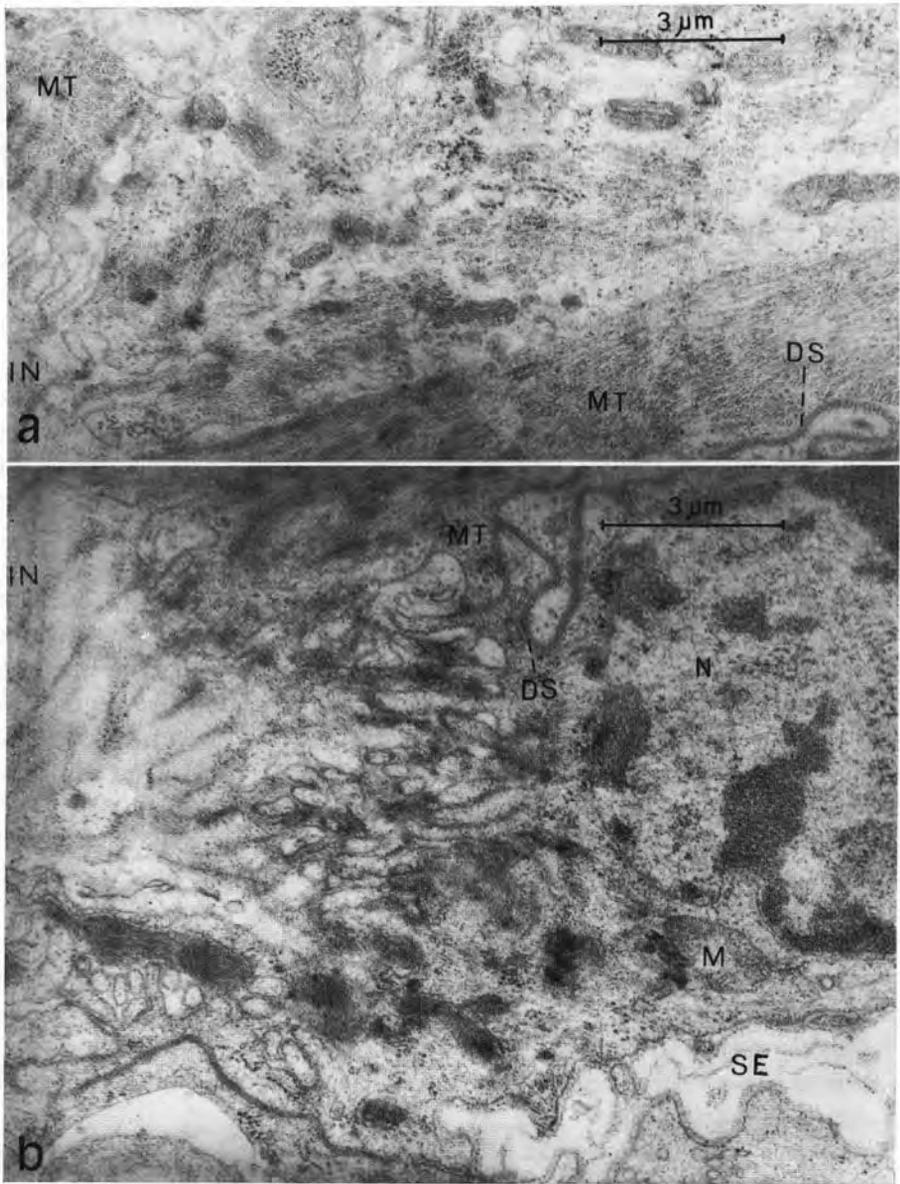


Fig. 20 - Ampolla rettale di maschio vergine di 7 giorni di età. Sezione analoga a quella della figura 17: a) e b) particolari del tratto apicale della zona di confine tra le cellule epiteliali. È da notare la grande abbondanza di microtubuli.

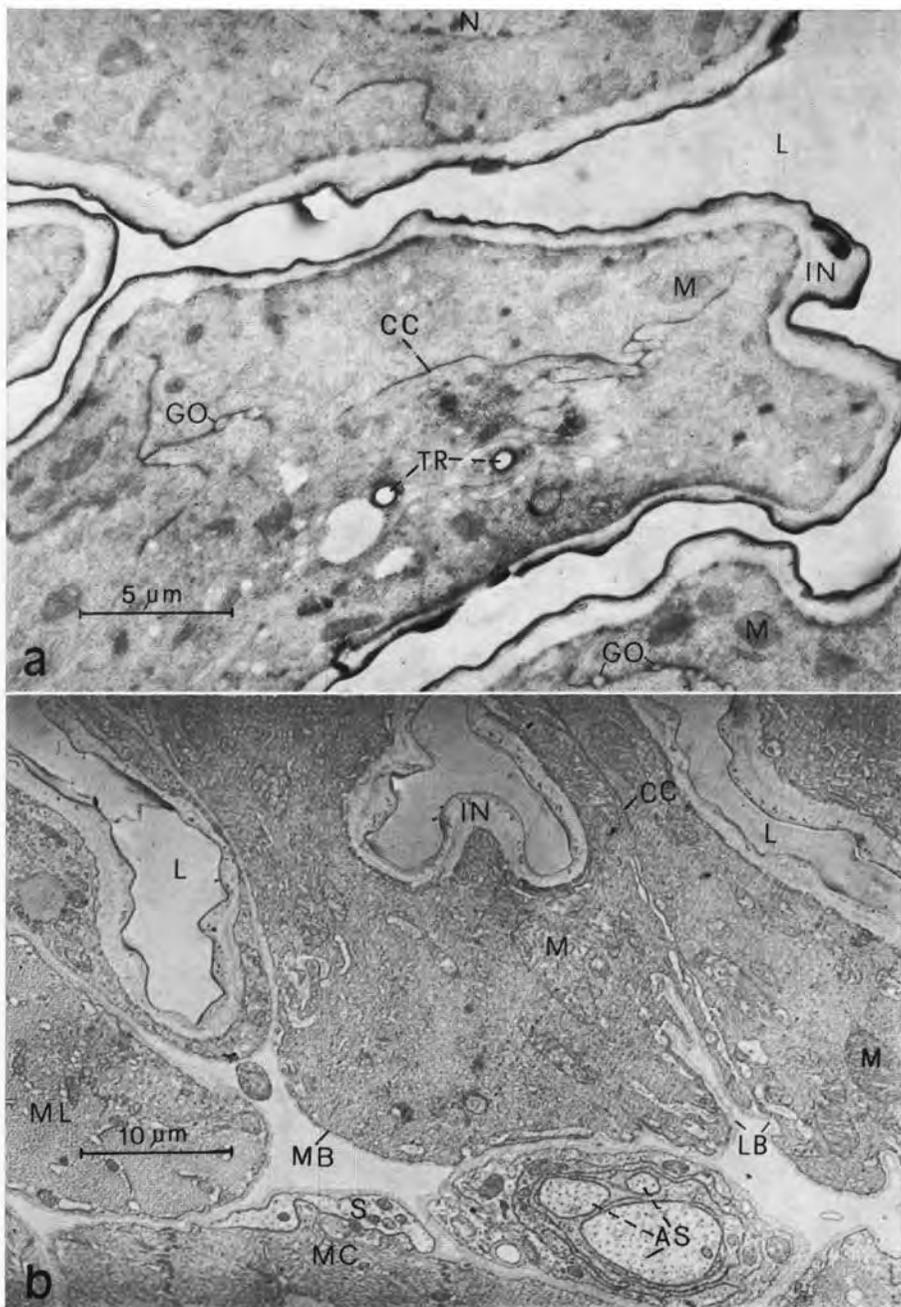


Fig. 21 - Ampolla rettale di maschio neosfarfallato: sezione trasversale effettuata nella zona antistante il « sacco secretorio »: a) parte mediana ed apicale di cellule secretrici ricoperte da un'intima di spessore notevolmente variabile (si notino, in particolare, l'andamento delle membrane plasmatiche apicale e laterali); b) soggetto analogo a quello precedente, comprendente anche la parte basale di alcune cellule secretrici (si notino le introflessioni, ampie ma relativamente poco numerose e poco profonde, della membrana plasmatica basale). In basso sono visibili anche: la sezione trasversale di un nervo rivestito di spessa lamina basale e contenente tre assoni tunicati, e la sezione parziale di due fibre della tunica muscolare, su una delle quali termina (sinapsi) un assone motore.

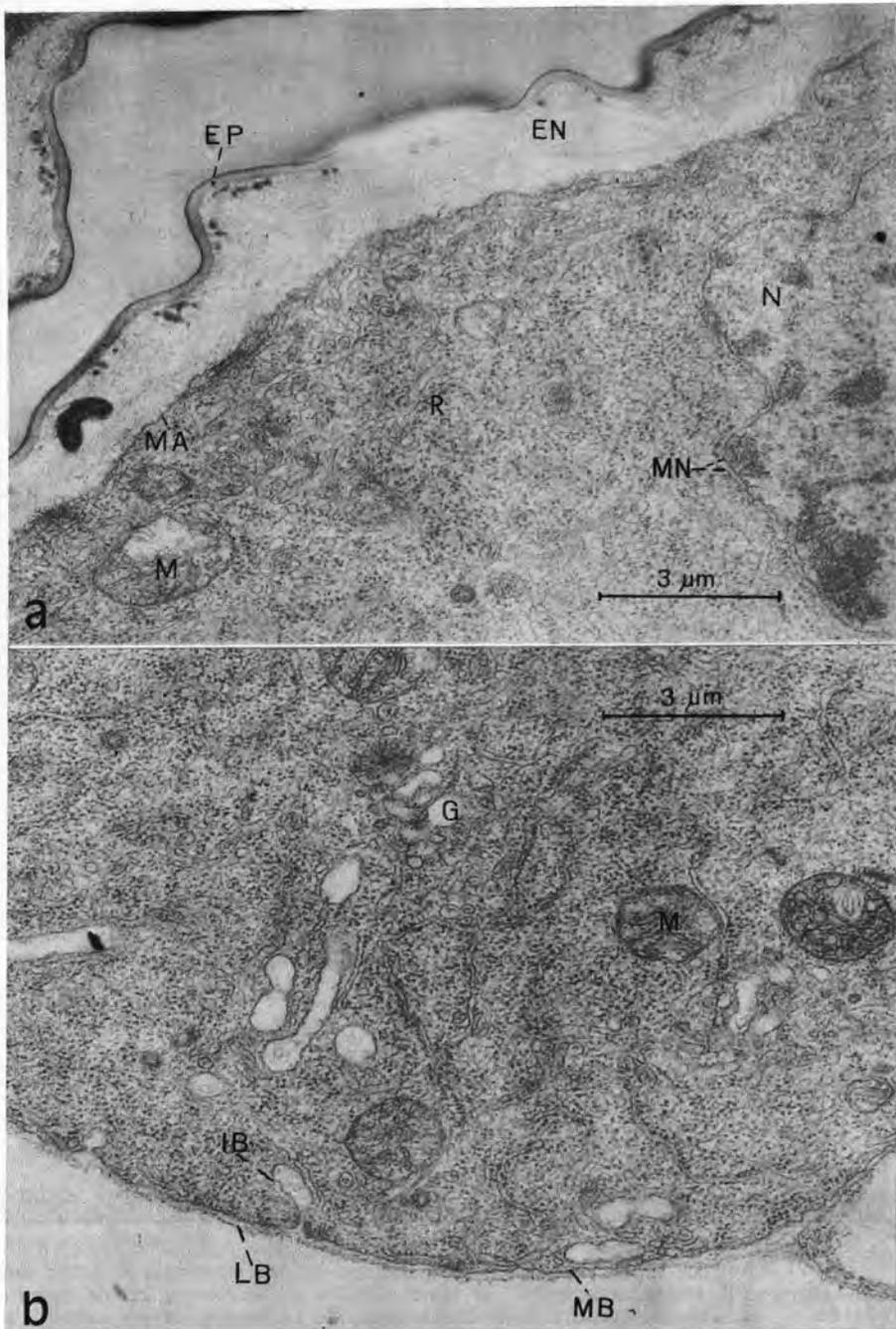


Fig. 22 - Particolari, a maggiore ingrandimento, di sezione analoga alla precedente: a) parte apicale di una cellula secretrice con intima; b) parte basale della stessa cellula. Sono da notare i numerosi elementi tubolari subapicali, la sinuosità del nucleo, la grande abbondanza di ribosomi ed il comportamento (descritto nel testo) dei mitocondri.

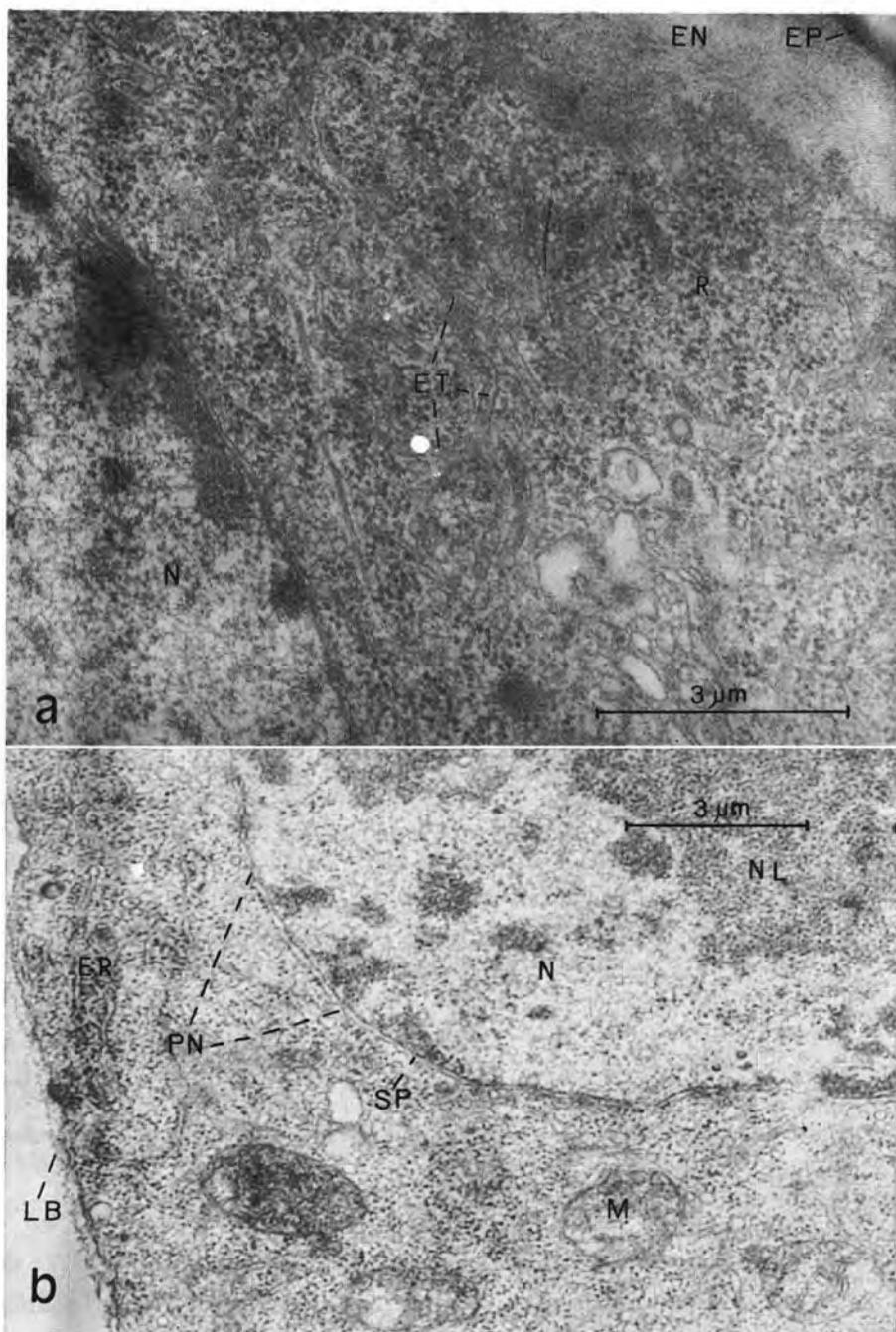


Fig. 23 - Soggetto analogo a quello precedente: a) parte apicale di cellula secernente con intima; b) parte mediana e basale della stessa cellula. È da notare (oltre le indicazioni della figura precedente) l'intensità dei rapporti nucleo-citoplasma.

in buona parte i reperti istologici sopra riferiti, ed aggiunge nuove importanti informazioni soprattutto sulla fisiologia di dette cellule secernenti, con qualche indizio anche sulla natura del relativo secreto (o secreti).

c.1 - Nei maschi neosfarfallati, queste cellule presentano la membrana plasmatica basale (figg. 21b, 22b, 24a, 26 e 27), sia nella parte visibilmente basale che in quelle apparentemente laterali (nel senso sopra indicato, trattando della lamina basale), con andamento notevolmente semplificato (a parte le zone fortemente appiattite dell'epitelio pavimentoso) rispetto ai casi precedenti, nel senso che le introflessioni sono qui meno numerose, generalmente meno profonde, ma più ampie e con dilatazioni simili (in sezione) a vacuoli, nelle quali penetra spesso anche la lamina basale (figg. 26 e 27b). I confini laterali (morfologicamente) tra cellula e cellula non presentano differenze di rilievo rispetto ai casi precedenti, come si può vedere anche dalle figure 21 e 26. La membrana plasmatica apicale mostra un profilo (figg. 21, 22a e 27a) decisamente semplificato rispetto al primo tipo di epitelio, ma abbastanza simile a quello sopra descritto per le parti relativamente spesse dell'epitelio pavimentoso, ossia con introflessioni relativamente modeste, sia come numero che come profondità. Il nucleo (figg. 4b, 5c e 5d) è notevolmente più voluminoso (sia in senso relativo che in assoluto) rispetto ai casi precedenti; è provvisto di nucleolo molto sviluppato; è avvolto regolarmente da duplice membrana (figg. 22a, 23a e 27a) con andamento a volte sinuoso (fig. 22), spazio perinucleare con frequenti ancorché modeste dilatazioni, e con numerosi pori annulati; molto frequenti risultano anche i rapporti tra lo spazio perinucleare ed il reticolo endoplasmico (sia liscio che granuloso). Anche gli organelli cellulari presentano differenze di rilievo rispetto alle cellule degli epiteli sopra esaminati. I mitocondri (figg. 21÷28a) sono relativamente poco numerosi e distribuiti ovunque, senza ordine apparente; sono di forma e grandezza varie, ma generalmente globosi e piuttosto voluminosi, quasi sempre vescicolari, provvisti di creste rade ed irregolari, con matrice filamentosa e con ribosomi ed apparentemente impegnati in processi di biosintesi (secrezione). Il reticolo endoplasmico è ugualmente bene sviluppato sia come elementi lisci che granulosi (ergastoplasma). Nella parte subapicale della cellula, il citoplasma presenta numerosi elementi tubolari (dritti e tortuosi) variamente orientati, rivestiti di membrana liscia e contenenti materiale elettrondenso (figg. 22a e 23a). I ribosomi sono numerosissimi⁽⁶⁾ ovunque, sia liberi, che legati in poliribo-

(6) In questo caso, alle considerazioni della nota 4, si aggiunge che le cellule in questione sono impegnate anche in un processo di accrescimento volumetrico globale che si concluderà quando il soggetto avrà raggiunto la piena maturità sessuale.

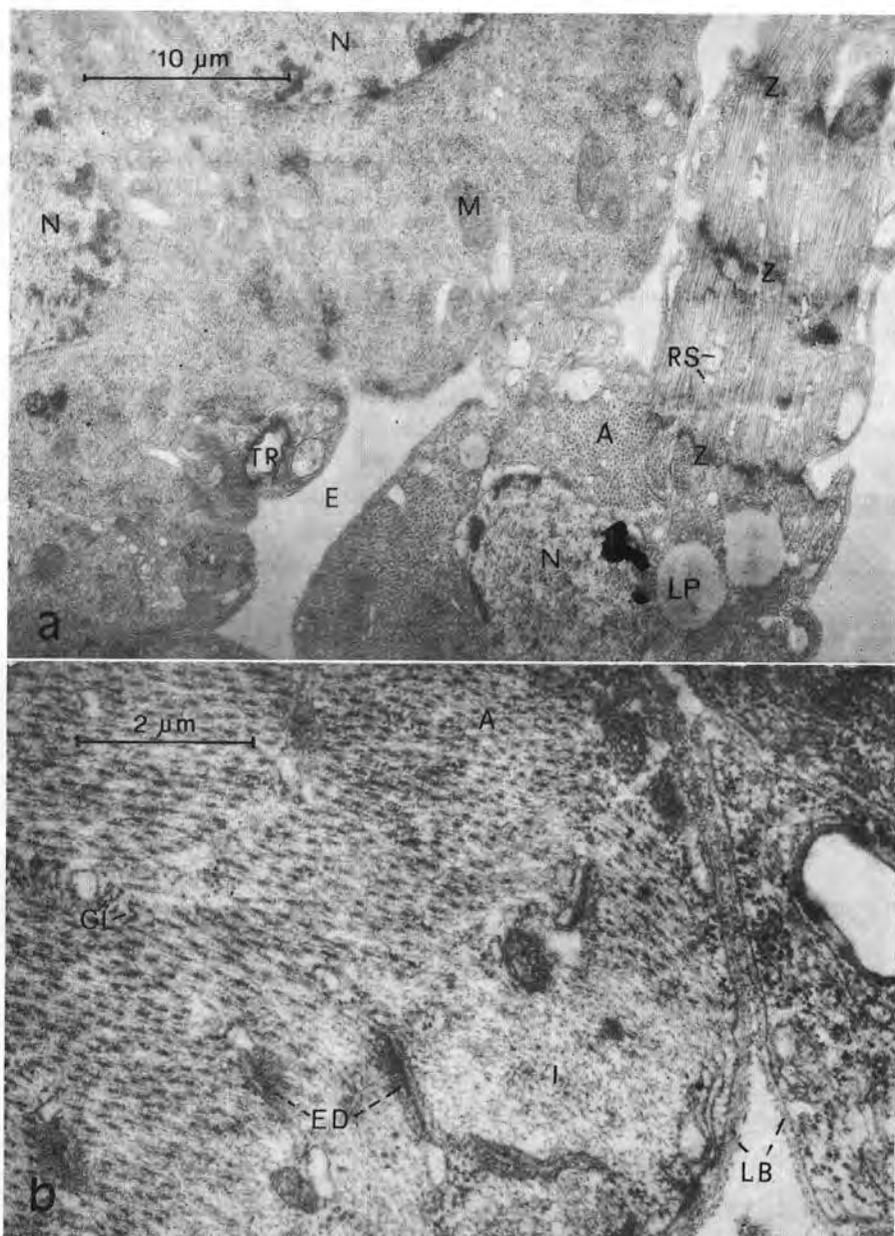


Fig. 24 - Sezioni della stessa serie della figura 21: a) particolare mostrandone la parte basale di due cellule secernenti contigue, insieme con la sezione parziale di una fibra muscolare longitudinale, nella quale si vede bene un fascio di filamenti orientati quasi ad angolo retto rispetto agli altri della stessa fibra; b) particolare, a maggiore ingrandimento, di sezione leggermente obliqua ed interessante le bande A ed I della fibra medesima.

somi, che associati a membrane. I complessi di Golgi sono abbastanza numerosi e distribuiti senza ordine apparente nelle varie parti della cellula; presentano spesso ampie dilatazioni a vescicola (figg. 22 e 27). Anche in queste cellule (come nelle altre precedentemente esaminate, sempre di maschi neosfarfallati), sono presenti grossi vacuoli apparentemente non circondati da citomembrana e contenenti sostanze simili a lipidi.

c.2 - Nei maschi vergini di 7 giorni di età, ossia sessualmente appena maturi, rispetto a quelli neosfarfallati, le cellule secretrici in questione presentano differenze di rilievo nella membrana plasmatica basale ed in quella apicale, e negli organelli cellulari. La membrana plasmatica basale presenta introflessioni notevolmente più numerose e più profonde (figg. 29, 31b, 32b), rispetto al caso precedente; e la membrana apicale (figg. 30a, 31a e 34) appare molto più accidentata (talora con microvilli rudimentali: figg. 30a e 34)

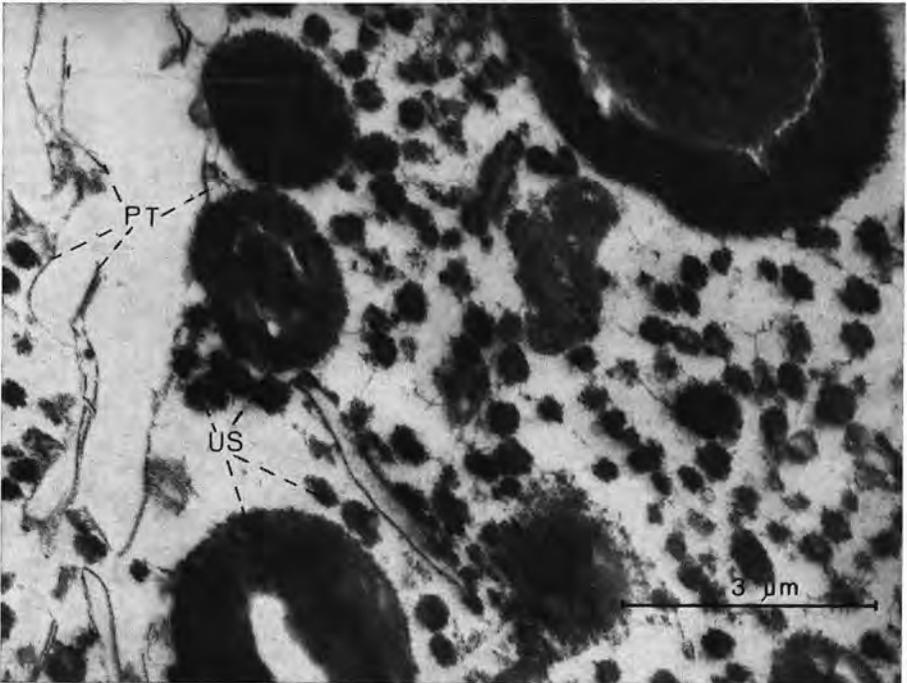


Fig. 25 - Particolare del contenuto intestinale, tratto da una sezione della stessa serie della figura precedente. Sono da notare: frammenti della membrana peritrofica ed urosferiti provenienti dai tubi malpighiani.

e visibilmente (fig. 34) coinvolta nel comportamento microapocrino della cellula. I mitocondri (figg. 29÷34) sono qui più numerosi, più compatti, di forma molto variabile, con creste serrate ed orientate per lo più trasversalmente all'asse del mitocondrio medesimo, e distribuiti più frequentemente lungo le inflessioni della membrana plasmatica basale (figg. 29 e 31b). Il reticolo endoplasmatico liscio è molto più sviluppato; mentre l'ergastoplasma è quasi completamente scomparso. I ribosomi sono relativamente pochi (cfr.

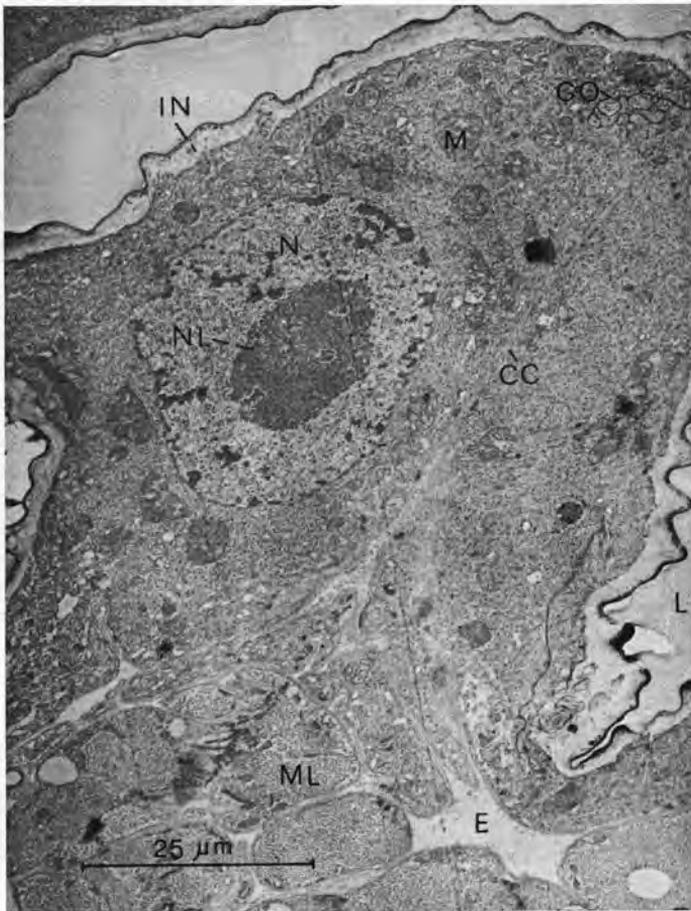


Fig. 26 - Ampolla rettale di maschio neosfarfallato: sezione trasversale effettuata all'altezza del « sacco secretorio » e mostrante due cellule secretrici del sacco ricoperte da intima di spessore molto variabile. Si notino la voluminosità del nucleo e del relativo nucleolo, l'andamento delle membrane apicale e laterali.

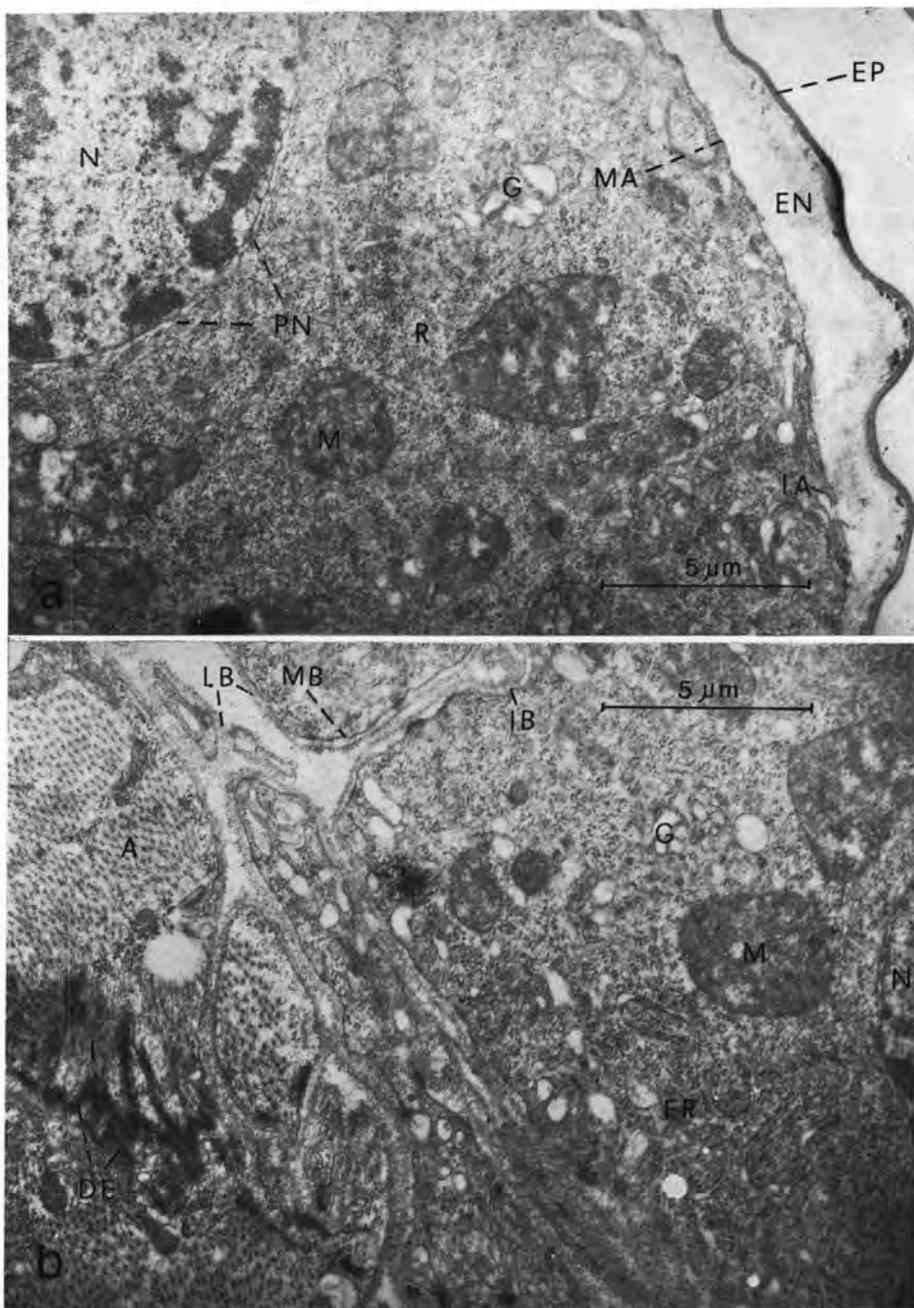


Fig. 27 - Particolari, a maggiore ingrandimento, della figura precedente per mostrare nei dettagli: l'andamento delle membrane plasmatiche basale (b) ed apicale (a), l'intensità dei rapporti nucleo-citoplasma (a e b), lo sviluppo del reticolo endoplasmico, la grande abbondanza ovunque di ribosomi (sia liberi, che legati in poliribosomi, che associati a membrane), le dilatazioni dei complessi di Golgi, il comportamento (descritto nel testo) dei mitocondri. A sinistra in b, si vede una parte di muscolo longitudinale della tunica mostrante estesi desmosomi tra fibre contigue.

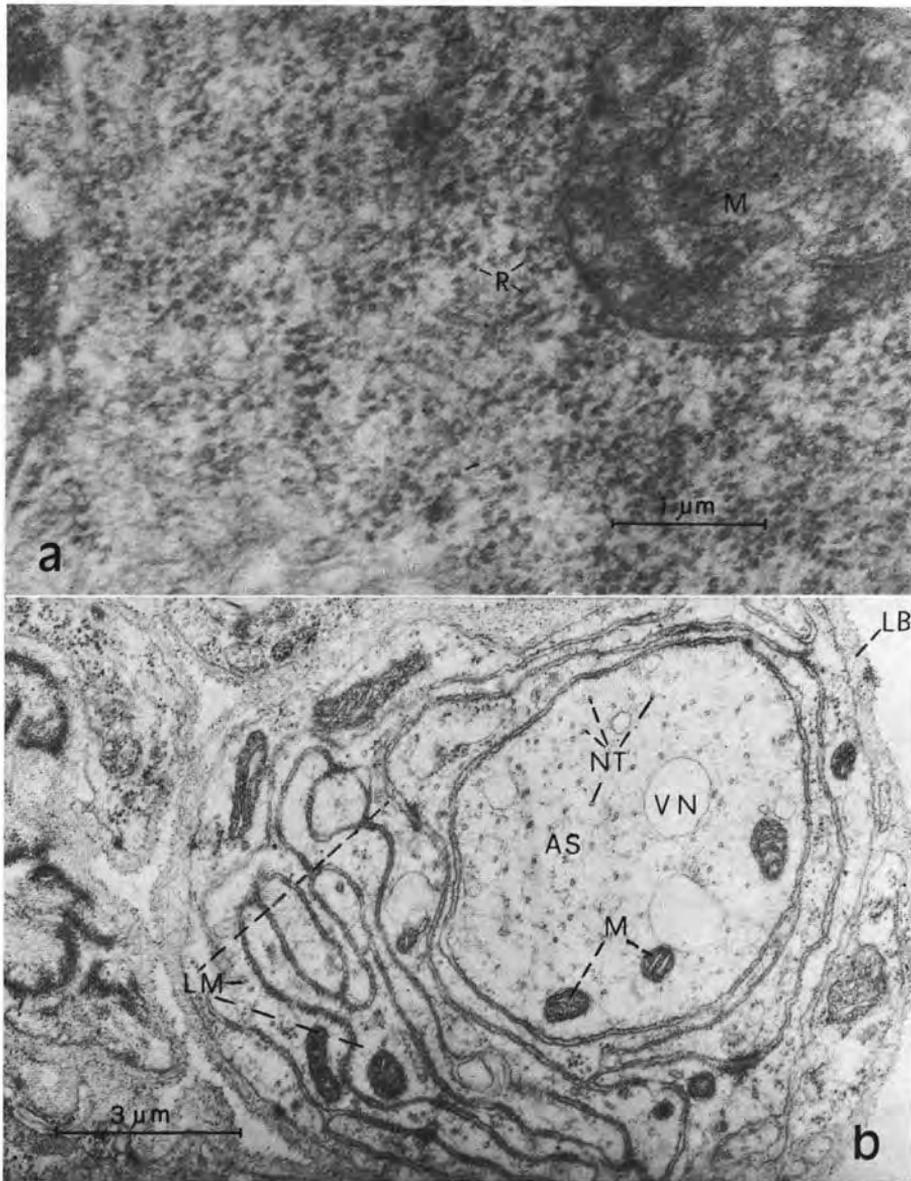


Fig. 28 - Particolari, a ingrandimento ancora maggiore, della figura 26: a) parte lateronucleare di cellula secernitrice, mostrante una grande abbondanza di poliribosomi, ed un mitocondrio con creste rade ed irregolari, con matrice filamentosa e microgranulosa, e contenente ribosomi: b) sezione trasversale di un nervo motore della tunica muscolare, contenente un solo assone abbondantemente tunicato, provvisto di neurotubuli, mitocondri e vescicole di neurosecreto elettron-trasparente (se non è andato perduto nei processi di fissazione-inclusione).



Fig. 29 - Ampolla rettale di maschio vergine di 7 giorni di età: parte sub dorsale (al confine tra l'epitelio ghiandolare e quello pavimentoso della striscia dorsale) di sezione effettuata all'altezza del « sacco secretorio », mostrandone una cellula secertrice con grosso nucleo allungato, ed una cellula contigua fortemente appiattita e ricoperta da intima di spessore visibilmente maggiore che sulla cellula secertrice.

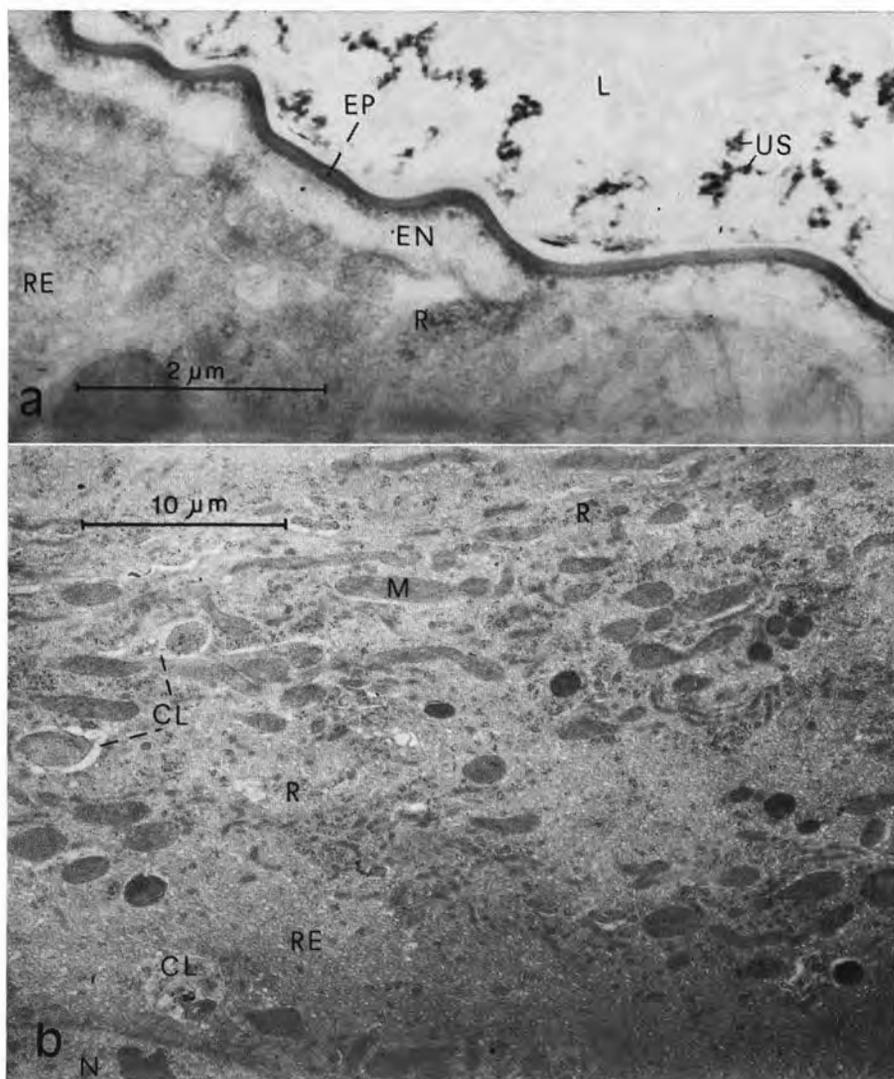


Fig. 30 - Particolari, a maggiore ingrandimento, della figura precedente: a) parte apicale della cellula secertrice con intima (si noti l'andamento di questa e della membrana plasmatica apicale); b) parte lateronucleare (lato basale a sinistra) della stessa cellula, mostrandone il grande sviluppo del reticolo endoplasmico liscio, la distribuzione in gruppi dei ribosomi, l'abbondanza di mitocondri (assai variabili, in sezione, per forma e per grandezza) e di citolisomi.

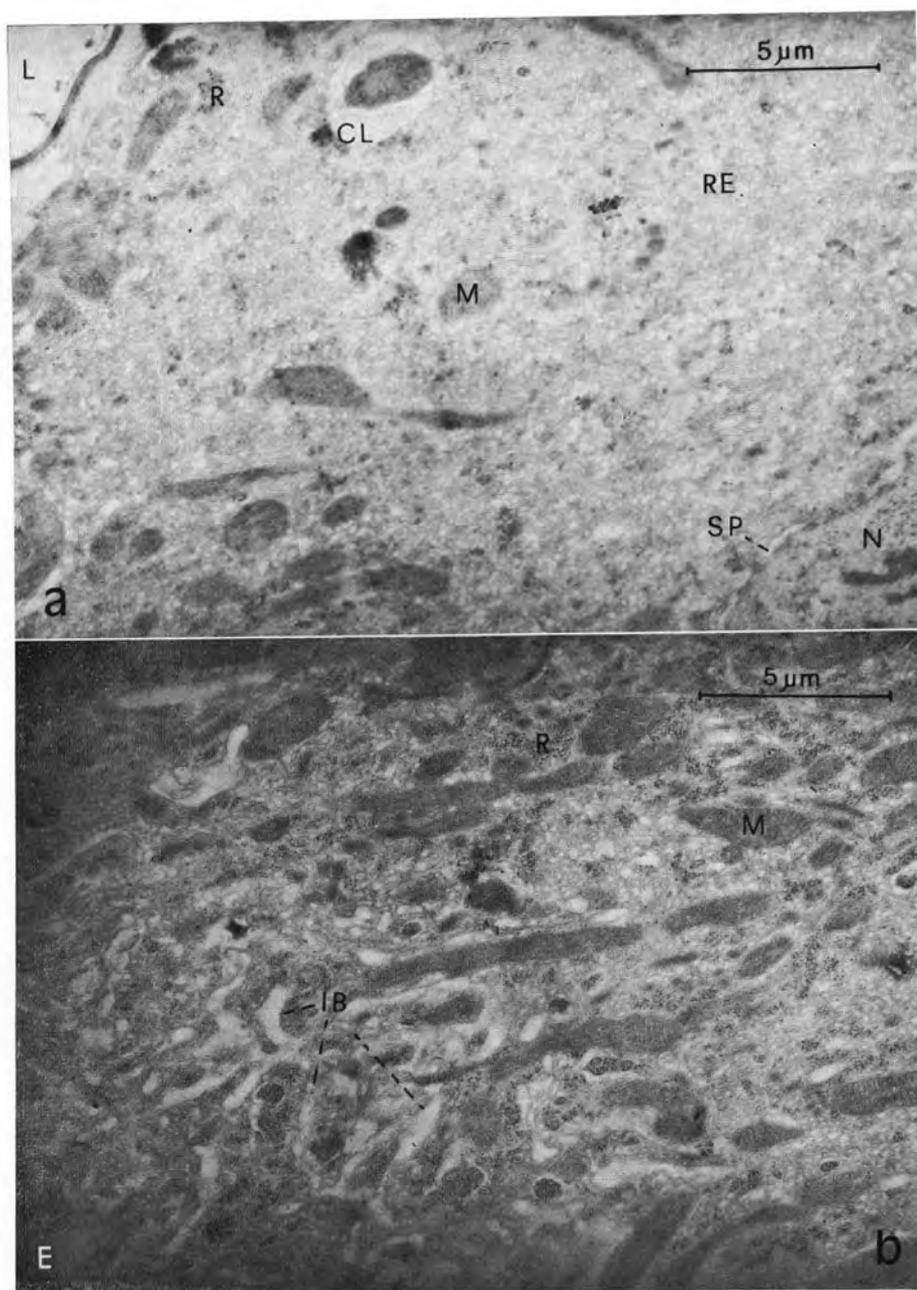


Fig. 31 - Particolari, a maggiore ingrandimento, della figura 29: a) parte sopranucleare ed apicale della cellula secertrice (si notino i rapporti nucleo-citoplasma); b) parte basale della stessa cellula mostrante, tra l'altro, il gran numero e la notevole profondità delle introflessioni della membrana plasmatica basale, alle quali risultano associati mitocondri di forma e grandezza varie e provvisti di creste serrate ed orientate per lo più trasversalmente all'asse dell'organello.

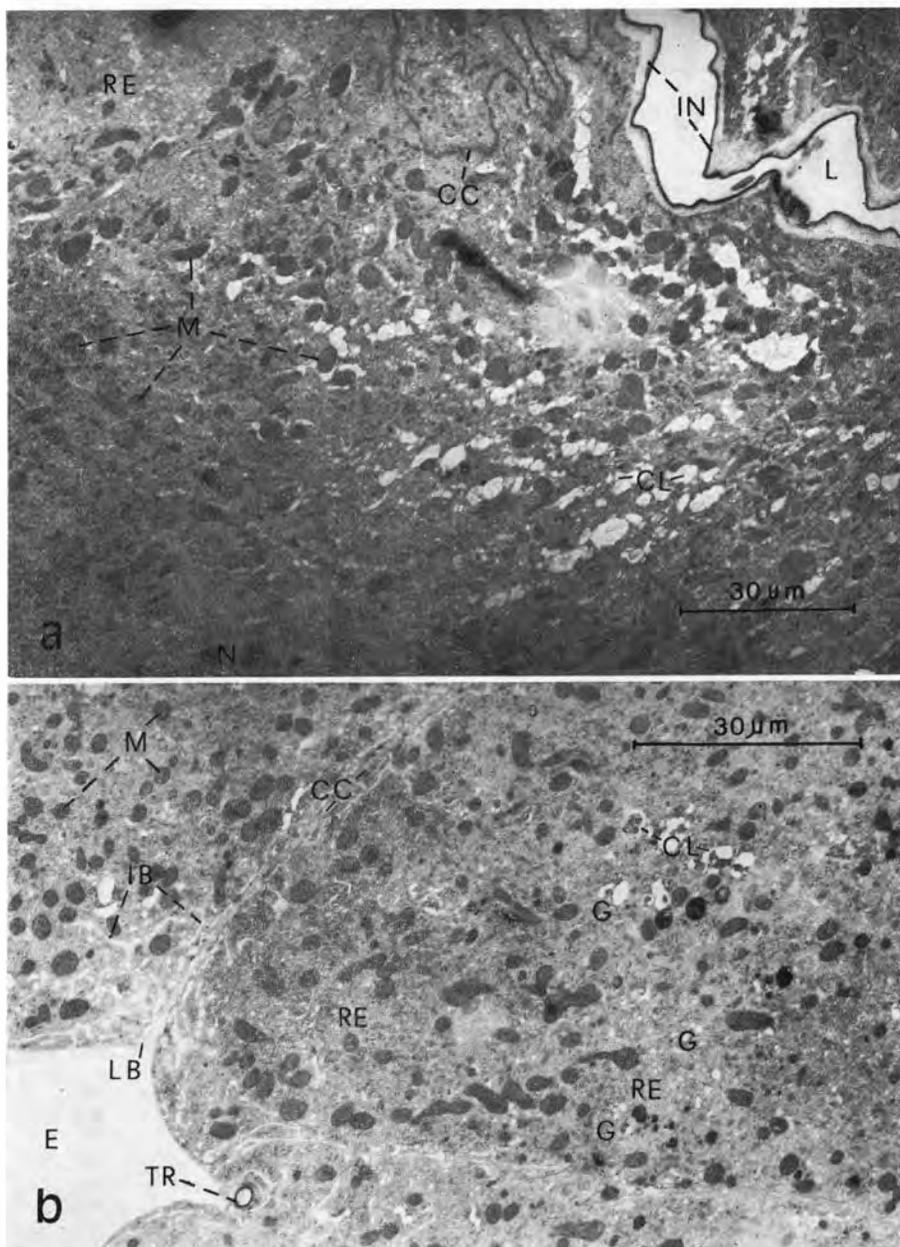


Fig. 32 - Ampolla rettale di maschio vergine di 7 giorni di età: particolari di sezione trasversale effettuata in corrispondenza del «sacco secretorio» e mostranti la parte apicale (a) e quella basale (b) di una cellula secertrice di detto sacco. Sono da notare, tra l'altro, il grande numero di citolisomi nella parte subapicale della cellula, e le numerose e profonde inflessioni della membrana plasmatica basale.

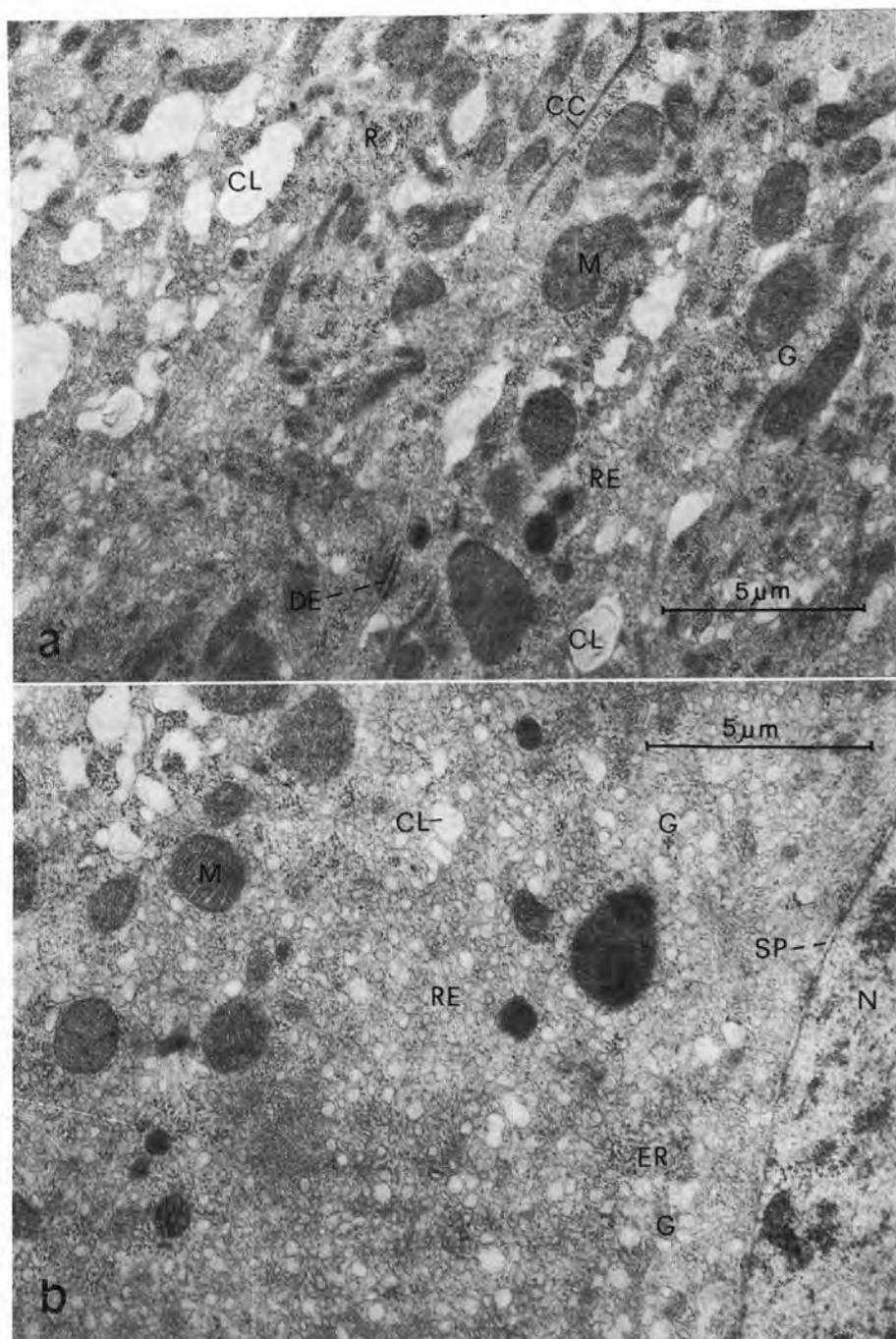


Fig. 33 - Particolari (a, subapicale e b, lateronucleare, della stessa cellula), a maggiore ingrandimento, della figura precedente, mostrandoti, tra l'altro, il grande sviluppo del reticolo endoplasmico liscio ed il passaggio quasi continuo da questo ai numerosi complessi di Golgi e quindi ai citolisomi. Sono da notare anche: l'intensità dei rapporti nucleo-citoplasma (b) e la distribuzione in gruppi del relativamente modesto numero di ribosomi.

nota 6) ed appaiono riuniti in gruppi (figg. 30, 31, 33, 34), con elementi liberi e poliribosomi. I complessi di Golgi (fig. 33) sono molto diffusi, tuttavia non sempre facilmente distinguibili, per il fatto che (almeno in base all'aspetto morfologico) si verifica un passaggio quasi continuo, dagli elementi del reticolo liscio alle cisterne del Golgi ed ai vacuoli autofagici (citolisomi). Questi ultimi risultano assai frequenti ovunque (figg. 29÷34), ma soprattutto nelle parti subapicale ed apicale della cellula (figg. 32a e 33); contengono materiale riferibile più spesso ad elementi del reticolo endoplasmico (fig. 30b) e (meno frequentemente) a mitocondri in disfacimento (figg. 30b, 31a), ma quasi sempre inglobano citomembrane (figg. 32a, 33a) che spesso (in sezione) appaiono disposte irregolarmente in cerchi concentrici (probabili ex « corpi mielinati »).

È da notare, inoltre, che gli elementi tubolari subapicali osservati nelle cellule dei maschi neosfarfallati non si ritrovano negli individui sessualmente maturi; così anche per i grossi vacuoli contenenti sostanze simili a lipidi, riscontrati in tutti i tipi di cellule (e anche nelle fibre muscolari) sopra esaminati: non si ritrovano negli esemplari sessualmente maturi.

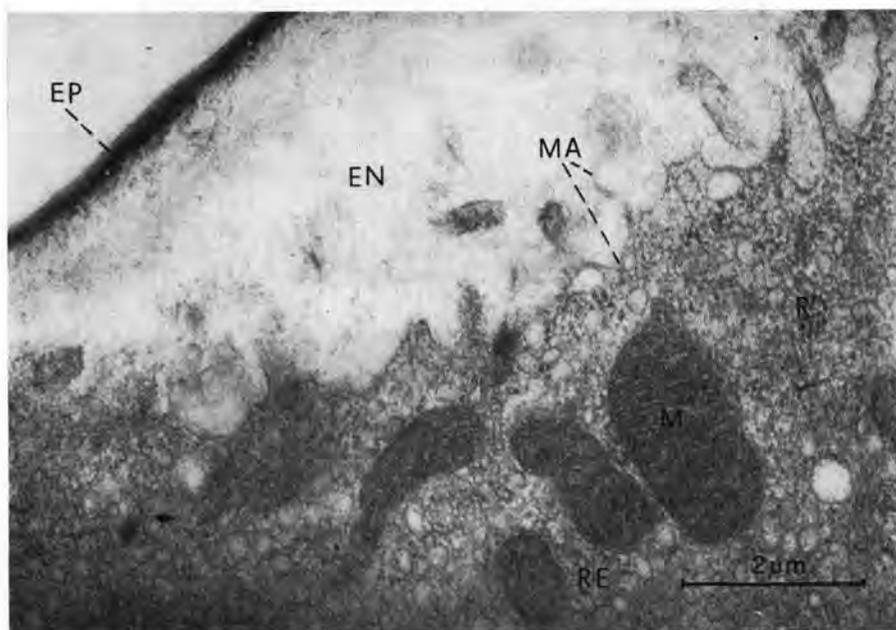


Fig. 34 - Particolare di sezione analoga a quella della figura 32, mostrandone la parte apicale di una cellula del « sacco secretorio » ricoperta di intima. Sono da notare, tra l'altro, la struttura fine dell'intima e l'andamento della membrana plasmatica apicale, visibilmente coinvolta nel comportamento microapocrino della cellula.

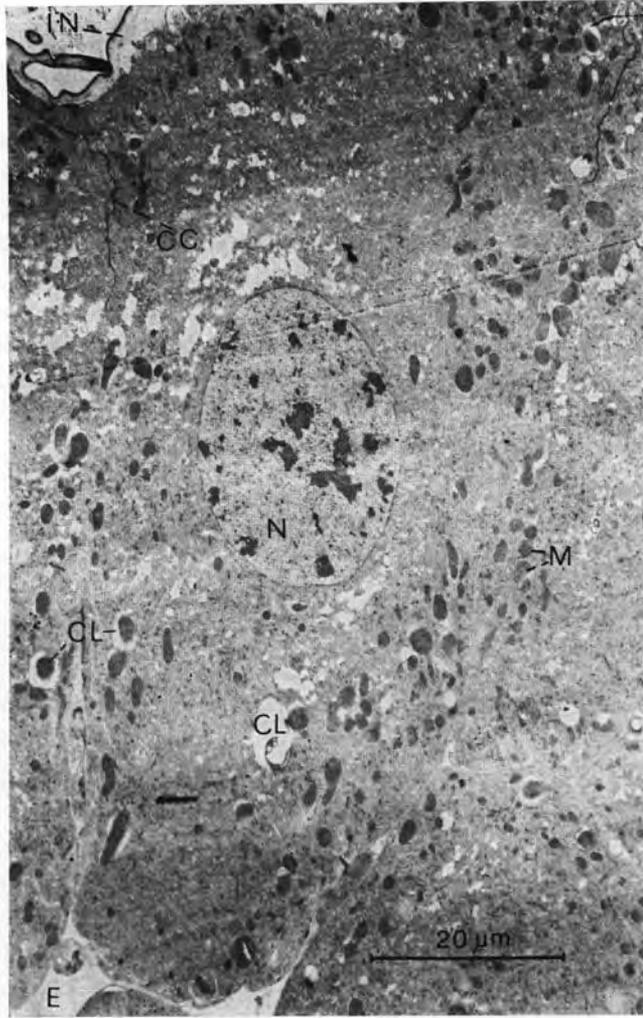


Fig. 35 - Ampolla rettale di maschio di 16 giorni di età, sacrificato 12 ore dopo la copula: settore subdorsale di sezione trasversale effettuata all'altezza del « sacco secretorio » mostrante alcune cellule secretrici ricoperte dall'intima e sostanzialmente identiche alla cellula secretrice della fig. 29, che si riferisce ad un maschio vergine di 7 giorni di età.

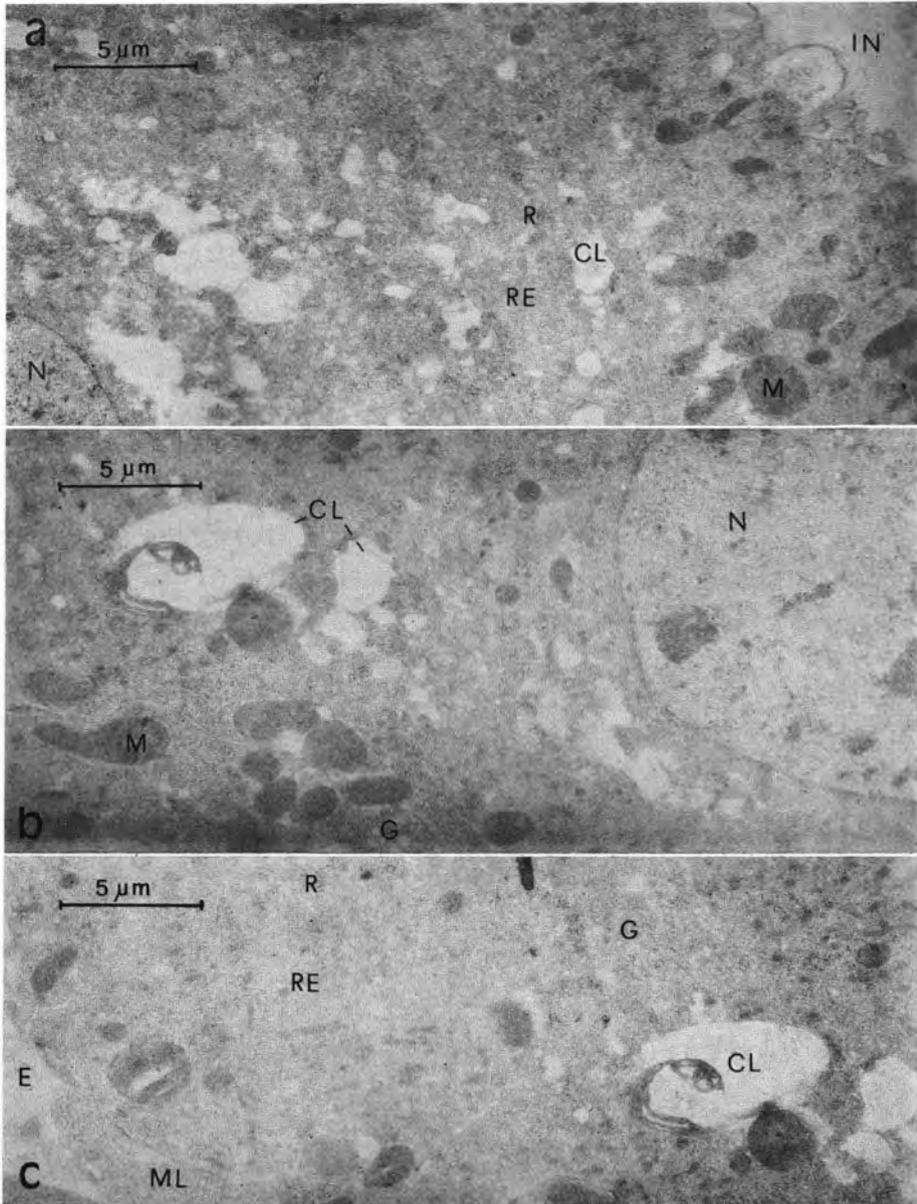


Fig. 36 - Particolari (a, sopranucleare ed apicale, b, lateronucleare, e c, basale, della stessa cellula secretrice), a maggiore ingrandimento, della figura precedente. Si noti la stretta somiglianza con i particolari delle figure 32 e 33, che si riferiscono ad un maschio vergine di 7 giorni di età.

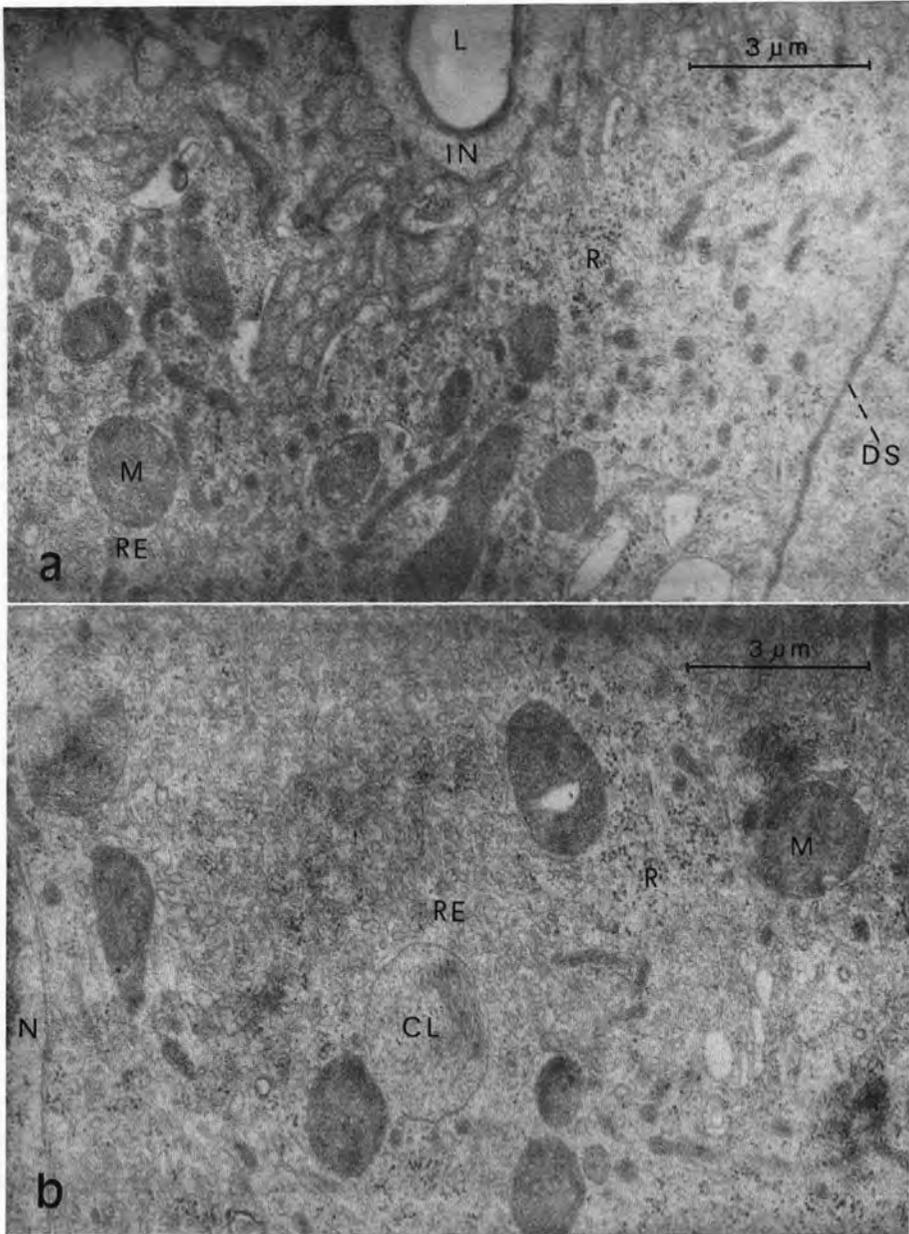


Fig. 37 - Ampolla rettale di maschio di 16 giorni di età, sacrificato 12 ore dopo la copula: sezione trasversale del « sacco secretorio », mostrandone un particolare apicale (a) ed uno lateronucleare (b) di una cellula secretrice. Si noti l'aspetto del reticolo endoplasmico liscio, sensibilmente modificato rispetto a quello delle figure 32 e 33, che si riferiscono ad un maschio vergine di 7 giorni di età.

c.3 - Nei maschi di 16 giorni di età, sacrificati 12 ore circa dopo il primo accoppiamento (figg. 35÷38), come pure nei maschi vergini di 28 giorni di età (fig. 39), le cellule dell'epitelio ghiandolare in questione non presentano differenze ultrastrutturali di rilievo rispetto a quelle dei maschi vergini di 7 giorni di età (ossia giunti appena alla maturità sessuale), fatta eccezione per il reticolo endoplasmico liscio delle cellule del « sacco secretorio ». Detto reticolo, infatti, negli esemplari di 7 giorni di vita (figg. 33 e 34) appare in sezione come una rete a maglie rotondeggianti, mentre negli individui più vecchi (sia in quelli accoppiati di 16 giorni di età: figg. 37 e 38; sia in quelli vergini di 28 giorni di età: fig. 39) si presenta come un groviglio di tubuli.

Ci sembra importante far notare che l'epitelio ghiandolare in questione, in tutti i casi da noi esaminati, si presenta, nello stesso soggetto, complessivamente abbastanza omogeneo. Tuttavia, le caratteristiche peculiari ultrastrutturali sopra illustrate risultano, nei singoli casi, più marcate nelle cellule del « sacco secretorio », come si può rilevare anche dal confronto delle figure

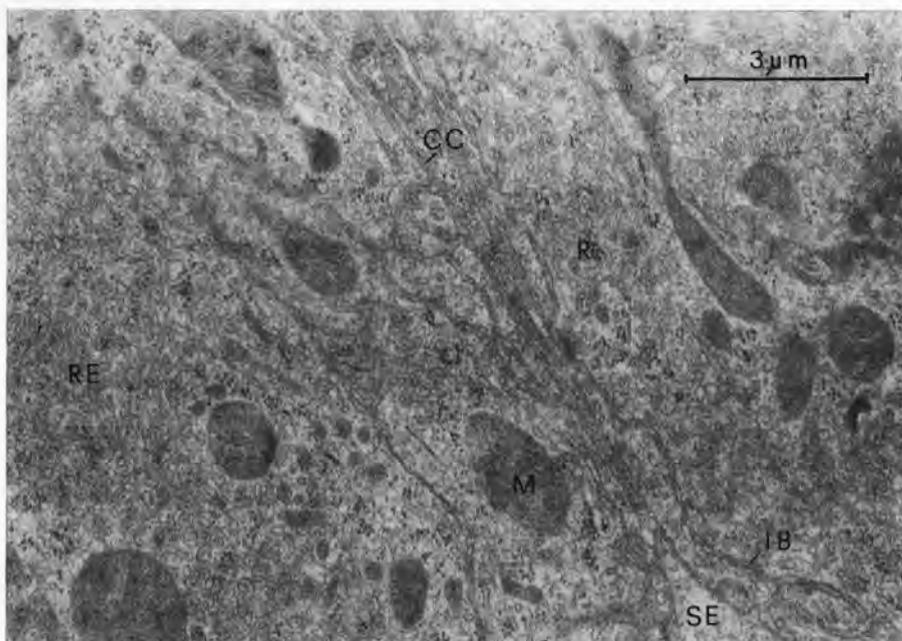


Fig. 38 - Parte basale della stessa cellula (a destra) della figura precedente e di un'altra cellula contigua. Si noti, oltre all'aspetto del reticolo endoplasmico, lo sviluppo delle inflessioni della membrana plasmatica basale, analogamente a quanto si verifica nell'epitelio pavimentoso (figg. 14b e 16a).

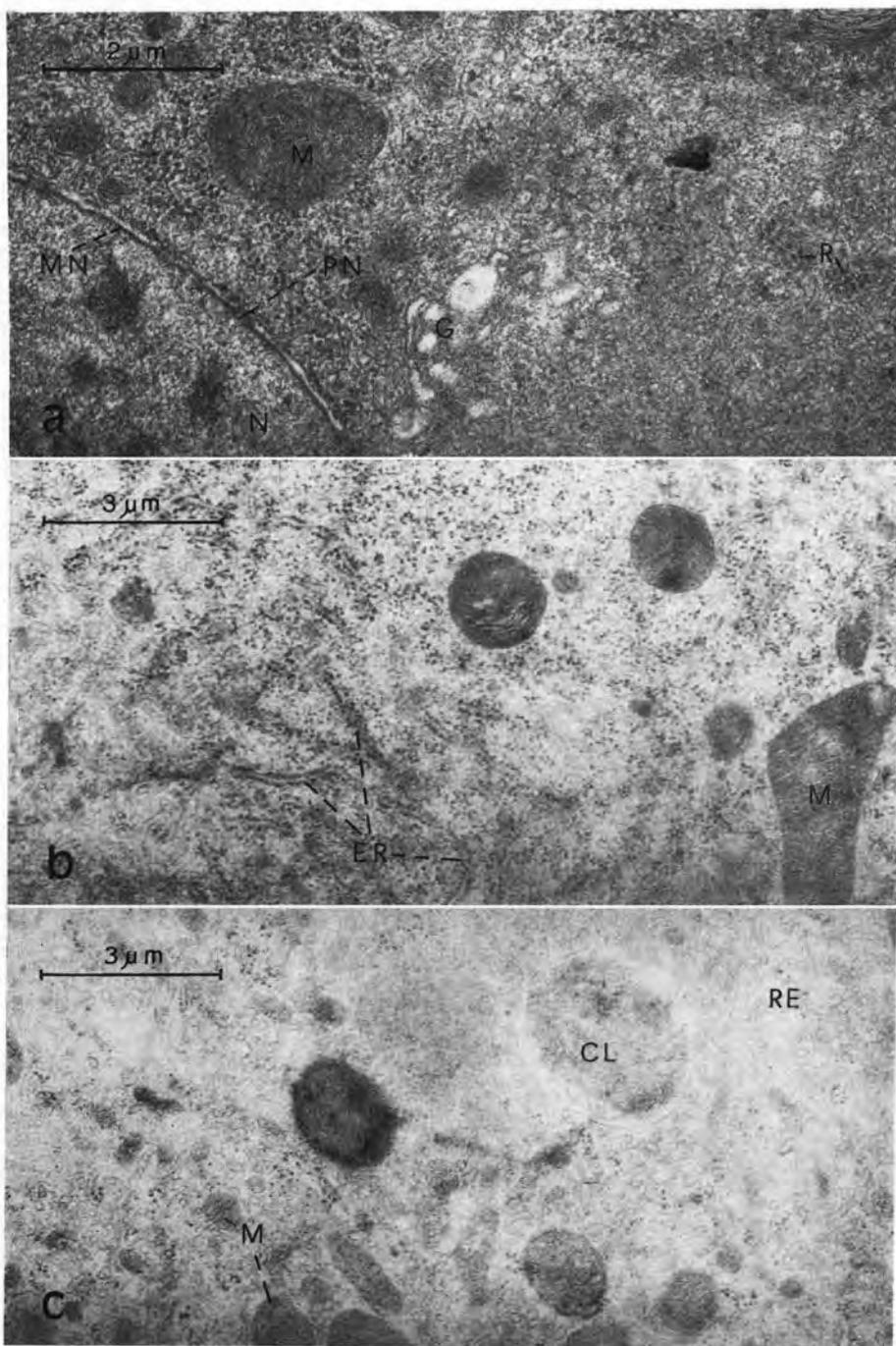


Fig. 39 - Ampolla rettale di maschio vergine di 28 giorni di età: sezione trasversale del «sacco secretorio» mostrante tre particolari (a, sopranucleare, b e c, lateronucleari) di una cellula secretrice. Sono da notare l'intensità dei rapporti nucleo-citoplasma (a), l'aspetto del reticolo endoplasmico liscio (identico a quello delle figure 37 e 38) ed i rapporti di questo con l'ergastoplasma (b).

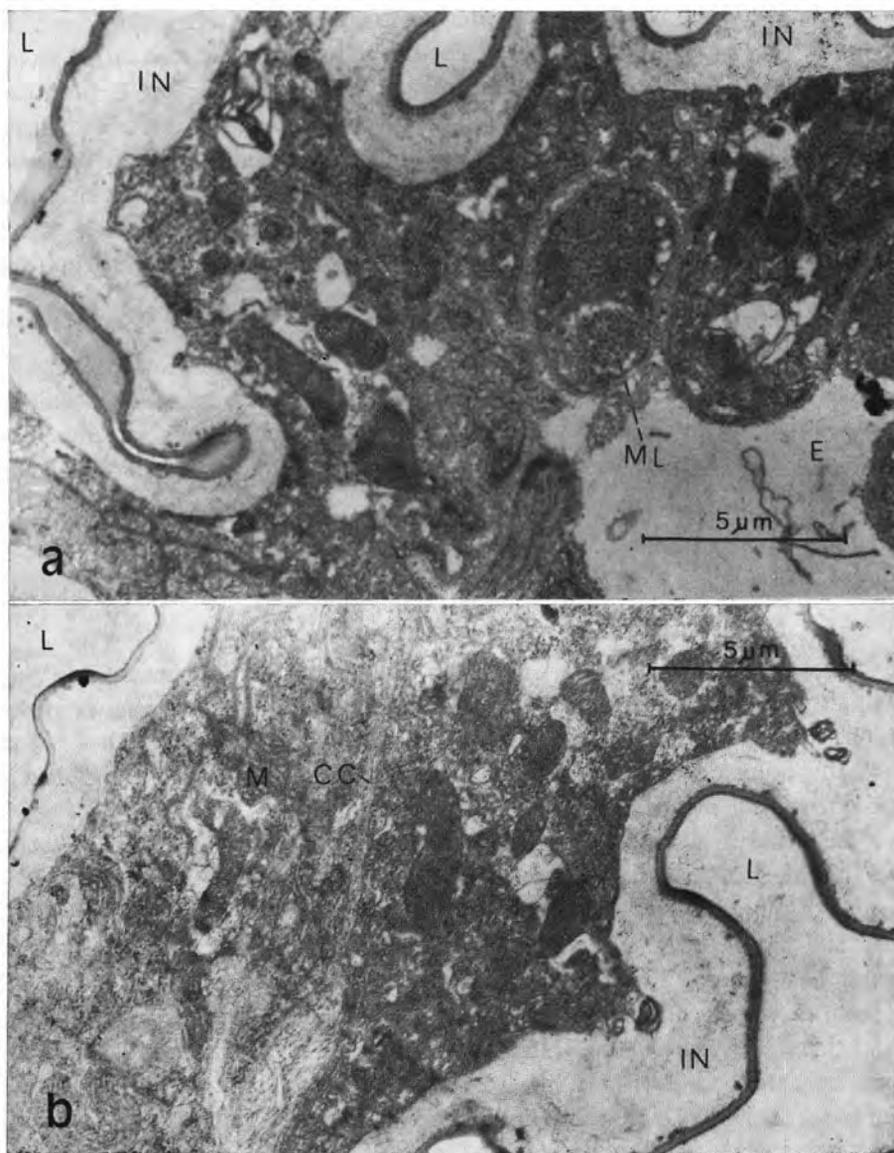


Fig. 40 - Tubo anale di maschio vergine di 28 giorni di età: particolari di sezione trasversale effettuata a metà lunghezza circa del tubo. Si notino lo spessore, relativamente cospicuo dell'intima e la struttura fine delle cellule epiteliali, molto simile a quella dell'epitelio pavimentoso dell'ampolla rettale (figg. 13-16).

26÷28, 32÷34 e 37-38, che si riferiscono al « sacco secretorio », con le figure 21÷25, 29÷31 e 35-36, che si riferiscono ai territori circostanti il sacco.

Il passaggio dall'epitelio pavimentoso a quello ghiandolare è piuttosto brusco e netto, come mostra anche la fig. 29. Non manca tuttavia qualche caso in cui, nell'epitelio ghiandolare, ricompaiono elementi tipici dell'epitelio pavimentoso, come, ad esempio, le introflessioni della membrana plasmatica basale che, in qualche cellula del « sacco secretorio » (fig. 38), risultano molto simili a quelle sopra descritte per le cellule relativamente spesse dell'epitelio pavimentoso (figg. 14b e 16a) (7).

d. - L'epitelio che tappezza il tubo anale è di tipo pavimentoso, con cellule che si presentano essenzialmente simili (sia nelle osservazioni al microscopio ottico, fig. 8, che in quelle all'elettronico, fig. 30), ma generalmente meno appiattite rispetto a quelle sopra descritte del terzo anteriore dell'ampolla rettale.

Osservazioni etologiche

I maschi del *Dacus oleae* presentano un periodo di vita immaginale pre-riproduttivo (CAVALLORO e DELRIO, 1971), durante il quale avviene la maturazione delle ghiandole genitali accessorie, condizione indispensabile (DE MARZO, NUZZACI, SOLINAS, l.c.) perché possa iniziare e svolgersi normalmente l'attività riproduttiva dei medesimi.

Nelle nostre condizioni di esperienza, tale periodo preriproduttivo è stato di 7 giorni circa (con una frequenza crescente, da dicembre a febbraio, anche di casi di 10 giorni ed oltre), durante i quali i maschi del *Dacus* non manifestavano alcuna attività sessuale e non diffondevano nelle gabbie di allevamento alcun odore caratteristico. Nello stesso periodo (come in parte già riferito) si verificava nell'ampolla rettale degli stessi maschi un graduale accumulo della « sostanza oleosa » sopra descritta, la quale, inizialmente (cioè allo sfarfallamento) risultava visibile solo nelle sezioni istologiche, mentre nei giorni successivi era facilmente individuabile, anche al microscopio stereoscopico, nel fondo dell'ampolla, fino ad occuparne 1/3 (o anche di più) del volume, negli esemplari giunti alla piena maturità sessuale.

(7) Un comportamento simile della membrana plasmatica basale è stato trovato anche nel mesentero di *Reticulitermes lucifugus* Rossi (BACCETTI, 1961).

Il primo segnale che il periodo preriproduttivo era trascorso, era dato da un odore caratteristico, vagamente ammoniacale, noto agli Studiosi (si veda l'Introduzione), che emanava dalle gabbie di allevamento dei maschi del *D. oleae* durante le ultime ore di luce diurna, ossia nel periodo in cui si svolge in natura l'attività sessuale della specie. Lo stesso odore (come sopra accennato) si sentiva per pochi secondi (poi svaniva) schiacciando tra le dita e fiutando singole ampolle rettali estratte dagli stessi maschi in quelle stesse ore del giorno. Detto odore non si riscontrava, invece, in tali allevamenti, né nella grande maggioranza delle ampolle rettali, in ore del giorno diverse da quelle sopra indicate.

Parallelamente alla gradualità di accumulo della « sostanza oleosa » non abbiamo riscontrato, nelle stesse ampolle rettali, una gradualità di comparsa dell'« odore sessuale » maschile. Quest'ultimo era chiaramente distinguibile solo nelle ampolle rettali dei maschi sessualmente maturi.

Contemporaneamente all'« odore sessuale », proveniva dalle gabbie dei maschi sessualmente maturi il ronzio, abbastanza caratteristico, emesso dagli stessi mediante sfregamento delle ali sulle setole del terzo urotergite, e considerato dagli Studiosi (si veda l'Introduzione) un richiamo sessuale acustico.

Detti maschi, col diminuire della luce del giorno, apparivano sempre più irrequieti ed eccitati e, messi insieme con femmine vergini coetanee, esibivano insistenti corteggiamenti che si concludevano più o meno spesso con la copula; mentre, in assenza di femmine, essi compivano frequenti tentativi di accoppiarsi tra loro. La percentuale di accoppiamenti che si verificavano tra maschi e femmine vergini di 10 ÷ 20 giorni di età, messi insieme appena prima delle ore di attività sessuale, era di circa il 90% nei mesi di settembre e ottobre, mentre scendeva gradualmente nei mesi successivi, fino a giungere sotto il 10% nel mese di febbraio. Tale comportamento dipendeva direttamente dallo stato di maturità o meno degli ovari nelle femmine e, in misura minore, delle ghiandole genitali accessorie nei maschi. La grande maggioranza degli accoppiamenti si verificava al crepuscolo. O meglio, le singole copule iniziavano negli ultimi 15 ÷ 20 minuti di luce diurna e poi andavano avanti per una durata variabile, da poche decine di minuti a qualche ora. Al buio non si formavano più nuove coppie.

Per saggiare il potere attrattivo dei maschi del *D. oleae* nei confronti delle femmine, sono state effettuate venti prove olfattometriche in venti giorni diversi, tra loro variamente distanziate, dalla terza decade di dicembre 1977 a metà febbraio '78, utilizzando sempre lo stesso olfattometro, secondo i metodi e con i materiali sopra descritti.

I risultati più importanti di dette prove sono riassunti nella tabella seguente:

Posi- zione trap- pole	Materiale impiegato come esca										Testimoni	
	Maschi neofarfallati		Maschi sessualmente maturi						Ampolle rettali di maschi sessualmente maturi			
			normali		separati da diaframma polietilene		dealati					
	Media femmine catturate	Numero ripetizioni	Media femmine catturate	Numero ripetizioni	Media femmine catturate	Numero ripetizioni	Media femmine catturate	Numero ripetizioni	Media femmine catturate	Numero ripetizioni	Media femmine catturate	Numero ripetizioni
A											2,6	20
B			31,5	4	2	1	7	1			2,6	14
C	0	1	1	2			7	1			1,6	16
D	0	1	2	1	1	1	1,3	3	1	2	0,6	11
E			1	1							0,4	19
F			10,7	7			4	2			0,4	10
G	0	1	8,7	4							0,5	15
H					1	1	5	1	1,5	4	1,3	14

Le cifre della tabella indicano, per ciascuna trappola (A, B, . . . , H; si veda la fig. 1), la media (colonne dispari), su un dato numero di ripetizioni (colonne pari), di femmine richiamate (catturate) da un determinato tipo di esca (maschi neofarfallati; maschi sessualmente maturi: in condizioni normali, separati verso la gabbia da un sottile diaframma di polietilene, privati delle ali; ampolle rettali schiacciate su un disco di carta bibula, appena estratte da maschi sessualmente maturi, sacrificati all'inizio dell'orario di attività sessuale) o dal relativo testimone (stessa trappola priva di esca).

I dati della tabella esprimono chiaramente che, nelle surriportate condizioni di esperienza, le femmine sessualmente recettive del *D. oleae* vengono attratte:

- niente affatto (seppure non repulse) dai maschi neofarfallati;
- fortemente⁽⁸⁾ dai maschi sessualmente maturi innescati in trappole normali;

(8) In questo caso, in un'ora circa, dalla gabbia-olfattometro venivano estratte quasi tutte le femmine sessualmente mature, le quali nei nostri allevamenti (come sopra accennato) risultavano in percentuale relativamente modesta, nel periodo in cui venivano effettuate le prove olfattometriche. Infatti, se si ripeteva il giorno dopo una prova con le femmine della stessa gabbia, si ripeteva anche il risultato positivo solamente se venivano rimesse nella gabbia le femmine estratte con la prova del giorno precedente, altrimenti il risultato era negativo (o quasi).

- *niente affatto* dai maschi sessualmente maturi, i quali potevano inviare solamente il richiamo sessuale acustico;
- *mediocrementemente* dai maschi sessualmente maturi privati delle ali (dunque della possibilità di emettere il richiamo sessuale acustico);
- *debolmente* dalle ampolle rettali dei maschi sessualmente maturi.

Il risultato modesto ottenuto con le ampolle rettali sembra da attribuirsi all'estrema volatilità della sostanza attrattiva, la quale praticamente s'identifica con l'« odore sessuale » che, come già riferito, all'aria si esaurisce rapidamente.

La forte variabilità tra i risultati delle trappole-testimone dimostra la grande importanza che ha la posizione di ciascuna trappola nell'olfattometro (fig. 1) in relazione alla provenienza della luce. Ciò spiega anche la notevole variabilità di efficacia di una stessa esca nelle diverse trappole.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati delle nostre osservazioni anatomiche ed istologiche sul retto del maschio di *Dacus oleae* sostanzialmente confermano conoscenze precedentemente acquisite per altri Insetti e per il *D. oleae* stesso riguardo al proctodeo in generale (BACCETTI, 1960 e 1962) ed al retto in particolare (BACCETTI, MAZZI e MASSIMELLO, 1963; ECONOMOPOULOS, GIANNAKAKIS, TZANAKAKIS, VOYAOJOLOU, 1971; SCHULTZ e BUSH, 1971). Le indagini al microscopio elettronico confermano, in parte, precedenti osservazioni (BACCETTI e Coll., 1963; GUPTA e BARRIDGE, 1966; NOIROT e NOIROT, 1960) e recano nuove conoscenze soprattutto riguardo alla ultrastruttura ed alla fisiologia della tunica muscolare e dei diversi tipi di epitelio del retto, e particolarmente dell'epitelio ghiandolare dell'ampolla rettale.

Riguardo alla tunica muscolare del retto, le nostre osservazioni ultrastrutturali mettono in luce:

- a) in base alla presenza di filamenti di actina collegati a desmosomi posti tra fibre muscolari contigue, la proprietà miogenica di dette fibre, ossia la capacità delle medesime di compiere contrazioni ritmiche anche senza intervento di stimolo nervoso;
- b) in base alla presenza di dischi Z perforati, la supercontrattilità di tali fibre muscolari;
- c) in base al notevole sviluppo del sistema tubulare trasverso e del reticolo sarcoplasmico, la notevole efficienza dei muscoli in questione.

Questi fatti denotano che il retto ha un funzionamento espulsorio particolarmente idoneo alla emissione graduale (intermittente) ma energica e com-

pleta di sostanze che debbono essere diffuse il più ampiamente possibile nell'ambiente circostante.

Riguardo ai diversi tipi di epitelio che tappezzano il retto, le nostre osservazioni ultrastrutturali mettono in luce che il tratto anteriore del retto fino all'imboccatura dell'ampolla, in base alla presenza nelle cellule epiteliali di numerose e profonde introflessioni delle membrane plasmatiche apicale e basale, cui risulta strettamente associato un grande numero di mitocondri, esplica un ruolo importante (così pure il colon) nell'assorbimento di acqua e di altre sostanze provenienti soprattutto dai tubi malpighiani.

Nel terzo anteriore (esclusa l'imboccatura) e lungo una striscia dorsale dell'ampolla rettale, la semplificazione e rarefazione più o meno spinta delle ultrastrutture assorbenti nelle cellule epiteliali indicano un ruolo quasi esclusivamente di contenitore dinamico (condotto) per detta parte dell'intestino, dove, pure essendo consentito un facile transito di acqua (dal lume intestinale all'emocele e viceversa), il recupero selettivo di ioni minerali è affidato alle papille rettali.

Lo studio comparato dell'ultrastruttura dell'epitelio già segnalato (si veda l'Introduzione) come ghiandolare (soprattutto del « sacco secretorio ») nei maschi neosfarfallati ed in quelli sessualmente maturi e di età diverse (7, 16 e 28 giorni), vergini o dopo essersi accoppiati, conferma che detto epitelio esplica funzione secernente durante l'intera vita immaginale del soggetto; ma mette anche in evidenza che, nel complesso, i prodotti di secrezione non sono gli stessi durante il periodo preriproduttivo e nella piena maturità sessuale dello stesso soggetto. Ciò trova riscontro anche nel fatto che, durante il periodo immaginale preriproduttivo, ha luogo la produzione ed il graduale accumulo nell'ampolla rettale della « sostanza oleosa » soltanto (senza l'« odore sessuale » maschile); mentre nei soggetti sessualmente maturi, alla produzione della « sostanza oleosa » si aggiunge quella delle sostanze che costituiscono l'« odore sessuale » maschile. E questo avviene indipendentemente dal fatto che il maschio sessualmente maturo sia vergine o che abbia compiuto accoppiamenti, e per tutto il resto della vita immaginale.

Le osservazioni etologiche e particolarmente le prove olfattometriche concordano con i reperti anatomici, istologici, ultrastrutturali e fisiologici; questi e quelle reciprocamente si integrano e permettono di raggiungere gli obiettivi del presente lavoro. Dal confronto critico e dal coordinamento dei risultati sopra esposti chiaramente emergono le risposte ai quesiti (si veda l'Introduzione) rimasti finora aperti:

- a) l'odore emesso dai maschi del *Dacus oleae* durante l'attività sessuale s'identifica sostanzialmente col feromone sessuale maschile;
- b) quest'ultimo è strettamente associato alla « sostanza oleosa », la quale

- serve da veicolo alla frazione biologicamente attiva (analogamente a quanto osservato da FLETCHER, in *Dacus tryoni*);
- c) l'ampolla rettale è la sede di produzione e di conservazione della « sostanza oleosa » e del feromone sessuale.

RIASSUNTO

La produzione e la conservazione di feromoni sessuali in ghiandole associate all'ampolla rettale, messa in luce per la prima volta da FLETCHER (1968) nel maschio *Dacus tryoni* (Froggatt), è stata anche ipotizzata (SCHULTZ e BUSH, 1971; ECONOMOPOULOS, GIANNAKAKIS, TZANAKAKIS, VOYADJOGLOU, 1971) per il *Dacus oleae* Gmel. Il presente lavoro, attraverso indagini anatomiche, istologiche, ultrastrutturali e fisiologiche, unitamente ad osservazioni etologiche complementari, conferma detta ipotesi. In particolare, i risultati delle ricerche di anatomia, istologia, ultrastruttura e fisiologia del retto di *Dacus oleae* mettono in luce: a) un'organizzazione funzionale della tunica muscolare rettale particolarmente idonea per attuare un'espulsione graduale (intermittente) ed energica di sostanze che (come i feromoni sessuali) debbono essere diffuse il più ampiamente possibile nell'aria circostante; b) la presenza di tipi morfologicamente e fisiologicamente diversi di epitelio: uno tipicamente assorbente, nel tratto anteriore del retto e fino all'imboccatura dell'ampolla rettale; uno « di transizione », in corrispondenza dell'origine delle papille rettali; uno pavimentoso, nel terzo anteriore (esclusa l'imboccatura) e lungo una striscia dorsale dell'ampolla rettale e nel tubo anale; ed uno tipicamente ghiandolare, nella parte mediana e posteriore dell'ampolla rettale.

L'epitelio ghiandolare nei maschi sessualmente immaturi secerne una « sostanza oleosa » inodora; mentre nei maschi sessualmente maturi, insieme con la « sostanza oleosa » esso produce altre sostanze dall'odore (vagamente ammoniacale) noto come « odore sessuale » del maschio di *D. oleae*.

Le osservazioni etologiche e particolarmente quelle olfattometriche dimostrano che i maschi durante le ore (pomeridiane e crepuscolari) di attività sessuale della specie, attirano fortemente le femmine mediante un feromone sessuale. Il confronto critico ed il coordinamento dei risultati delle diverse indagini chiaramente evidenziano che l'« odore sessuale » del maschio di *D. oleae* s'identifica col feromone sessuale del medesimo, e che la « sostanza oleosa » funge da veicolo (« carrier ») al feromone.

SUMMARY

ANATOMICAL, HISTOLOGICAL, ULTRASTRUCTURAL AND PHYSIOLOGICAL STUDY OF THE RECTUM AND ETHOLOGICAL OBSERVATIONS IN RELATION TO THE HYPOTHETICAL SEX PHEROMONE PRODUCTION BY THE MALE OF *Dacus oleae* GMEL.

The production and storage of a sex pheromone in glands associated with the rectum, described for the first time by FLETCHER (1968) in the male of *Dacus tryoni* (Froggatt),

has been hypothesized (SCHULTZ and BUSH, 1971; ECONOMOPOULUS, GIANNAKAKIS, TZANAKAKIS, VOYADJOGLOU, 1971) also for *Dacus oleae* Gmel. This paper proves that the said hypothesis is correct on anatomical, histological, ultrastructural and physiological ground, together with complementary ethological observations. In particular, the results of the anatomical, histological, ultrastructural and physiological observations on *D. oleae* rectum bring to light: *i*) a functional organization of the rectal muscular coat, particularly suitable for accomplishing gradual (intermittent) but vigorous expulsion of some substances, that (like sex pheromones) must be diffused as widely as possible, in the environment air; *ii*) four morphologically and physiologically different types of epithelium: a typical absorbent epithelium, from the rectal valve to the opening of the rectal ampulla; an epithelium «of transition», among the bases of the rectal papillae; a squamous epithelium, in the fore third (except the opening) and along a dorsal strip of the rectal ampulla, and in the anal tube; and a typical glandular epithelium, which lines the mid and hind parts of the rectal ampulla.

In sexually immature males, the glandular epithelium secretes an «oily substance» without any odor, while in sexually mature males, the said epithelium secretes together with the «oily substance», other substances with an odor (vaguely ammoniacal) well-known as «sex odor» of the *D. oleae* males.

The ethological observations, particularly the olfactometric ones, prove that *D. oleae* males strongly attract females by a sex pheromone, at the time of the day when the species is sexually active.

Critical comparison and integration of the results obtained thus far, clearly show that *D. oleae* male «sex odor» is the same as the sex pheromone, and that the «oily substance» may act as a carrier for this very much volatile pheromone.

BIBLIOGRAFIA

- BACCETTI, B., 1960 - Ricerche sull'ultrastruttura dell'intestino degli Insetti. I. L'ileo di un Ortottero adulto. *Redia*, XLV, pp. 263-278.
- BACCETTI B., 1962 - Ricerche sull'ultrastruttura dell'intestino degli Insetti. III. Il Mesentero ed il colon nell'operaio di *Reticulitermes lucifugus* Rossi. Atti IV Congr. U.I.E.I.S., Pavia (9-14 sett. 1961), pp. 230-255.
- BACCETTI B., MAZZI e MASSIMELLO G., 1963 - Ricerche sull'ultrastruttura dell'intestino degli Insetti. V. Studio istochimico e al microscopio elettronico dell'ampolla rettale di *Dacus oleae* Gmel. *Redia*, vol. XLVIII, pp. 265-287.
- BROWN B. E., NAGAI T., 1969 - Insect visceral muscle. Neural relations of the proctodeal muscles of the cockroach. *J. Insect Physiol.*, vol. 15, pp. 1767-1783.
- CAVALLORO R., DELRIO G., 1971 - Rilievi sul comportamento sessuale di *Dacus oleae* Gmelin (*Diptera, Trypetidae*) in laboratorio. *Redia*, vol. LII, pp. 201-230.
- CROSSLEY A. C., WATERHOUSE D. F., 1969 - The ultrastructure of a pheromone - secreting gland in the male Scorpion - fly *Harpobittacus australis* (*Bittacidae: Mecoptera*). *Tissue & Cell*, vol. 1, pp. 273-294.
- DEGHEELE D., HERTVELDT L., 1974 - Anatomical and histological study of the cabbage root fly *Hylemya brassicae rectum* on the occurrence of a pheromone gland. *Med. Fac. Land. Rij. Gent*, vol. 39, pp. 1394-1398.

- DE MARZO L., NUZZACI G., SOLINAS M., 1976 - Aspetti anatomici, strutturali, ultrastrutturali e fisiologici delle ghiandole genitali accessorie del maschio di *Dacus oleae* Gmel. in relazione alla maturità ed all'attività sessuale. *Entomologica*, vol. XII, pp. 213-240.
- DEVINE C. E., SOMLYO A. P., 1971 - Thick filaments in vascular smooth muscle. *J. Cell Biol.*, vol. 49, pp. 636-649.
- DUVE DE C., WATTIAUX R., 1966 - Functions of lysosomes. *A. Rev. Physiol.*, vol. 28, pp. 435-491.
- ECONOMOPOULOS A. P., GIANNAKAKIS A., TZANAKAKIS M. E., VOYADJOGLOU A. V., 1971 - Reproductive Behavior and Physiology of the Olive Fruit Fly. 1. Anatomy of the adult Rectum and Odors Emitted by Adults. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, vol. 64, pp. 112-116.
- EISNER T., MC HENRY F., SALPETER M. M., 1964 - Defense mechanisms of Arthropods. XV. Morphology of the quinone - producing glands of a tenebrionid beetle (*Eleodes longicollis* Lec.). *J. Morph.*, vol. 115, pp. 355-399.
- ELDER H. Y., 1975 - Muscle Structure - In Usherwood P.N.R. - Insect Muscle. Acad. Press, London, New York, San Francisco.
- FERON M., 1960 - L'appel sonore du mâle dans le comportement sexuel de *Dacus oleae* Gmel. *Bull. Soc. ent. Fr.*, vol. 65, pp. 139-143.
- FERON M., ANDRIEU A. J., 1962 - Etude des signaux acoustiques du mâle dans le comportement sexuel de *Dacus oleae* Gmel. (*Diptera, Trypetidae*). *Ann. Epiphyt.* (Paris), vol. 13, pp. 269-276.
- FLETCHER B. S., 1968 - Storage and release of a sex pheromone by the Queensland fruit fly, *Dacus tryoni* (*Dipt. Trypetidae*). *Nature*, vol. 219, pp. 631-632.
- FLETCHER B. S., 1969 - The structure and function of the sex pheromone glands of the male Queensland fruit fly, *Dacus tryoni*. *J. Insect Physiol.*, vol. 15, pp. 1309-1322.
- GUPTA B. L., BARRIDGE M. J., 1966 - Fine structural organization of the rectum in the blowfly, *Calliphora erythrocephala* (Meig.) with special reference to connective tissue, tracheae and neurosecretory innervation in the rectal papillae. *J. Morph.*, vol. 120, pp. 23-82.
- GUPTA B. L., SMITH D. S., 1969 - Fine structural organization of the spermatheca in the Cockroach, *Periplaneta americana*. *Tissue Et Cell*, vol. 1, pp. 295-324.
- HANIOTAKIS G. E., 1974 - Sexual Attraction in the Olive Fruit Fly, *Dacus oleae* (Gmelin). *Envir. Entomolog.*, vol. 3, pp. 82-86.
- HANIOTAKIS G. E., 1977 - Male olive fly attraction to virgin females in the field. *Ann. Zool. Ecol. Anim.*, vol. 9, pp. 273-276.
- HANIOTAKIS G. E., MAZOMENOS B. E., TUMLINSON J. H., 1977 - A sex attractant of the olive fruit fly, *Dacus oleae* and its biological activity under laboratory and field conditions. *Ent. exp. & appl.*, vol. 21, pp. 81-87.
- HOLTZMAN E., 1976 - Lysosomes: A Survey. *Cell Biology Monographs*, vol. 3. Springer-Verlag, Wien-New York.
- KOBAYASHI R. M., OHINATA K., CHAMBERS D. L., FUJIMOTO M. S., 1978 - Sex Pheromones of the Oriental Fruit fly and the Melon Fly. Mating Behavior, Bioassay Method, and Attraction of Females by Live Males and by Suspected Pheromone Glands of Males. *Environm. Entomol.*, vol. 7, pp. 107-112.
- LHOSTE J., ROCHE A., 1960 - Organes odoriférants des mâles de *Ceratitis capitata*. *Bull. Soc. Entomol. Fr.*, vol. 65, pp. 206-210.
- MONTALENTI G., 1932 - Gli enzimi dirigenti e l'assorbimento delle sostanze solubili nell'intestino delle Termiti. *Arch. Zool. Ital.*, XVI, pp. 859-864.
- NAGAI T., 1970 - Insect visceral muscle. Responses of the proctodeal muscles to mechanical stretch. *J. Insect Physiol.*, vol. 16, pp. 437-448.
- NAGAI T., BROWN B. E., 1969 - Insect visceral muscle. Electrical potentials and contraction in fibres of the cockroach proctodeum. *J. Insect Physiol.*, vol. 15, pp. 2151-2167.

- NATION J.L., 1972 - Courtship behavior and evidence for a sex attractant in the male Carribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa*. *Ann. Ent. Soc. Am.*, vol. 65, pp. 1364-1368.
- NATION J.L., 1975 - The sex pheromone blend of Carribbean fruit fly, males: Isolation, biological activity, and partial chemical characterization. *Environ. Entomol.*, vol. 4, pp. 27-30.
- NOIROT M.C. e NOIROT C., 1960 - Mise en évidence d'ultrastructures absorbantes dans l'intestin postérieur des insects. *Compt. Rend. Séanc. Académie Science*, CCLI, pp. 2779-2781.
- NOIROT C. & NOIROT-TIMOTHEE C. 1965 - Organisation de la glande sternale chez *Calotermes flavicollis* F. (*Insecta, Isoptera*). Etude au microscope électronique. *C. r. hebdomadaire Séanc. Acad. Sci.*, Paris, vol. CCLX, pp. 6202-6204.
- RICE M. J., 1970 - Supercontracting and non-supercontracting visceral muscles in the Tsetse Fly, *Glossina austeni*. *J. Insect Physiol.*, vol. 16, pp. 1109-1122.
- SATIR P., STUART A.M., 1965 - A new apical microtubule-associated organelle in the sternal gland of *Zootermopsis nevadensis* (Hagen), *Isoptera*. *J. Cell. Biol.*, vol. 24, pp. 277-283.
- SCHULTZ G.A., BOUSH G.M., 1971 - Suspected Sex Pheromone Glands in Three Economically Important Species of *Dacus*. *J. Econ. Entomol.*, vol. 64, pp. 347-349.
- SMITH D.S., 1968 - Insect cells, their structure and fuction. Oliver and Boyd, Edimburgh.
- THREADGOLD L.T., 1976 - The ultrastructure of the animal cell. II ed., Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, Sydney, Paris, Frankfurt.
- WAHLEY W.G., 1975 - The Golgi Apparatus - Cell Biology Monographs, vol. 2. Springer-Verlag, Wien-New York.
- WIGGLESWORTH V.B., 1974 - The Principles of Insect Physiology. VII ediz., Chapman and Hall, London.