

pianti costosi di macchinario e molto minore spesa di mano d'opera; in quanto il bozzolo appena acquistato potrà subito essere messo sui graticci che verranno introdotti nella camera di moritura. Usciti da questa, i bozzoli verranno portati direttamente sui graticci della gallettiera.

Nè può avere seria consistenza l'obiezione che la spesa di mano d'opera sarà considerevole durante il periodo che va dalla moritura alla essiccazione completa. Considerato che abbisognano ben poche volte i movimenti dei bozzoli sui graticci, si può ben comprendere che la spesa globale di mano d'opera sarà sempre di gran lunga inferiore nel suo complesso a quella che occorre soltanto per il personale d'ammasso, dei ricevimenti e delle varie operazioni inerenti alla soffocazione col calore.

Le spese d'impianto del macchinario per moritura col calore, o delle tavole per moritura col gas cianidrico non sono paragonabili: le seconde molto inferiori alle prime.

Se a tutta questa differenza di spese a favore della moritura cianidrica noi aggiungiamo i vantaggi dei costi e delle rendite, dello svolgimento alla bacinella, e quello sulla nettezza e purezza della seta, noi ci dobbiamo convincere che il sistema della moritura cianidrica sarà quello che potrà dare i migliori risultati ed al quale sarà riserbato nell'avvenire il sopravvento per la moritura delle crisalidi del filugello.

Ricerche sul comportamento del *Nosema Bombycis* Nägeli nell'uovo del *Bombyx mori* L. durante lo sviluppo embrionale

INTRODUZIONE

Fin dal suo primo apparire la Pebrina ha destato un grande interesse, oltrechè nei pratici, anche negli scienziati, per la gravità della minaccia ch'essa apportava alla produzione mondiale della seta, e cioè ad una delle fonti più tradizionali della produzione agraria, che ebbe sempre, e continuerà certamente ad avere importanza notevolissima, malgrado le alterne vicende dei mercati, oggi enormemente depressi.

Risale, come è noto, alla metà dello scorso secolo la scoperta del *Nosema bombycis* Nägeli, agente specifico della Pebrina; da quell'epoca si andarono moltiplicando studi e ricerche sull'argomento da parte di numerosi Autori italiani e stranieri.

Tralasciando di parlare delle pubblicazioni apparse nella prima fase degli studi eziologici, e delle molte controversie sorte fra gli studiosi del secolo scorso, farò punto di partenza dal classico e moderno lavoro di STEMPEL [1], il quale ha eseguito profonde e minuziose ricerche sul parassita della pebrina del Filugello, coll'intendimento prevalente di determinare la successione delle diverse forme del ciclo di sviluppo di questo microsporidio. Pochi cenni però sono dati in tale lavoro intorno al comportamento del *Nosema* nell'uovo del baco da seta, durante le diverse fasi dello sviluppo embrionale.

Appunto per cercare di colmare, almeno in parte, tale lacuna, mi accinsi alle presenti ricerche. Non ignoravo la difficoltà grave dell'argomento, specialmente per chi è alle prime

armi nel cimento della ricerca sperimentale; ma la paterna guida del mio Maestro, prof. GRANDORI, mi fu di valido aiuto, e i suoi consigli e suggerimenti furono un incoraggiamento continuo sulla faticosa via, cosicchè son potuto pervenire a qualche risultato concreto.

STEMPELL ci dice che la trasmissione ereditaria avviene per opera dei meronti; essi si adattano per lo più allo sviluppo particolare dell'uovo, non accumulandosi alla periferia, ma principalmente nel centro, dove non possono disturbare lo sviluppo dell'embrione, il quale, come è noto, giace nei suoi primi stadi alla periferia dell'uovo e quasi immediatamente sotto il guscio. Questi cumuli di meronti si trasformano parte in spore, parte però continuano, dopo un periodo di riposo che corrisponde a quello di diapausa dell'uovo, a svilupparsi e a moltiplicarsi come meronti.

Ciò si può constatare — sempre secondo STEMPPELL — in sezioni di embrioni in diapausa e già avvicinati al centro dell'uovo, ove si possono scorgere meronti che penetrano direttamente nelle cellule dell'embrione. Poichè con questo modo di ereditarietà viene a soffrire principalmente l'epitelio dello stomaco, tanto importante per la nutrizione del giovane bacolino, esso dovrà di conseguenza soccombere ad un'infezione alquanto intensa fino dal primo stadio di vita.

Un'altra forma del parassita che STEMPPELL ammette che penetri nell'embrione è naturalmente quella delle spore mature quelle che comunemente chiamansi *corpuscoli*. Se queste, come è facile succeda, considerata la loro posizione nel tuorlo centrale, riescono a penetrare nel lume dell'intestino medio che si forma al centro dell'uovo all'epoca della blastocinesi, allora esse si comporteranno come se il baco le avesse ingerite colla foglia, e cioè il parassita si propagherà agli altri organi dell'embrione coll'intermediario del germe ameboide e dei planonti.

Questo è quanto nella sua opera ci dice STEMPPELL intorno al comportamento dell'infezione nell'uovo, ed è ben poco, come si vede; l'Autore ha invece molto approfondito lo studio delle forme del ciclo di sviluppo del parassita più d'ogni altra cosa.

Altri studi furono fatti in seguito sullo stesso argomento, ma sempre relativi al ciclo di sviluppo, da OHMORI, KUDO, HUTCHISON, JAMESON, FOÀ, SCHREIBER, PAILLOT; fra questi Autori, JAMESON, SCHREIBER e FOÀ intrapresero anche una serie

di ricerche rivolte a studiare il parassita nell'uovo dell'ospite; e di queste ricerche dirò ampiamente più avanti.

Poichè nell'industria la rivelabilità del parassita nel seme in qualunque epoca dell'anno ha importanza grandissima, e poichè coi metodi finora escogitati non si è sicuri di diagnosticarne la presenza nell'uovo in qualunque momento della diapausa, mi proposi di ricercare se in qualsiasi momento della vita embrionale del baco da seta fosse possibile, con sezioni e appropriate colorazioni, rivelare la presenza del parassita senza possibilità di dubbi e contestazioni. Ma naturalmente, man mano che il mio lavoro si svolgeva e mi presentava, nei numerosissimi preparati, un prezioso campo di osservazioni nuove, non volli limitarmi alla semplice constatazione della presenza o assenza del parassita, ma raccolsi documenti micrografici per illustrare come il *Nosema bombycis* si comporti nello sviluppo embrionale del Baco da seta e quali rapporti intercorrano fra ospite e parassita.

Ricerche antecedenti

Secondo STEMPPELL, allorchè la spora viene ingerita colla foglia da un baco da seta, il suo filamento polare si estroflette, ciò ha luogo specialmente nell'intestino anteriore, esce in tal modo il germe della spora dall'apertura polare e diventa germe ameboide a due nuclei; per la fusione di questi poi si trasforma in planonte. I planonti mobili si dividono ripetutamente nell'intestino del baco, dando origine ad altri planonti piccolissimi; essi penetrano, attraverso gli interstizi cellulari dell'epitelio intestinale, nelle lacune interviscerali, e quindi cadono nel circolo sanguigno e vengono trasportati e diffusi in tutti gli organi. A un dato momento essi si internano nelle cellule, specialmente in quelle adiacenti al vaso dorsale, cioè da vita intercellulare passano allora a vita intracellulare; quivi, perdendo la loro mobilità ameboidica, ingrossano notevolmente e si trasformano in cellule sferiche od ovoidali chiamate meronti. I meronti sono più grandi dei planonti, la loro forma è in rapporto coi tessuti invasi, e colla possibilità o meno di estendersi in tutte le direzioni o in una sola. Si moltiplicano per divisione multipla o per gemmazione, invadendo sempre più il protoplasma

sma della cellula occupata senza però poterne uscire, poichè l'involucro cellulare resiste alle loro essudazioni plasmolitiche. In seguito all'affollamento che ne consegue, si verifica però ben presto un difetto di spazio e di materia nutritiva; allora i meronti presenti, per la maggior parte, si convertono in spore; essi cioè acquistano una forma allungata ovoidale, e il loro nucleo si divide formando quattro nuclei; poi si forma la cuticola della spora, ed il protoplasma separa, colla sua condensazione due vacuoli; infine viene generata una capsula polare, circondata da protoplasma, entro cui è attorcigliata a spira un filamento polare. Poco appresso la cellula infarcita di spore muore: le spore, divenute libere, vengono espulse dall'organismo. Introdotte coll'alimento nell'intestino di altra larva, a contatto dei succhi gastrici scatta il filo polare, lasciando nella spora un'apertura che dà uscita al germe ameboide: questo si trasforma in planonte mononucleato, dal quale poi avranno origine i meronti e da questi le spore, ricominciando così il ciclo.

Va notato però che le ricerche di STEMPPEL sono state condotte mediante infezioni artificiali di *Nosema bombycis* anche su *Arctia caja*; e ciò lascia adito al dubbio che qualche modificazione delle forme del ciclo del parassita possa verificarsi nell'ospite, diverso da quello normale.

Dopo STEMPPEL ben pochi hanno ripreso lo studio di questo argomento. Per quanto io so, soltanto sette autori hanno pubblicato in proposito osservazioni originali, e cioè due giapponesi, OHMORI (che però ha compiuto il suo lavoro a Berlino, sotto la guida di SCHUBERG) e KUDO; due inglesi, residenti in India, HUTCHISON e PRINGLE JAMESON; due italiani, la FOÀ e lo SCHREIBER, e un francese, il PAILLOT. Da questi Autori le osservazioni di STEMPPEL vengono confermate solo in parte. Mi limiterò a riferire brevemente i punti controversi.

J. OHMORI [2] non parla di planonti; ammette una sola maniera di divisione dei meronti: la forma intracellulare da mononucleata si trasforma in una forma a otto nuclei disposti a coppie; i nuclei di ciascuna coppia si fondono due a due, dando così origine a quattro forme mononucleate. Nelle spore, secondo l'Autore, manca la capsula polare. OHMORI poi ottenne la germinazione delle spore anche nell'intestino posteriore, introducendo, per via anale, in larve sane, poltiglia di farfalle infette triturate in soluzione fisiologica.

R. KUDO [3] dice chiaramente che non riesce a trovare lo stadio di planonte descritto da STEMPPEL. Egli ammette che il succo gastrico del baco può provocare la chiusura delle spore nell'intestino medio, sia che esse vi siano arrivate per ingestione di cibo infetto, sia che provengano dal baco stesso.

C. M. HUTCHISON [4] ritiene che la germinazione delle spore non avvenga solamente nell'intestino e che possa avvenire anche negli altri tessuti per effetto di enzimi o di fermenti.

Secondo A. PRINGLE JAMESON [5], il planonte, appena uscito dalla spora, attraversa la membrana peritrofica dell'intestino dell'ospite senza andare più in là; questo Autore non ha osservato la moltiplicazione dei planonti, ed anzi crede che due si fondano insieme per formarne uno solo. Ritiene pure che possa avvenire l'*autoinfezione* del baco. (Per *autoinfezione* l'A. intende l'infezione, per l'individuo, derivante dalla germinazione delle spore, prodottesi nell'interno dell'individuo stesso). Trova nel tuorlo dell'uovo, in cui l'embrione è in via di sviluppo, tutti gli stadi del parassita da planonte a spora.

In due lavori recenti A. FOÀ [6, 7] ha studiato specialmente il ciclo di sviluppo del parassita nell'uovo. L'Autrice scrive che non le « è stato possibile vedere in nessun caso, nè in strisci di emolinfa nè in sezioni di bachi, quella divisione dei planonti che nessuno, dopo STEMPPEL, ha riscontrato ». Essa ritiene « che il planonte diventi subito intracellulare, cioè si trasformi in meronte, e senza dividersi prima e che appena fissato, o poco prima di fissarsi, diventi unicucleato per la fusione dei due nuclei ».

Dopo altre considerazioni e critiche delle forme viste dagli altri Autori confrontate con le proprie, l'Autrice conclude dicendo: « La differenza essenziale, che risulta dalle mie osservazioni rispetto a quelle di STEMPPEL, è che secondo questo Autore il meronte unicucleato si trasforma direttamente in spora, secondo me invece passa per uno stadio binucleato che si può chiamare sporonte: questo per divisione, non so se unica o ripetuta più volte, dà luogo ad altri binucleati che si possono denominare sporoblasti i quali si trasformano in spore ». Altre considerazioni interessanti, che meritano essere riportate, la FOÀ fa sul comportamento del parassita nell'uovo, ed è appunto nell'uovo che essa ha fatto osservazioni che vengono a modificare l'interpretazione del ciclo di sviluppo del *Nosema*. Essa dice: « Il *Nosema bombycis* nell'uovo ha un'attività in perfetto

accordo coll'attività dell'embrione, cosa che può spiegarsi facilmente se si ammette che questo parassita abbia bisogno per il suo sviluppo dei prodotti già elaborati dall'ospite. Il ciclo nel primo periodo di attività dopo la deposizione, e nel secondo al principio dell'incubazione, può essere abbreviato probabilmente per le condizioni estremamente favorevoli in cui viene a trovarsi nell'uovo, vale a dire larghezza di spazio perchè il parassita si trova sparso nelle maglie delle cellule vitelline e ricchissimo nutrimento per la presenza dei fermenti embrionali. Così viene soppresso lo stadio di sporonte e di sporoblasto, e si formano pseudo-spore che lasciano uscire dopo poco un germe ameboide ».

Riassumendo, la Foà, coi suoi studi, è arrivata alla conclusione che l'origine delle spore durature avviene non da meronti uninucleati, ma da sporoblasti binucleati; e in condizioni speciali si ha la formazione di pseudo-spore, le quali nell'ospite stesso, dopo poco tempo, lasciano uscire un germe ameboide.

In un lavoro più recente lo SCHREIBER [8] brevemente parla di sue osservazioni su uova infette in estivazione ed ibernazione. L'Autore ammette in uova con fortissime infezioni il quasi completo disfacimento della stria germinale e di tutto il contenuto vitellino (1). « In poche uova — soggiunge inoltre — ho potuto anche vedere dei gruppi numerosi di spore ammassate entro vacuoli delle sfere vitelline, mentre il resto del tuorlo appare privo di parassiti. In altre invece le sfere persistono distinte nel tuorlo, ma internamente sono completamente infarcite di spore. In rari casi ho potuto vedere i parassiti nella stria germinale ben conservata ».

Stadi più avanzati di quello di stria germinale in riposo l'A. non ha studiato.

Recentemente poi il PAILLOT [9, 10] ha intrapreso studi sull'argomento, limitandosi però a delle considerazioni sul ciclo di sviluppo.

Egli è d'accordo in parte con la Foà; dice d'altra parte che gli schizonti, meronti di STEMPPELL, si trasformano in spo-

(1) Nei miei preparati, anche di uova intensissimamente infette, non ho mai riscontrato che le demolizioni del parassita giungessero a così estremi limiti; talchè sorge il dubbio, che questo completo disfacimento osservato dall'Autore potesse essere effetto anche di altre cause, oltre a quella parassitaria (uova non fecondate?).

roblasti allorchè le condizioni di vita del parassita nella cellula diventano sfavorevoli, vale a dire quando la cellula è così piena di parassita che essi non si possono più riprodurre. Ciò che distingue gli sporoblasti dagli schizonti « c'est d'abord l'affinité moindre du protoplasme pour les colorants basiques, puis une sorte de vacuolisation de la substance protoplasmique, enfin un allongement sensible de la cellule ».

Come si vede egli ammette che nel passaggio da meronte a spora il parassita attraverso lo stadio di sporoblasto.

Egli riassume il ciclo di sviluppo del *Nosema bombycis* così: « les spores mures étant engendrées par un Ver à soie, le filament polaire se dévagine sous l'influence des ferments digestifs; la paroi de la spore subit des modifications physico-chimiques sous l'influence de ces mêmes ferments et se perméabilise; les échanges osmotiques avec le milieu ambiant se rétablissent; le germe amiboïde grossit et se transforme en planont à un, puis à deux noyaux. Le planont pénètre ensuite dans le protoplasme des cellules épithéliales de l'intestin moyen où il se transforme en méronte ou schizonte à deux noyaux en général; il se multiplie activement par simple division; puis l'infection se propage de proche en proche et gagne la plupart des tissus du Ver à soie. Lorsque les conditions de vie deviennent défavorables à l'intérieur des cellules parasitées, les schizontes se transforment en sporoblastes à deux éléments après division des noyaux, ou donnent directement naissance aux spores. Celles-ci ont un germe sporal à deux noyaux et un filament polaire enroulé à l'intérieur, mais on ignore encore la position relative de ces divers éléments à l'intérieur de l'enveloppe sporale ».

Concludendo, da quanto ho esposto per ciò che riguarda le ricerche antecedenti, si può constatare che se hanno avuto uno sviluppo abbastanza considerevole gli studi per un tentativo di accertare con esattezza un ciclo di sviluppo il più attendibile del *Nosema bombycis*, non è stato però affrontato e risolto il problema dei rapporti fra ospite e parassita. Questa lacuna fa sì che fino ad oggi non sia chiarita dalle ricerche antecedenti la natura delle alterazioni prodotte dal *Nosema*, sia nei tessuti in via di formazione, sia in quelli già formati, dell'embrione del Baco da seta.

Le mie ricerche, che esporrò ora brevemente, credo abbiano in parte chiarito ed illustrato tali fatti.

Materiale

Per le ricerche, prepostemi all'inizio di questo studio, grande importanza aveva la scelta del materiale per poter avere la certezza di lavorar su uova sicuramente infette.

Nel giugno 1930 erano a mia disposizione tre lotti di bozzoli, prossimi a sfarfallare, di tre diverse razze: *Awoijku*, *Maiella*, *Giallo indigeno a farfalla mora*.

Lo sfarfallamento avvenne, per i diversi lotti, quasi contemporaneamente, sicchè non mi fu possibile esaminare subito alla nascita le farfalle, per isolare le eventuali infette e raccogliere e fissarne le ovature in stadi vicinissimi alla deposizione.

Isolate le femmine, ciascuna sotto un conetto, le accoppiavo con un maschio per 12 ore, quindi mettevo la sola femmina in una cella, notandone il giorno dell'avvenuto accoppiamento.

Terminato lo sfarfallamento ed avvenuta la deposizione delle uova da parte delle femmine, come dissi, opportunamente isolate, ne feci, ad una ad una, l'esame microscopico.

Riscontrai che mentre le due partite di *Awoijku* e *Maiella* erano sanissime, per contro la partita di *Giallo indigeno a farfalla mora* era infetta nella notevolissima proporzione dell'80%.

Nell'esame microscopico delle farfalle, avevo cura di pestare nel mortaino solamente la parte anteriore del corpo della femmina, per non incorrere nell'errore di giudicar pebrinose farfalle sane che presentassero corpuscoli provenienti soltanto dallo sperma disseccato nella spermateca. In tal modo invece ero sicuro che qualunque infezione mi si presentasse al microscopio era propria solamente della femmina.

A selezione microscopica ultimata, avevo a mia disposizione ben 200 ovature infette, di cui cominciai a eseguire delle fissazioni. Ne eseguii a 20-21-22 giorni dalla deposizione, poi, successivamente, a tre mesi e mezzo ed a quattro mesi e mezzo, onde poter avere a mia disposizione stadi di estivazione inoltrata.

Mantenni le ovature non fissate fino alla fine di dicembre in una stanza non riscaldata alla temperatura di circa + 8° C. Alla fine di dicembre le passai in frigorifero mantenendovele fino al 4 aprile del 1931 alla temperatura che oscillò intorno a

+ 3° C. Tolle le celle dal frigorifero e mantenute per 3 giorni a temperatura crescente, l'8 aprile le misi in una incubatrice a + 13° C., aumentando gradatamente la temperatura fino a + 22°. Al diciassettesimo giorno si ebbero le nascite complete. Durante il periodo dall'ultimo giorno della permanenza in frigorifero fino alla nascita, fissai giorno per giorno un'ovatura per avere la serie completa degli stadi embrionali di ciascun giorno di incubazione. I bacolini avuti dalle restanti ovature, vennero regolarmente allevati per vedere se fosse stato possibile ottenere da essi farfalle che deponessero seme, onde poter studiare, sia i primi stadi embrionali, subito dopo la deposizione, sia l'andamento dell'infezione nelle uova ottenute, e che avrebbero rappresentato la seconda generazione infetta. Pur avendo condotto tale allevamento con la massima cura, neppure un baco riuscì a filare un modesto bozzolo ed a incrisalidarsi, dimostrando così che da uova provenienti da madri infette è pressochè impossibile ottenere, almeno in condizioni normali, anche un modestissimo bozzolo.

Fra i molti fissativi usati con buoni risultati per le uova del Filugello ho scelto il fissativo cromo-acetico, secondo la formula modificata da GRANDORI (1). Questo fissativo consente una spiccata colorabilità alla cromatina nucleare ed era adatto perciò per il mio scopo, dato che il *Nosema bombycis* rispetto ai coloranti ha un comportamento complessivo simile a quello della sostanza nucleare.

Nello studio delle uova del baco da seta, la prima difficoltà che s'incontra è data dalla resistenza che il guscio corneo oppone ad essere tagliato. Per ovviare a questo inconveniente due sono i sistemi: togliere il guscio a mano con l'aiuto di finissimi aghi, oppure usare sostanze che rammolliscano e sciolgono il guscio senza rovinare il contenuto. Io ho adottato quasi sempre quest'ultimo sistema, molto più comodo, e che evita uno spreco di materiale e fa risparmiare un tempo prezioso.

A tale scopo usavo il *Rusma* [11], miscela di calce viva ed orpimento, lasciandolo agire sulle uova già fissate 10 minuti primi. Per le inclusioni, risultati molto soddisfacenti mi ha dato l'impiego, di una miscela di paraffina a 56°-58°, cera vergine e

(1) Acido cromatico in soluzione acquosa 1% parti 9; acido acetico glaciale parti 1.

stearina in proporzione tale da avere un insieme fusibile sui 53°-55°.

Questa miscela permette al microtomo sezioni buonissime che si distendono ottimamente sul vetrino. Operazione molto delicata è poi la colorazione dei preparati che permetta di ben differenziare il microsporidio parassita nei tessuti embrionali e nel tuorlo.

Per colorare i primissimi stadi ho usato l'ematosilina di Heidenhain che si è dimostrata, per il mio materiale, ottimo colorante nucleare; adoperai il Rosso Congo o l'Eosina come colorante plasmatico.

Per gli stadi embrionali più avanzati però questa colorazione non riesce soddisfacente, colorando senza distinzione ogni sorta di granulazioni, e rendendo perciò confusi i preparati e difficile la interpretazione. I corpuscoli della Pebrina con questa colorazione si presentano assai chiari, con le due capsule che spiccano moltissimo. (Tav. I, fig. 9).

L'ematosilina Carazzi non si è dimostrata punto adatta alla buona colorazione delle varie forme del parassita.

Sapendo che l'ematosilina mordenzata di Heidenhain colora in nero intenso la sostanza cromatica, ma tinge con varia intensità molta parte delle sostanze plasmatiche, mentre la ematosilina di Mallory, per contro, dà una colorazione di tali sostanze plasmatiche in azzurro sufficientemente trasparente anche a forti ingrandimenti, vollen sperimentare anche quest'ultima ematosilina. D'altra parte essa ha anche il vantaggio, sulla prima, di una maggior rapidità, poichè in 40 minuti si può condurre a termine la colorazione di un vetrino, mentre con l'ematosilina di Heidenhain occorrono — per buone colorazioni — uno o due giorni almeno. L'ematosilina Mallory mi ha dato buoni risultati permettendo una chiara visione degli elementi cellulari dell'ospite ed una forte colorazione del parassita, si che ne è rivelata facilmente la presenza.

Non contento però ancora, ho provato il metodo di colorazione Giemsa e posso dire che, per il mio lavoro, si è dimostrato eccellente, dando esso tinteggiate delicate e nello stesso tempo chiarissime. Infatti questa colorazione, oltre che dare una nitida visione delle strutture cellulari dell'embrione del baco da seta, fa risaltare molto bene il parassita, svelandoci anche molto spesso la sua costituzione interna. Questi pregi del metodo di

Giemsa lo fanno preferire a qualunque altro in ricerche di questa natura, nonostante le difficoltà notevoli del metodo stesso e le particolari attenzioni che la sua buona riuscita richiede.

Ricerche personali

Poichè, come ho fatto notare, gli Autori precedenti poco o quasi nulla si sono occupati di ricercare come avvenga l'infezione dell'embrione del baco da seta per opera dei parassiti che nell'uovo appena deposto trovansi nel tuorlo, mi proposi con queste mie ricerche di determinare in qual modo e in qual tempo i parassiti attacchino l'embrione durante il lunghissimo periodo della sua formazione che nelle razze annue dura — con l'intervallo della lunga diapausa — circa 10 mesi.

Come ho già detto a proposito del modo col quale mi sono procurato il materiale, non ho potuto avere a disposizione uova fissate dei primi stadi sino alla diapausa, cosicchè dovetti forzatamente limitarmi a studiare il periodo della diapausa inoltrata e dello sviluppo primaverile. E poichè in questa prima serie di ricerche mi sembra di aver notato fatti da altri studiosi non ancora messi in luce, ho pensato di darne notizia in questa prima memoria.

Le mie ricerche cominciano su embrioni dell'età di 20 giorni, in piena diapausa. Osservando i preparati di tale età ho notato azzitutto, e non senza meraviglia, la presenza del parassita solamente allo stato di spore, non riunite al centro dell'uovo come già aveva detto STEMPPELL, ma sparse per tutto il contenuto dell'uovo stesso, così da interessare oltrechè tutto il vitello nutrizio anche la sottile stria germinale in diapausa. (Tav. I, fig. 1).

Tale fatto che da precedenti Autori era attribuito solamente ai casi di fortissime infezioni, io l'ho invece potuto notare anche per lievi infezioni di *Nosema bombycis*.

Nei rapporti fra ospite e parassiti, quando questi siano metazoi, assai elevati nella scala animale, sono stati riscontrati numerosi e significativi casi, in cui il parassita divora gli organi dell'ospite gradualmente per modo da intaccare per ultimi quelli più vitali: ciò però non avviene mai per i microrganismi ed il *Nosema* segue tale regola generale.

Osserviamo ora come si presenta il parassita nei vari costituenti dell'uovo: consideriamone i rapporti con il nucleo ed i granuli nelle sfere vitelline. La presenza del parassita causa nelle sfere un disfacimento della loro organizzazione. Disfatto è il reticolo di citoplasma del tutto caratteristico della cellula vitellina, nelle cui maglie sono alloggiati i granuli vitellini; ma da quanto ho potuto constatare l'organello cellulare che ne risente il maggior danno è il nucleo. Si possono vedere nuclei disfatti, riconoscibili solo per pochi granuli di cromatina rimasta tra l'ammasso di spore; altri talmente ipertrofici (fig. 19, Tav. II) da essere grandi il doppio del normale, ed anche di più; questa ipertrofia è causata indubbiamente dall'attività del parassita, e probabilmente da un complesso di disturbi biochimici che ne conseguono. In altri nuclei rimane, a racchiudere le spore, la sola membrana nucleare con pochi brandelli di plasma.

Nei granuli vitellini la demolizione del parassita è molto meno visibile; rari sono i casi da me riscontrati di penetrazione del *Nosema* in essi.!

La fig. 3 (Tav. I) mostra due spore in un granulo, la loro presenza non ha prodotto alcuna alterazione visibile; recentissimo deve essere stato il momento di penetrazione, sì che il parassita non ha ancora potuto incominciare la sua azione plasmolitica sulla sostanza vitellina. Questo invece si può constatare benissimo nella fig. 4 (Tav. I) in cui si vede un granulo vitellino vicinissimo alla stria germinale, attaccato da una spora. Il parassita ha già incominciato a penetrare nel granulo vacuolizzandolo in parte e sembra evidente il rapporto fra la vacuolizzazione del granulo sulla zona periferica e la presenza del parassita su quella stessa zona. Nelle cellule della sierosa ho pure potuto constatare la presenza del *Nosema*, ma in questo periodo di diapausa le alterazioni che in tali cellule ho potuto vedere consistono nella più o meno completa demolizione dei nuclei, come dimostra la fig. 2 (Tav. I) in cui il territorio nucleare ha perduto ogni struttura ed ogni contenuto. Dopo la diapausa invece, in piena incubazione, le cellule della sierosa parassitizzate sono ipertrofiche, la loro struttura è profondamente alterata e solo la loro posizione nella sezione e la presenza delle caratteristiche granulazioni di pigmento ci dicono che siamo in presenza di cellule della sierosa. (fig. 5, Tav. I).

L'ipertrofia delle cellule attaccate dal *Nosema* è un fatto

quasi costante, non solo in questo periodo della diapausa, ma anche in tutti gli altri, ed anzi in modo ancor più evidente nei vari stadi dell'incubazione.

Nel periodo di diapausa ho pure riscontrato attacchi del parassita nell'interno dell'embrione. Esso non vi si presenta però così numeroso come nel vitello; infatti le spore del *Nosema* entro i tessuti della stria germinale si trovano piuttosto isolate o tutt'al più riunite in gruppetti di 5 o 6 (fig. 20 Tav. II), mentre nel vitello se ne trovano ammassi imponenti. (fig. 1 Tav. I).

Il fatto di trovare nell'embrione spore piuttosto isolate mi fa ritenere che il parassita in un primo tempo si riproduca attivamente nella sostanza vitellina e penetri piuttosto tardi nelle cellule della sottile stria germinale, dove l'ho trovato sporificato ed arrestato nel suo sviluppo in correlazione con l'arresto dell'attività embriogenetica. Anche qui, nella stria germinale, il *Nosema Bombycis* si dimostra cromatofago per eccellenza; i nuclei delle cellule della stria appaiono disfatti dalla presenza dei parassiti, la cromatina ridotta a pochissimi granuli sparsi disordinatamente in territori nucleari che hanno perduto ogni delimitazione (fig. 13, Tav. I).

Nella fig. 16 (Tav. II) si può vedere una spora vicinissima ad un nucleo e altre due in prossimità di altri nuclei. E' evidente anche qui l'avanzatissimo disfacimento della struttura nucleare provocata dal *Nosema*.

Ho potuto riscontrare che il parassita invade ogni parte della stria germinale, sia il foglietto ectodermico sia quello mesodermico, e così pure ne rilevai la presenza nelle due estremità della stria che danno origine al proctodeo e allo stomodeo. In alcune sezioni ho visto cumuli con gran numero di spore situate al lato ectodermico della stria, tanto da aver lacerato l'amnio ed esser già penetrate nella cavità amniotica.

Da tutto quanto fin qui esposto delle osservazioni sul comportamento del parassita nel periodo di diapausa, risulta chiaro e manifesto come il *Nosema bombycis* non si raccolga al centro dell'uovo risparmiando l'embrione, come asserivano i precedenti Autori, ma invade largamente i foglietti embrionali fin da stadi assai giovani di stria germinale di pochi giorni. A documento di ciò si vedano le figg. 1, 9, 13 Tav. I e figg. 16, 20 Tav. II.

A qualcuno parrà strano che in tutti i disegni di questo

periodo siano raffigurate solamente delle spore, mentre STEMPPELL ha affermato che i merolanti in parte svernano come tali nell'uovo.

L'osservazione di STEMPPELL non è stata però confermata da altri Autori. Io ritengo che il parassita, durante la diapausa dell'uovo dell'ospite, arresti il suo ciclo di sviluppo, perchè per manifestare tutte le proprie attività vitali e riprodursi ha probabilmente bisogno che anche l'ospite sia in piena attività. Ciò verrebbe confermato precisamente dalla mia constatazione di sole spore durante la diapausa.

Di interesse anche maggiore mi è parso lo studio del parassita nel periodo d'incubazione delle uova di *Bombyx mori*. In tale periodo infatti il *Nosema bombycis* si riproduce intensamente sia nel tuorlo nutrizio che nei tessuti dei diversi organi in via di formazione, esplicando dovunque la massima virulenza.

Nel vitello extra-embriale niente di nuovo c'è da rilevare oltre quanto ho già esposto per il periodo di diapausa. Il parassita si dimostra ancora cromatofago per eccellenza, tantochè si riscontrano nidi di parassiti numerosissimi ad occupare i territori di alcuni nuclei; ma della antica struttura e della sostanza cromatica di questi nuclei non resta più nulla, e solo si riconosce che quei nidi di parassiti occupano antichi territori nucleari per la posizione dei medesimi nelle sfere vitelline. (Tav. I, fig. 12).

Non si notano altre speciali alterazioni nei granuli vitellini.

Nella sierosa, come ho già detto, le alterazioni sono visibilissime, come si può vedere confrontando la fig. 5 Tav. I con la fig. 2 Tav. I; la cellula ha perduto quasi la sua forma, non esiste più alcuna traccia del nucleo e della sua cromatina, ed i granuli di pigmento scarseggiano; solo vi è una gran quantità di spore del *Nosema*.

Interessanti sono le alterazioni prodotte dal parassita nei vari organi dell'embrione già alquanto avanzato nello sviluppo.

Nel tessuto ipodermico, come ho già fatto notare descrivendo le alterazioni prodotte dal parassita nei nuclei delle sfere vitelline dell'uovo in diapausa, si ha una ipertrofia delle cellule attaccate. Come si vede bene nella fig. 11, Tav. I, il tumoretto è leggermente pronunciato, essendo recentissima l'infezione.

Man mano che il parassita si moltiplica, le cellule parassitizzate soccombono all'invasore e diventano sua preda, subendo un progressivo disfacimento, finchè si arriva alla loro completa demolizione. (Fig. 10, Tav. I).

Il plasma appare fortemente vacuolizzato, i nuclei delle cellule invase sono scomparsi; si perde ogni delimitazione di territori cellulari, e tutto il plasma disorganizzato si riduce a residui sfrangiati e rigonfi.

Particolarmente degno di nota mi è apparso il comportamento del *Nosema bombycis* nell'intestino dell'embrione. Stragrande è il numero dei parassiti che possono trovarsi nel vitello intestinale; la figura 21, Tav. II, ce ne dà un'idea, sebbene pallida. I nuclei sono scomparsi ed i granuli vitellini sono in parte disfatti; i parassiti si riuniscono specialmente in isole numerosissime, creando con la propria azione dissolvente grandi e vistose cavità. Ancor più meravigliati (si resta, se, lasciato il vitello intestinale, si esamina attentamente tutto l'epitelio dell'intestino: ci si attenderebbe di trovarlo devastato dal parassita, presente in grande quantità nella cavità intestinale; invece la recettività del tessuto intestinale per il *Nosema* è anche minore di quella degli altri tessuti dell'embrione fino ad ora esaminati. Le alterazioni di questo tessuto provocate dal parassita sono dello stesso tipo di quelle che si riscontrano nell'ipoderma.

Si hanno ipertrofie cellulari molto evidenti che per successivo disfacimento delle cellule stesse danno origine a grandi cavità. La fig. 8, Tav. I, mette in evidenza la formazione ipertrofica del tutto caratteristica prodotta dall'iniziale azione stimolatrice del parassita nel breve tratto di epitelio invaso. Si è originata, per così dire, un'ernia, per proliferazione cellulare; poi, per successiva delaminazione dello strato cellulare la parte delimitata (a destra, nella figura), si approfonda nel lume intestinale. Difatti come si nota nella microfotografia, la struttura cellulare dell'epitelio intestinale in quel punto è fortemente alterata: i parassiti vi si trovano raggruppati in ammassi di numerosissimi individui; si nota pure la vacuolizzazione del plasma cellulare e le prime alterazioni provocate dal *Nosema* nei nuclei dello strato esterno di cellule (a sinistra, nella figura).

Proseguendo l'opera demolitrice del parassita, le alterazioni si fanno ancor più evidenti, finchè si arriva alla demolizione e sfaldamento totale del tessuto. Quest'ultimo stadio ci è

ottimamente illustrato dalla fig. 15, Tav. II. Dal confronto con la consimile alterazione vista nello stadio precedente a questo, si arguisce che in un primo tempo si ha la formazione di un'ernia verso l'interno del lume intestinale, ed una delaminazione dello strato cellulare esterno; in un secondo tempo, accentuandosi l'azione disagregatrice del parassita che progressivamente assorbe la sostanza nucleare e plasmatica delle cellule dell'epitelio intestinale, si ha la formazione del vistoso vacuolo raffigurato nel disegno.

Ho riscontrato la presenza del parassita anche nel vaso dorsale, senza però notare alterazioni profonde delle cellule costituenti la parete del vaso stesso (Fig. 18, Tav. II). Probabilmente però il parassita era di recente penetrato in quest'organo, e perciò non si era ancor fatta sentire negli elementi cellulari di questo l'azione disagregatrice.

Come è noto, il tessuto muscolare viene fortemente attaccato dal *Nosema bombycis*. La fig. 7 (Tav. I) illustra una fibra muscolare attaccata da meronti, con un conseguente principio di plasmolisi; tale stato appare invece già molto avanzato nella fig. 6 (Tav. I) in cui sono assai più profonde le alterazioni delle fibre muscolari e la loro vacuolizzazione.

Importantissimi sono poi i reperti che riguardano il sistema nervoso, preda esso pure del parassita. E la loro importanza è data dal fatto che le alterazioni e lesioni prodotte in questo apparato dell'embrione non possono a meno dall'aver ripercussioni e conseguenze su tutti gli altri apparati dell'organismo, perchè ad ogni lesione di un centro corrisponde la menomazione o la soppressione della funzionalità degli organi innervati dalle fibre che si dipartono da quel centro. Anzitutto devo rilevare come nel corso delle mie osservazioni e ricerche, nella grandissima maggioranza dei preparati, abbia riscontrato un'infezione del sistema nervoso maggiore che negli altri tessuti, e tali lesioni erano particolarmente localizzate nei gangli, senza che però si riscontrassero formazioni ipertrofiche notevoli.

La sostanza grigia (corpi cellulari delle cellule nervose) situata perifericamente nei gangli, è la sede prediletta dal *Nosema*.

Nei gangli l'azione distruttrice del parassita si manifesta, come al solito, col dissolvimento e la vacuolizzazione degli elementi cellulari (fig. 14, Tav. II): inoltre si può notare che l'a-

zione demolitrice del parassita si esercita anche in questi organi con spiccata prevalenza sulla sostanza cromatica dei nuclei, e soltanto in secondo tempo sul citoplasma. Ne risulta una distruzione completa di numerosi nuclei, cosicchè larghe zone delle sezioni dei gangli si presentano privi di nuclei cellulari, e in tali zone — che sono tempestate da parassiti — si vanno poi formando ampie vacuolizzazioni che possono diventare anche grandi lacune. Tuttociò è ampiamente illustrato dalle figure 14 e 17 della Tavola II.

Nessun ganglio si sottrae all'attacco del *Nosema*, che si estende, da quanto ho osservato, a tutta la catena gangliare compreso il cingolo soprasofageo, col piccolo ganglietto frontale, ed anche al sistema simpatico. L'intensità però dell'infezione è quasi sempre maggiore nei gangli sottostanti alla parte mediana dell'intestino, cioè i primi gangli addominali. Questo fatto si può spiegare pensando che il vitello della zona centrale dell'uovo all'epoca della blastocinesi embrionale è il maggior focolaio del *Nosema*, e come ne deriva forte infezione nel vitello che viene incluso nell'intestino medio, così ne deriva forte infezione ai primi gangli addominali che si formano appunto al disotto delle bandelle dell'intestino medio, cioè sempre nella zona centrale dell'uovo, e a contatto col tuorlo centrale.

Conclusioni

1°) Risulta ben dimostrato che nell'uovo di *Bombyx mori* in diapausa il *Nosema bombycis* si trova sparso in qualsiasi regione dell'uovo stesso, e non in una zona centrale come aveva affermato STEMPPELL. Già la Foà aveva potuto constatare l'inesattezza di questa affermazione dello studioso tedesco.

2°) Dal fatto che in tutte le sezioni di uova in diapausa le sole forme del parassita che si possono riscontrare sono soltanto le spore, mentre in seguito, negli stadi d'incubazione, si osservano tutte le forme di sviluppo, deve ritenersi che le spore del *Nosema bombycis* germinano nell'uovo di razze annue del Filugello al risveglio dell'attività embriogenetica nel periodo primaverile. STEMPPELL ammetteva che le spore potessero germinare solo sotto l'azione dei secreti della parte anteriore dell'intestino del baco durante la sua vita larvale. OHMORI era

riuscito ad ottenere la germinazione delle spore anche nell'intestino medio e posteriore, sempre negli stadi larvali. La FOÀ ammette la germinazione delle pseudo-spore nelle uova.

3°) Le alterazioni istologiche prodotte dai parassiti nei tessuti embrionali del Filugello sono: in un primo tempo ipertrofia della cellula invasiva, poi cromatolisi graduale dovuta alla cromatofagia dei parassiti, fino a scomparsa totale dei nuclei cellulari; segue una graduale e sempre più vistosa vacuolizzazione del plasma, ed infine lo sfaldamento di tutto il citoplasma, la cui gran parte è utilizzata dai parassiti, con formazione di ampie lacune nei tessuti; in tali lacune si annidano e si moltiplicano innumerevoli parassiti.

4°) Il fatto più importante è l'attacco dei parassiti ai gangli nervosi. Da vari Autori è ammesso che l'atrofia dei filugelli infetti e il loro rifuggire dal cibo siano dovuti all'impossibilità di digerire la foglia, essendo tutto l'epitelio intestinale invaso dai parassiti; in altre parole si ammette che tutto il disordine funzionale e la morte dipendano dal mancato assorbimento di alimento e conseguente denutrizione dei tessuti. Dopo i risultati qui messi in luce è invece da ritenere che il massimo danno dell'azione parassitaria del *Nosema* derivi dalla sua presenza nei gangli nervosi del baco ammalato. Infatti poichè i centri nervosi sono i regolatori di tutte le funzioni vitali, e da essi emanano tutti gli stimoli capaci di far funzionare i vari organi, qualora essi siano menomati nella loro normale attività, deve avvenire un rallentamento graduale di tutte le funzioni dipendenti da ciascun centro nervoso che abbia subito lesioni, fino alla paralisi degli organi da esso innervati.

E poichè il *Nosema bombycis* si localizza anche e specialmente nei gangli sopra e sottoesofageo e nel ganglietto frontale, disturbandone profondamente le funzioni normali, il baco lino sarà paralizzato nell'organo della presa, masticazione e deglutizione dell'alimento, arrivando così a morte per inanizione. Difatti il ganglio sopraesofageo nella parte detta tritocerebro contiene i centri di innervazione del labbro superiore e di una parte della regione anteriore dell'intestino; il ganglio sottoesofageo innerva le mandibole, le mascelle ed il labbro inferiore, ed infine il ganglietto frontale è il centro nervoso dei movimenti di deglutizione. E poichè il parassita attacca anche i gangli del simpatico sopraintestinale, che innervano la porzione anteriore

e media dell'intestino ed il vaso dorsale, ne conseguirà la soppressione della funzionalità dei movimenti peristaltici dell'esofago e dell'intestino, nonché di quelli ritmici delle pulsazioni del vaso dorsale.

Analogamente, in seguito all'invasione dei parassiti nei gangli della catena addominale, vengono paralizzati i movimenti locomotori, sì che il baco lino non può neppur andare alla ricerca dell'alimento; infine, per paralisi sopravvenuta ai muscoli motori del meccanismo di regolazione degli stigmi respiratori, l'animale può anche morire per asfissia.

Cosicchè, indipendentemente dall'attacco diretto che i parassiti fanno nei diversi organi dell'ospite, ciascun organo — compresi quelli più vitali — può cessare di funzionare perchè è stato lesa il centro nervoso che ne governa la funzione. Non basta; se si pensa che è assai variabile l'intensità dell'infezione e quindi variabile la gravità delle lesioni prodotte dal *Nosema* ai centri nervosi del baco lino, questo potrà morire in breve tempo oppure resistere più o meno a lungo agli attacchi del parassita. Fatto questo dimostrato largamente dagli allevamenti sperimentali di diversi Autori e miei, dai quali risulta che i bachi anche infetti, possono soccombere subito od anche finire un bozzolo normale, a secondo che la loro infezione sia ereditaria od acquisita più o meno tardivamente durante la vita larvale, al che corrisponde una assai variabile intensità che l'infezione può raggiungere prima della salita al bosco.

Giustamente la Pebrina era stata chiamata, fin dai primordi della sua comparsa, *atrofa parassitaria*, pur non conoscendo allora la causa vera e tanto meno le lesioni al sistema nervoso che oggi vengono chiarite; io dico *giustamente* perchè uno degli effetti dell'invasione del parassita è la lesione più o meno grave dei centri nervosi. Ne consegue una difficoltà più o meno grave del baco lino nel nutrirsi, fino all'incapacità completa; da qui, dimagrimento, inanizione e morte senza putrefazione, caratteristiche tutte del quadro della pebrina.

Le osservazioni anatomiche da me messe in luce ci danno di questo quadro patologico una spiegazione soddisfacente perchè documentata da fatti istopatologici.

Bibliografia

Vengono citati solamente quei lavori che hanno stretta attinenza coll'argomento trattato.

1. — STEMPFEL W. - *Ueber Nosema bombycis Nägeli* - Arkiv für Protistenkunde, XVI Bd., 1909.
2. — OHMORI J. - *Zur Kenntniss des Pébrine-Erregers* - Arb. a. d. Kais. Gesundheitsamte. Berlino, 1912.
3. — KUDO R. - *On the structure and Life-history of Nosema bombycis*. - Bull. of the Imp. Seric. Exper. Station Japan, Tokyo, 1916.
4. — HUTCHISON C. M. - *Pebrine in India*. - Memoirs of the Department of Agriculture in India. Pusa, 1920.
5. — PRINGLE JAMESON A. - *Report on the Diseases of Silkworm in India*. - Superintendent Government Printing. Calcutta, 1922.
6. — FOÀ A. - *Come si presenta il Nosema bombycis nelle uova del baco da seta dalla deposizione alla schiusura*. - Informazioni Seriche, N. 14, 1923.
7. — FOÀ A. - *Modificazioni al ciclo morfologico e biologico del Nosema bombycis Nägeli*. - Portici, 1924.
8. — SCHEIBER B. - *I metodi di ricerca del Nosema bombycis delle uova del baco da seta in diapausa*. - L'Industria Bacologica, N. 8, Milano, agosto 1929.
9. — PAILLOT A. - *Sur le cycle évolutif de Nosema bombycis parasite de la pébrine du ver à soie*. - Comptes Rendus. Société de Biologie, T. XCIX, p. 81, 1928.
10. — PAILLOT A. - *Traité des Maladies du Ver à soie*. - Paris, 1930.
11. — NICETA F. - *Contributo alla tecnica per lo studio delle uova degli insetti*. - Bollettino del Laboratorio di Zool. Agraria e Bachicoltura del Regio Istituto Superiore Agrario di Milano, Vol I^o, 1928-29.

Spiegazione delle Tavole

Tutti i disegni, ottenuti con la camera lucida, sono stati tolti da sezioni sagittali di uovo di Bombyx mori (Razza Gialla indigena a farfalla mora).

TAVOLA I (IV)

Fig. 1. — Microfotografia illustrante la presenza del *Nosema bombycis* vicino alla stria germinale (in alto), anche in ammassi notevoli. Uovo a quattro mesi e mezzo dalla deposizione: color. Heidenhain (X 500).

Fig. 2. — Cellula della sierosa, di uovo a 4 mesi e 17 giorni dalla deposizione, contenente spore di *Nosema*. Color. Giemsa (X 2200).

Fig. 3. — Parte di sezione di uovo a quattro mesi e mezzo dalla deposizione, raffigurante spore sparse fra i granuli vitellini. Si osservi, a sinistra, il granulo di vitello contenente due spore. Color. Giemsa (X 1600).

Fig. 4. — Porzione di uovo a quattro mesi e mezzo dalla deposizione. Dei tre granuli di vitello vicini alla stria germinale si osservi quello centrale, nel quale una spora di *Nosema* aveva iniziato la penetrazione, determinando un principio di vacuolizzazione del granulo nella zona immediatamente sottoposta all'azione plasmolettica della spora stessa. Color. Heidenhain (X 2000).

Fig. 5. — Cellula della sierosa, di uovo al 13^o giorno di incubazione, invasa dal *Nosema*. Color. Ematosillina di Mallory (X 1300).

Fig. 6. — Fibre muscolari, di embrione al 15^o giorno di incubazione attaccate ed in parte disgregate dal *Nosema*. Color. Giemsa (X 1200).

Fig. 7. — Idem con forme giovanili del parassita. Color. Giemsa (X 1200).

Fig. 8. — Porzione di parete intestinale, di embrione al 15^o giorno di incubazione, fortemente attaccata dal *Nosema*. Notisi la forte iperplasia causata dal parassita che si trova in gran numero nel vitello intestinale (a destra). Microfotografia. Color. Giemsa (X 800).

Fig. 9. — Alcune spore di *Nosema* fra granuli vitellini (in alto) e la stria germinale (a destra). Uovo a quattro mesi e mezzo dalla deposizione. Microfotografia. Color. Heidenhain (X 1200).

Fig. 10. — Porzione di ipoderma, di embrione al 12^o giorno di incubazione, invasa da *Nosema* ed in parte quasi totalmente distrutta. Color. Giemsa (X 1600).

Fig. 11. — Porzione di ipoderma di embrione al 13^o giorno di incubazione. Si noti l'inizio di iperplasia nella zona invasa dal parassita. Color. Ematosillina di Mallory (X 1600).

Fig. 12. — Nucleo di sfera vitellina invaso dal *Nosema* e completamente disfatto. Uovo al 13° giorno di incubazione. Color. Ematossilina di Mallory (X 2000).

Fig. 13. — Parte di sezione di stria germinale a quattro mesi e mezzo dalla deposizione. Si noti, al centro della figura, il nucleo attaccato da due parassiti ed in parte disgregato. Color. Giemsa (X 2000).

TAVOLA II (V)

Fig. 14. — Porzione corticale di ganglio nervoso, di embrione al 13° giorno di incubazione, fortemente attaccato da *Nosema*. Color. Ematossilina di Mallory (X 1000).

Fig. 15. — Ampio vacuolo determinato dal *Nosema*, per avvenuta disgregazione della forte iperplasia inizialmente formatasi, nella parete intestinale di embrione al 15° giorno di incubazione. Color. Giemsa (X 900).

Fig. 16. — Parte di sezione di stria germinale, a quattro mesi e mezzo dalla deposizione, con spore vicine ai nuclei. Color. Giemsa (X 1500).

Fig. 17. — Parte di ganglio nervoso, di embrione al 15° giorno di incubazione con numerosi cumuli di *Nosema*: si noti il forte squilibrio fra quantità di plasma e nuclei. Color. Giemsa (X 1000).

Fig. 18. — Vaso dorsale fra ipoderma (in basso) e parete intestinale, invaso dal parassita. Da embrione al 13° giorno di incubazione. Color. Ematossilina di Mallory (X 1000).

Fig. 19. — Ipertrofia ed inizio di vacuolizzazione in nucleo di sfera vitellina fortemente invaso da *Nosema*. Da uovo a quattro mesi e mezzo dalla deposizione. Color. Heidenhain (X 1000).

Fig. 20. — Spore in gruppetto ed isolate in stria germinale, a quattro mesi e mezzo dalla deposizione. Color. Heidenhain (X 1000).

Fig. 21. — Enorme vacuolo determinato da *Nosema* nel vitello intestinale di embrione al 15° giorno di incubazione. Color. Giemsa (X 1000).

REMO GRANDORI

Lo sviluppo embrionale del Baco da seta

MEMORIA III

Sviluppo primaverile fino alla blastocinesi

INTRODUZIONE

Era mio divisamento completare con una terza ed ultima memoria lo studio dello sviluppo embrionale del Filugello, illustrandone le più importanti modalità morfologiche dal risveglio primaverile allo schiudimento. Senonchè, nello svolgimento del lavoro, al quale da circa due anni ho dedicato tutto il tempo disponibile, si andò accumulando tale quantità di osservazioni, di illustrazioni e di microfotografie, da rendere consigliabile una suddivisione della pubblicazione in due parti: la prima per illustrare lo sviluppo primaverile fino alla blastocinesi, e la seconda dalla blastocinesi alla nascita.

Il materiale che servì per questo studio fu costituito da uova di razze annue e bivoltine; tutti i lotti di uova adoperate per queste ricerche erano assolutamente indenni da infezione pebrinosa, e provenivano dalle più scelte partite di razze pure per riproduzione, fornitimi da accreditate ditte confezionatrici di seme-bachi (1). La tecnica seguita fu essenzialmente la stessa dei miei lavori precedenti [17, 27] per quanto riguarda le sezioni e la loro colorazione. Un'ampia illustrazione microfotografica vollen aggiungere per questa parte dello sviluppo, specialmente per ciò che riguarda l'aspetto generale dell'embrione *in toto* e senza colorazione alcuna. A questa documentazione fotografica, che mancava nella letteratura dell'argomento (per embrioni *in toto*) ho dedicato le due tavole VIII e IX, nella convinzione che la conoscenza esatta dell'evolversi delle forme nei successivi momenti dello sviluppo primaverile possa rendere grandi servizi nella pratica, per la determinazione dell'età degli embrioni, della loro normalità (entro certi limiti), delle discronie che possono

(1) Rivolgo un sincero ringraziamento alle Ditte Fratelli Rocca, Monzini, Marson, e in modo speciale ai Fratelli Sbraccia, i quali ultimi vollero cortesemente prestare la loro collaborazione a tal segno da eseguire sul posto la uccisione di lotti di uova appena estratte dal frigorifero mediante il fissativo spedito loro da Milano.