

EGIDIO MELLINI

Aiuto nell'Istituto di Entomologia
dell'Università di Bologna

CARLO CALLEGARINI

Assistente nell'Istituto di Anatomia comparata
dell'Università di Ferrara

Ricerche elettroforetiche sulle proteine dell'emolinfa delle larve di *Anagasta kuehniella* Zell. (Lep. Pyralidae) parassitizzate da *Devorgilla canescens* (Grav.) (Hym. Ichneumonidae).

INTRODUZIONE.

Gli studi sulle proteine dell'emolinfa degli Insetti sono andati moltiplicandosi in questi ultimi anni utilizzando principalmente le tecniche elettroforetiche, dapprima su carta e in seguito su gel di agar o di amido coi quali ultimi si è ottenuta una migliore risoluzione delle varie frazioni proteiche.

Si è veduto così che il quadro elettroforetico delle proteine dell'emolinfa varia da specie a specie, rivelandosi in tal modo di indubbia utilità nella risoluzione di problemi tassinomici. Si è notato inoltre che gli elettroferogrammi possono variare sensibilmente anche nell'ambito della stessa specie, o in riguardo al numero della bande o rispetto alle concentrazioni delle varie frazioni proteiche separate. Vari Autori hanno infatti riscontrato differenze costanti legate allo stadio di sviluppo, al sesso, a particolari situazioni fisiologiche (come in occasione delle mute, della diapausa, durante il digiuno) e al genotipo (si confronti, ad esempio, la rassegna sintetica di WYATT, 1961).

Date queste notevoli possibilità di modificazione, sia di ordine qualitativo che quantitativo, del contenuto proteico dell'emolinfa, si è voluto, col presente lavoro, indagare se, e in quale misura, la proteinemia possa venire alterata in seguito alla presenza e all'attività nell'emocele dell'ospite di larve di insetti parassiti endofagi, e nel contempo fornire notizie utili per l'oscuro e trascurato argomento relativo alle modalità di nutrizione delle larve degli Imenotteri Terebranti entomofagi.

Per quanto concerne gli effetti degli Esapodi parassiti sull'emolinfa degli Insetti vittime se sono stati studiati con una certa cura quelli relativi agli emociti, poco o nulla si è fatto invece in riguardo alla componente plasmatica del sangue stesso e alle proteine in particolare.

DATI SULLE ALTERAZIONI APPORTATE DA PARASSITI ALL'EMOLINFA DEGLI INSETTI OSPITI.

Abbiamo accennato che per una data specie di insetto, in condizioni normali, certe caratteristiche dell'emolinfa variano in modo specifico durante l'ontogenesi. Aggiungiamo ora che variazioni possono altresì manifestarsi

quando l'insetto viene a trovarsi in condizioni patologiche. A parte le situazioni anormali indotte da agenti vari, quali insetticidi ed altro, che qui non ci interessano direttamente, limitiamoci a considerare quelle provocate da parassiti alla componente plasmatica del sangue, trascurando gli emociti sui quali sono state compiute varie ricerche che però esorbitano dai limiti del presente lavoro.

BALDWIN e HOUSE (1952) hanno trovato che le larve ibernanti e quelle in fase trofica degli Imenotteri Diprionidi *Neodiprion lecontei* (Fitch) e *N. sertifer* (Geoff.), parassitizzate rispettivamente dal Dittero Larvevoride endofago *Drino bohémica* Mesn. e dall'Imenottero Calcidide ectofago *Dahlbominus fuscipennis* (Zett.), mostrano differenze significative nel peso specifico dell'emolinfa, che risulta alquanto maggiore negli individui parassitizzati rispetto a quelli indenni; gli Autori peraltro non sono riusciti a individuare attraverso quale meccanismo venga a manifestarsi tale aumento di densità. ANGUS e HEIMPEL (1956), per quanto riguarda il pH, hanno notato che l'emolinfa delle larve di *Bombyx mori* L. diviene sempre più alcalina in seguito all'ingestione di tossine del *Bacillus sotto*. WEINER et alii (1966) hanno messo in evidenza che la concentrazione dell'Ossigeno nel sangue delle larve del Coleottero Scarabeide *Popillia japonica* (Newman) colpite dal *Bacillus popilliae* è in modo significativo più bassa, almeno nei primi stadi della malattia, rispetto a quella delle larve sane. Nella stessa specie di insetto, infettato da tale microbo, STUBBLEFIELD et alii (1966) hanno trovato che alcuni acidi organici, quali ac. malico, ac. glicolico, ac. tartarico, ac. piruvico, ecc. sono presenti in concentrazione maggiore nelle larve infette in confronto a quelle sane, mentre altri acidi (butirrico, propionico, ecc.) mantengono un livello costante. SHOTWELL et alii (1965), sempre su *P. japonica* infettata da *B. popilliae*, hanno similmente scoperto che le concentrazioni dei vari aminoacidi nel sangue delle larve malate risultano assai diverse da quelle riscontrabili negli individui indenni, mentre il materiale proteico non cambia in misura sensibile, sia qualitativamente che quantitativamente durante l'infezione del suddetto *Bacillus* e del *B. lentimorbus*. Analogamente KAWASE (1965) conclude che nel sangue di larve di *Bombyx mori* L. affette da poliedrosi citoplasmatiche la quantità dei vari aminoacidi scende a circa $\frac{1}{2}$ — $\frac{1}{10}$ di quella delle larve sane, ad eccezione della glicina e della lisina che risultano invece più abbondanti. Passando ora alle proteine dell'emolinfa, i lavori di MARTIGNONI e MILSTEAD (1964 e 1966) dimostrano che nelle larve di VI età del Lepidottero Nottuide *Peridroma saucia* Hb. colpite da nucleopoliedrosi, nonché in quelle infette da granulosi, la proteinemia subisce un pronunciato abbassamento. RUPEREZ (1963), infine, rilevato che le larve del Lepidottero Limantride *Lymantria dispar* L. affette da poliedrosi nucleari presentano un elettroferogramma diverso dalla norma, auspica che vengano compiute ulteriori ricerche in questo campo pressochè insondato, al fine di giungere, come è avvenuto in medicina umana, a diagnosticare i processi patologici negli Insetti attraverso i proteinogrammi elettroforetici.

Per quanto concerne lo studio delle proteine del sangue in Insetti parassitizzati da Metazoi, siamo a conoscenza di un solo lavoro (BARLOW, 1962). In tale brevissima nota, a carattere preventivo, viene comunicato che in occasione di ricerche sull'emolinfa di prepupe dell'Imenottero Tentredinide *Pristiphora erichsonii* (Hartig) si sono notati modelli elettroforetici aberranti e che questi corrispondono a individui parassitizzati da larve della II e della III età dell'Imenottero Iceneumonide *Mesoleius tenthredinidis* Morley. In concreto il sangue delle prepupe che albergano l'endofago contiene un minore quantitativo di proteine rispetto le forme indenni; in particolare appare fortemente impoverita la frazione III, quella che migra più lentamente. Dato l'interesse di questa prima comunicazione in tale campo, l'Autore annuncia il proposito di continuare le indagini, ma a tutt'oggi, a quanto ci risulta, l'argomento non è stato più ripreso nè da questo nè da altri ricercatori.

MATERIALE E METODO.

Le ricerche sono state condotte sul Lepidottero Piralide *Anagasta kuehniella* Zell. parassitizzato dall'Imenottero Iceneumonide *Devorgilla canescens* (Grav.). L'*A. kuehniella* è una specie polifaga, cosmopolita, omodinama, ben nota perchè dannosa a svariate derrate nei magazzini ove svolge numerose generazioni annuali, e perchè spesso utilizzata in ricerche di laboratorio per la facilità con la quale può essere allevata in continuazione durante tutti i mesi dell'anno. La *D. canescens* è una specie partenogenetica, pressochè anandrica, parassita endofaga delle larve e delle crisalidi di vari Microlepidotteri. La femmina mediante la terebra perfora l'esoscheletro dell'ospite e depone un uovo nel lacunoma; la larva parassita vive libera tra i visceri della vittima e raggiunge la maturità attraverso 5 stadi, impupa accanto ai resti del sacrificato previa costruzione di un bozzolo che risulta generalmente incapsulato entro quello della vittima giacchè questa, di solito, soccombe all'azione parassitaria poco dopo la filatura del bozzolo (per l'etologia vedi FRILLI, 1965). Alla temperatura di 25°C il ciclo è abbastanza rapido intercorrendo poco più di una ventina di giorni dalla deposizione dell'uovo allo sfarfallamento dell'adulto.

Gli insetti venivano allevati in camera termo-umidostatica alla temperatura di 25 °C e con umidità relativa del 40%. Entro cristallizzatori del diametro di cm 15, col fondo ricoperto da uno strato di farina di mais alto circa 1 cm, erano posti una ventina di adulti di *Anagasta*. Trascorse 24 o 48 ore i microlepidotteri erano prelevati e immessi in altri contenitori identici. Dopo circa 1 mese, quando le larve avevano oramai raggiunto l'ultima età, venivano liberate nel cristallizzatore una decina di *Devorgilla* adulte che immediatamente iniziavano l'opera di parassitizzazione. A distanza di 6-8-10-12 giorni le larve di *Anagasta* oramai mature o addirittura in atto di imbozzolarsi venivano utilizzate per il prelievo dell'emolinfa. Alla larva, immobilizzata me-

dianche due microspilli (uno sul capo e uno nell'ultimo urite) su fondo di paraffina veniva praticata una piccola incisione a livello di una pseudozampa del IV urite. Per favorire un'abbondante fuoriuscita di sangue le larve venivano sottoposte a una leggera pressione. Il sangue aspirato, a più riprese nella quasi totalità, mediante capillari a livello della ferita ⁽¹⁾ veniva subito depositato al margine di un vetrino coprioggetto e quindi tramite questo inserito direttamente in profondità nella piastra di amido. Per impedire l'imbrunimento dell'emolinfa, che si manifesta dopo qualche minuto di esposizione all'aria ⁽²⁾ e che secondo alcuni Autori disturba la separazione delle proteine durante l'elettroforesi, il sangue veniva mescolato, circa nel rapporto di 2 a 1 con una soluzione satura di feniltiourea. Con l'uso di tale sostanza, quale inibitore dell'azione enzimatica ossidante della tirosinasi presente nel sangue degli insetti, abbiamo in effetti notato un deciso miglioramento della piastra nel senso che le varie bande sono risultate più nette e più marcate.

In poco più di mezz'ora erano trasferiti sulla piastra una dozzina di campioni di emolinfa prelevati da altrettanti individui. Poichè non è possibile, a meno che la larva della *Devorgilla* sia all'ultima età, determinare da segni esteriori se le larve di *Anagasta* sono parassitizzate ⁽³⁾, si procedeva in un secondo tempo alla dissezione delle varie larve accuratamente contrassegnate al fine di accertare la presenza e lo stadio raggiunto dalla larva parassita. Inoltre una modestissima parte di sangue di ciascun campione veniva riservata alla preparazione di strisci per l'esame microscopico, manifestandosi sovente in queste larve infezioni da Sporozoi, che possono, come si è poi veduto, alterare notevolmente gli elettroferogrammi. Le larve venivano caratterizzate anche in riguardo al sesso; la distinzione è assai agevole presentando le larve maschili sulla loro livrea color avorio due caratteristiche macchie di color nocciola chiaro a livello del V urotergo, corrispondenti alle masse testicolari che traspaiono esternamente.

L'elettroforesi è stata condotta su gel d'amido in un sistema di buffer discontinuo secondo il metodo di POULIK (1957). La tecnica seguita è la stessa

⁽¹⁾ Si è avuto cura di non prelevare l'emolinfa che fuoriesce, talora in abbondanza, in corrispondenza dei microspilli di fissaggio, poichè sovente inquinata da liquidi di provenienza stomodeale o proctodeale. Si è visto infatti che l'emolinfa sgorgata attorno allo spillo infisso nel capo digerisce vistosamente, contenendo enzimi dello stomodeo, l'amido della piastra.

⁽²⁾ Non tutti i campioni di sangue diventavano bruni anche dopo prolungata esposizione all'aria. Abbiamo tentato di individuare le cause di tale mancata pigmentazione: in vari casi si è veduto che non imbrunisce l'emolinfa di larve parassitizzate dalla *Devorgilla*, ma l'esame di un maggior numero di campioni ha portato alla conclusione che generalmente non si pigmenta il sangue degli individui in cui è in atto l'infezione di Sporozoi.

⁽³⁾ Secondo CANDURA (1928) le larve parassitizzate divengono solitarie e da ultimo si tessono un bozzolo assai più consistente del normale; ma date le condizioni di sovraffollamento dei nostri allevamenti, non si sono potuti sfruttare questi caratteri discriminativi.

già illustrata in altra pubblicazione da uno di noi (CALLEGARINI, 1966). Dopo varie prove in riguardo al pH, voltaggio, ecc. si sono scelte le seguenti condizioni, con le quali è stata ottenuta la migliore risoluzione delle frazioni proteiche presenti nell'emolinfa di *Anagasta*: pH 9,4 ⁽¹⁾, mA 0,55-0,60/cm, V 100, durata della corsa 105 minuti. Per la colorazione si è usata una soluzione di amido Schwarz in metanolo e acido acetico; il lavaggio è stato effettuato in etanolo e acido acetico.

L'apparecchio per l'elettroforesi funzionava entro una apposita cassa refrigerata a + 10 °C.

Adottando la suddetta tecnica è stato analizzato, con una ventina di piastre, il contenuto proteico dell'emolinfa di circa 250 larve mature di *Anagasta* ottenendo una notevole concordanza nei risultati.

Le percentuali delle varie frazioni proteiche sono state calcolate sui dati di integrazione delle curve di assorbimento della luce delle diverse bande elettroforetiche, ottenuti direttamente nell'apparecchio Chromoscan della Joyce. La lettura veniva effettuata sulla faccia inferiore della piastra ove le bande risultavano più nettamente distinte.

RISULTATI E CONCLUSIONI.

Nelle condizioni in cui è stata condotta l'elettroforesi durante le nostre ricerche, dall'emolinfa delle larve mature di *Anagasta* vengono separate abbastanza nettamente 7 frazioni proteiche, tutte migranti in direzione dell'anodo. Le bande risultano riunite in 3 gruppi bene distanziati, formati rispettivamente dalle bande I-II (le più vicine alla linea di partenza), III-IV (le intermedie), V-VII (quelle che hanno migrato più velocemente). Tra larve mature maschili e larve mature femminili, indenni da parassiti, non si sono notate differenze nel numero delle bande e nemmeno differenze significative nella concentrazione dei materiali proteici nelle bande corrispondenti. Parimenti dicasi per le larve mature di entrambi i sessi che non hanno ancora costruito il bozzolo rispetto a quelle imbozzolate. Nella tabella a pag. 246 riportiamo la media aritmetica, il massimo e il minimo delle percentuali delle varie frazioni proteiche nel sangue di 10 larve mature di sesso maschile e in 10 larve mature di sesso femminile.

Passiamo ora al confronto tra gli elettroferogrammi delle larve mature parassitizzate da *Devorgilla* e di quelle indenni. Tanto per la serie maschile quanto per la serie femminile non si notano differenze nè di ordine quantitativo nè di ordine qualitativo tra i due gruppi di individui. Sia che le larve di *Anagasta* ospitino nel loro lacunoma larvette molto piccole di I e di II

⁽¹⁾ Da notare che la generalità degli Autori ha usato per l'emolinfa degli Insetti soluzioni tampone con pH 8, 2-8,6, cioè con gli stessi valori utilizzati per lo studio delle proteine del sangue dei Vertebrati.

età (lunghe da 0,8 a 2,5 mm), che larve assai più robuste di III e IV età (lunghezza pari a mm 3,5 fino a mm 5, con diametro trasverso massimo di mm 1) il quadro elettroforetico delle proteine dell'emolinfa non mostra cambiamenti rispetto a quello delle forme indenni. Nè la situazione si modifica nei casi in

Percentuali delle varie frazioni proteiche nell'emolinfa di larve mature di *Anagasta kuehniella* non parassitizzate.

Frazioni	♂♂			♀♀		
	media	massima	minima	media	massima	minima
VII	8,5	11,63	6,06	8,19	10,84	4,62
VI	10,97	14,77	8,09	10,58	13,65	8,09
V	18,85	27,27	12,13	17,74	22,89	13,44
IV	19,64	24,37	13,25	19,18	24,92	16,47
III	12,48	18,49	8,55	13,10	16,57	9,15
II	8,32	10,56	5,68	8,63	10,67	6,10
I	21,10	25,51	16,48	22,53	30,34	14,85

cui, oltre alla larva parassita viva, siano presenti nello stesso ospite anche numerose larvette di I età morte in seguito a fenomeni di competizione (il superparassitismo è frequente ma un solo individuo di *Devorgilla* riesce a condurre a termine lo sviluppo).

L'esame del sangue di larve con parassita alla V ed ultima età larvale non è stato effettuato; l'ospite in tali condizioni appare esautorato, in fin di vita, e il liquido emocelico assai scarso. Quando la larva parassita ha raggiunto la maturità misura in media mm 8 in lunghezza e mm 1,6 nel diametro massimo; l'ospite a questo punto, salvo l'esoscheletro, è completamente distrutto; ma già con larve nelle fasi subiniziali dell'ultima età e lunghe 6 mm dalla vittima non è praticamente più possibile prelevare sangue.

Tuttavia si può concludere che la parassitizzazione del nostro Piralide, iniziatasi, evolventesi e concludentesi nel corso della sua ultima età larvale, non ne altera la proteinemia (almeno quale ci è rivelata dalle tecniche elettroforetiche impiegate), anche quando l'endofago, in fasi avanzate dello sviluppo, ha oramai raggiunto dimensioni abbastanza cospicue occupando gran parte della cavità emocelica nella metà posteriore del corpo dell'ospite (che raggiunge una lunghezza media di 13 mm) ove di regola l'endofago, fin dalla I età, si stabilisce e permane.

Per confronto con la tabella della proteinemia degli individui indenni, inseriamo qui analogo prospetto relativo ad altrettanti individui parassitizzati da larve della I fino alla IV età inclusa.

Sovente, con pari quantitativo di sangue inserito nella piastra d'amido, tutte le bande di vari campioni risultano più o meno sbiadite o addirittura completamente obliterate. Tale imponente abbassamento del livello proteico può manifestarsi sia nell'emolinfa di individui parassitizzati da *Devorgilla*

che di individui indenni da questo entomofago. Nel tentativo di scoprire la causa di tali modelli elettroforetici aberranti è stato compiuto l'esame microscopico dei vari campioni di sangue. Si è così accertato che laddove le bande tendono a scomparire, o scompaiono di fatto, l'emolinfa risulta, in misura

Percentuali delle varie frazioni proteiche nell'emolinfa di larve mature di *Anagasta kuehniella* parassitizzate da *Devorgilla canescens*.

Frazioni	♂♂			♀♀		
	media	massima	minima	media	massima	minima
VII	12,63	18,00	8,17	13,16	17,83	6,33
VI	11,37	13,73	9,37	10,77	13,22	7,38
V	17,47	18,26	16,47	18,39	22,50	16,26
IV	19,24	22,35	14,84	16,32	19,85	11,62
III	9,52	13,39	5,83	14,30	30,34	8,30
II	9,49	11,09	8,26	8,79	11,35	5,54
I	20,22	21,89	18,11	18,21	23,92	15,56

minore o maggiore, infettata da Protozoi appartenenti alla classe degli Sporozoi (1). Nella maggioranza dei casi la presenza di *Devorgilla* si accompagna a quella degli Sporozoi, ma i casi di larve con solo l'uno o l'altro dei due parassiti fungono da controllo, dimostrando che con Protozoi soltanto le bande tendono a scomparire mentre con sola *Devorgilla* permangono. A questo riguardo si ritiene opportuno trascrivere i risultati dell'esame parassitologico delle ultime 60 larve utilizzate per l'elettroforesi:

Senza parassiti	Con sola <i>Devorgilla</i>	Con Sporozoi soltanto	Con entrambi i parassiti
33	3	8	16 (2)

(1) Si tratta molto probabilmente della Schizogregarina *Coelogregarina ephestiae*, almeno giudicando in base alla perfetta somiglianza tra i nostri preparati microscopici e le foto delle spore e dei gamonti riportate da YAMVRIAS (1962), che parimenti si è veduto gli allevamenti di *Anagasta* falciati da questo Protozoo.

(2) Ferme restando le singole percentuali di parassitizzazione da parte dei due parassiti la distribuzione teorica che si ottiene con un semplice calcolo delle probabilità è rispettivamente di 12 larve con *Devorgilla*, 17 con Sporozoi e 7 larve con entrambi i parassiti. Le forti differenze che emergono fra la distribuzione riscontrata e quella teorica, ed in particolare l'eccezionale frequenza del multiparassitismo, possono essere spiegate o supponendo che negli individui parassitizzati da *Devorgilla*, e quindi verosimilmente indeboliti, una infezione latente da Sporozoi possa manifestarsi con maggiore facilità, od anche, più probabilmente, ritenendo, come del resto per altri Terebranti in riguardo ad altri ospiti si è accertato (si confronti ad es., per gli Sporozoi, ISSI e MASLENNIKOVA, 1966) che le femmine prolificanti dell'Imenottero trasmettano con le punture di ovideposizione anche i germi della malattia.

Nelle larve infettate dai suddetti Sporozoi l'obliterazione delle 7 bande non procede in modo uniforme; infatti dapprima scompare la frazione proteica II, quindi le frazioni V, VI, VII pressochè sincronicamente, e da ultimo le frazioni III e IV; si è pertanto indotti a dedurre che l'azione degli Sporozoi sul contenuto proteico dell'emolinfa di *Anagasta* sia in certo qual modo selettiva.

Discutiamo ora i risultati ottenuti mediante l'elettroforesi dell'emolinfa delle larve di *Anagasta* parassitizzate, in rapporto alla vita parassitaria condotta dalle larve di *Devorgilla*. È necessario anzitutto premettere che le notizie sulle modalità di nutrizione delle larve di insetti entomofagi parassiti sono assai scarse e salvo casi particolari (come quello di certe larve di Braconidi e di altri Imenotteri Terebranti che si nutrono delle cellule giganti derivate dalla disintegrazione della sierosa nell'emocele dell'ospite) di solito poco dettagliate. In genere si ritiene che l'alterazione e la distruzione dei tessuti e degli organi dell'ospite possa avvenire direttamente, cioè per attacco immediato delle varie parti mediante l'apparato boccale, ovvero indirettamente attraverso il depauperamento dell'emolinfa che viene incessantemente assorbita dal parassita (vedi DOUTT, 1963; BILIOTTI, 1963).

Come si è accennato la larva di *Devorgilla* per raggiungere la maturità finisce col divorare completamente i visceri dell'*Anagasta*, rispettando praticamente il solo esoscheletro. Durante gran parte dello sviluppo, e più precisamente fino agli inizi dell'ultima età, di norma la larva resta localizzata nella metà posteriore del corpo della vittima tra le fascie del corpo adiposo e il canale alimentare. Nella I-IV età l'apparato boccale è poco differenziato e membranaceo ad esclusione delle mandibole che sono, per quanto minute, appuntite e bene sclerificate. Nelle larve di V ed ultima età, invece, tutti i gnati risultano abbastanza evidenti e rinforzati da bande sclerificate. Orbene nel corso delle prime quattro età l'endofago si nutre, con tutta probabilità, soltanto di emolinfa visto che alla dissezione gli organi della larva ospite non mostrano alterazioni di sorta, nemmeno a livello di quella parte del corpo adiposo con la quale il parassita vive a contatto. Giunta alla V età, acquistato un apparato boccale più robusto, divenuta da apneustica polipneustica, la larva parassita cambia all'improvviso il suo comportamento divorando indiscriminatamente tutti i visceri della vittima che, fino a quel momento vitale ed apparentemente sana, viene condotta rapidamente a morte (1).

Complessivamente, alla temperatura di 25 °C, la larva di *Devorgilla* per raggiungere la maturità impiega, dallo sgusciamiento dell'uovo, poco più di 11 giorni, di cui circa 4 trascorsi alla I età, 1 alla II, 1 alla III, 1 e mezzo alla IV e 4 alla V età (CORBET e ROTHERAM, 1965).

(1) Durante tutto lo sviluppo la larva di *Devorgilla* non emette feci che potrebbero inquinare l'emocele della vittima; il canale alimentare risulta infatti chiuso tra mesentero e proctodeo e si apre soltanto poco prima che la larva divenga matura.

Nel corso delle prime 4 età, e cioè in 7 giorni e mezzo, la larva parassita, comportandosi da ematofaga, raggiunge mm 5 in lunghezza e mm 1 nel diametro trasverso; durante l'ultima età, e pertanto in soli 4 giorni, divenuta steatofaga e sarcofaga, raggiunge rispettivamente nelle suddette misure mm 8 e mm 1,6; quindi nel corso della sola V età acquista un volume pari a circa 3 volte e mezzo il volume raggiunto attraverso le 4 età precedenti.

L'ospite fino al termine della IV età del parassita non mostra nè esternamente, nè internamente alterazioni evidenti. Per tutto questo periodo, cioè fino all'inizio dell'ultima età larvale dell'endofago, vi è dunque un certo equilibrio fra i due simbionti antagonisti. Ora le indagini elettroforetiche sulle proteine dell'emolinfa delle larve parassitizzate, mostrando, almeno con le tecniche impiegate, che praticamente non vi è a questo riguardo alcuna differenza rispetto agli individui indenni, confermano che tale equilibrio si mantiene anche su un piano più squisitamente fisiologico.

Come l'ospite riformi il sangue che viene continuamente asportato non ci è noto. Premesso che l'organo in cui vengono sintetizzate le proteine dell'emolinfa, o almeno molte di esse, è il corpo adiposo (vedi CHEN e LEVENBOOK 1966, PRICE 1966 e altri Autori citati da quest'ultimo) ⁽¹⁾ si può supporre che molto probabilmente la costanza della composizione proteica dell'emolinfa, almeno in individui imbozzolati e che quindi hanno smesso di nutrirsi, venga assicurata attraverso la mobilitazione delle sostanze di riserva contenute nel corpo adiposo, il quale pertanto nel mantenere il tasso proteico nel sangue soddisferebbe nel contempo, indirettamente, le necessità nutritive del parassita.

R I A S S U N T O

Mediante elettroforesi su gel di amido è stato studiato il contenuto proteico dell'emolinfa di larve mature di *Anagasta kuehniella* Zell. indenni da parassiti e di larve parassitizzate da *Devorgilla canescens* (Grav.).

Il confronto dei risultati ottenuti ha mostrato che non vi sono differenze tra gli elettroferogrammi di larve indenni e di larve parassitizzate, nè in riguardo al numero delle frazioni proteiche separate nè in riguardo alle percentuali relative. Tale situazione rimane immutata durante lo sviluppo della larva parassita fino al termine della IV (penultima) età. Nel corso di tutte le prime 4 età il parassita, che vive libero nel lacunoma, si nutre esclusivamente di emolinfa e l'ospite risulta apparentemente sano. Ora la costanza della proteinemia conferma che l'equilibrio tra ospite e parassita si mantiene anche su un piano più strettamente fisiologico. L'equilibrio viene tuttavia rotto improvvisamente all'inizio della V (ultima) età del parassita, il quale, durante questo stadio, acquista un apparato boccale più robusto e divenuto da apneustico polipneustico, divora indiscriminatamente tutti i visceri dell'ospite.

Le larve di *Anagasta* (parassitizzate o no da *Devorgilla*) che presentano modelli elettroforetici aberranti (attenuazione o scomparsa progressiva delle varie bande) risultano infettate in misura minore o maggiore da Sporozoi i quali pertanto, a differenza delle larve di *Devorgilla*, provocano una forte caduta del tasso proteico nel sangue dell'ospite.

⁽¹⁾ Non mancano tuttavia Autori che considerano ancora ignota la sorgente delle emoproteine negli Insetti (vedi HUDSON, 1966).

S U M M A R Y

The protein content of the haemolymph of full-grown larvae of *Anagasta kuehniella* Zell. without parasites and of larvae parasitized by *Devorgilla canescens* (Grav.) has been studied by means of starch gel electrophoresis.

From the comparison of the achieved results it appears that there are no differences between the electropherograms of not parasitized and parasitized larvae, as to the number of the proteic fractions, which have been separated, or as to the relative percentages.

Such situation lasts unchanged during the development of the parasite larva until the end of the fourth (last but one) stage. During all the early four stages the parasite living freely in the haemocoel feeds exclusively on haemolymph and its host seems to be intact.

The constant proteinaemia confirms that the host-parasite balance keeps also on a more strictly physiologic level. The balance, however, is upset suddenly at the beginning of the fifth (last) stage of the parasite (when the larva acquires more sclerified mouthparts and its respiratory system changes from apneustic to polipneustic condition), during which it eats up indiscriminately all the internal organs of its host.

The *Anagasta* larvae (parasitized or not by *Devorgilla*) exhibiting aberrant electrophoretic patterns (attenuation and progressive disappearance of the various bands) were infected in a higher or lesser degree by Sporozoa, which, unlike *Devorgilla* larvae, caused a heavy fall of the protein rate in the host blood.

P U B B L I C A Z I O N I C I T A T E

- ANGUS T. A., HEIMPEL A. M. - *An effect of Bacillus sotto on the larvae of Bombyx mori*. - *Canad. Entom.*, vol. 88, 1956, pp. 138-139.
- BALDWIN W. F., HOUSE H. L. - *Factor influencing the specific gravity of insect haemolymph*. - *Canad. Entom.*, vol. 84, 1952, pp. 131-139, 2 figg.
- BARLOW J. S. - *An effect of parasitism on haemolymph electropherograms*. - *J. Insect Pathology*, vol. 4, 1962, pp. 274-275, 1 fig.
- BILIOTTI E. - *Caractères particuliers de la nutrition chez les insectes entomophages*. - *Ann. Nutr. et Alimentation*, vol. XVI, 1962, pp. 319-327.
- CALLEGARINI C. - *Le emoglobine di alcuni Teleostei nostrani di acqua dolce. Studio elettroforetico*. - *Ricerca scientifica*, vol. 36, 1966, pp. 59-64, 15 figg.
- CANDURA G. S. - *Contributo alla conoscenza della Tignola grigia delle provviste alimentari (Ephestia kuehniella Zeller) e del suo parassita Nemeritis canescens Gravenhorst*. - *Boll. Lab. Zool. gen. agr. Portici*, vol. 21, 1928, pp. 149-214, 13 figg.
- CHEN P. S., LEVENBOOK L. - *Studies on the haemolymph proteins of the blowfly Phormia regina. II. Synthesis and breakdown as revealed by isotopic labelling*. - *J. Insect Physiol.*, vol. 12, 1966, pp. 1611-1627, 7 figg.
- CORBET S. A., ROTHERAM S. - *The life history of ichneumonid Nemeritis (Devorgilla) canescens (Gravenhorst) as a parasite of the Mediterranean flour moth, Ephestia (Anagasta) Kuehniella Zeller, under laboratory conditions*. - *Proc. R. ent. Soc. London (A.)*, vol. 40, 1965, pp. 67-72, 6 figg.
- DOUTT R. L. - *Pathologies caused by insect parasites*. - In: Steinhaus - *Insect Pathology*. - vol. 2, 1963, pp. 393-422.
- FRILLI F. - *Studi sugli Imenotteri Ichnemonidi. I. Devorgilla canescens (Grav.)*. - *Entomologica, Bari*, vol. 1, 1965, pp. 119-207, 32 figg., 5 tavv.
- HUDSON A. - *Proteins in the haemolymph and other tissues of the developing tomato hornworm Protoperce quinquemaculata Haworth*. - *Can. Jour. Zool.*, vol. 44, 1966, pp. 541-555, 7 figg.

- ISSI I. V., MASLENNIKOVA V. A. - *The role of Apanteles glomeratus L. (Hymenoptera, Braconidae) in the transmission of Nosema polyvora Blunck (Protozoa, Microsporidia).* - Rev. Ent. U.R.S.S., vol. 45, 1966, pp. 494-499.
- KAWASE S. - *Free amino acids in the hemolymph and midgut epithelium of the silkworm, Bombyx mori (Linnaeus), infected with Cytoplasmic - Polyhedrosis Virus.* - J. Invertebrate Pathology, vol. 7, 1965, pp. 113-116.
- MARTIGNONI M. E., MILSTEAD J. E. - *Hypoproteinemia in a noctuid larva during the course of nucleopolyhedrosis.* - J. Insect Pathology, vol. 6, 1964, pp. 517-531, 7 figg.
- MARTIGNONI M. E., MILSTEAD J. E. - *Hypoproteinemia in a noctuid larva during the course of a granulosis.* - J. Invertebrate Pathology, vol. 8, 1966, pp. 261-263, 1 fig.
- POULIK M. D. - *Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers.* - Nature, vol. 180, 1957, pp. 1477-1479.
- PRICE G. M., BOSMAN T. - *The electrophoretic separation of proteins isolated from the larva of the blowfly Calliphora erythrocephala.* - J. Insect Physiol., vol. 12, 1966, pp. 741-745, 1 fig.
- RUPEREZ A. - *Procesos patogenos en insectos diagnosticados por proteinograma electroforetico.* - Bol. Serv. Plag. Forest. Madrid, anno VI, n. 11, 1963, pp. 46-52, 4 figg.
- SHOTWELL L. O., BENNETT G. A., HALL H. H., STUBBLEFIELD R. D., PETERS J. E., VAN ETEN C. H., JACKSON R. W. - *Aminoacids in the haemolymph of diseased Popillia japonica (Newman) larvae.* - J. Insect Physiol., vol. 11, 1965, pp. 671-682.
- STUBBLEFIELD R. D., BENNETT G. A., SHOTWELL O. L., HALL H. H., JACKSON R. W. - *Organic acids in the haemolymph of healthy and diseased Popillia japonica (Newman) larvae.* - J. Insect Physiol. vol. 12, 1966, pp. 949-956.
- WEINER B. A., KWOLEK W. F., JULIAN G. ST., HALL H. H., JACKSON R. W. - *Oxygen concentration in larval hemolymph of the Japanese beetle, Popillia japonica, infected with Bacillus popilliae.* - J. Invertebrate Pathology, vol. 8, 1966, pp. 308-313, 1 fig.
- WYATT G. R. - *The biochemistry of Insect hemolymph.* - Ann. Rev. Ent., vol. 6, 1961, pp. 75-102.
- YAMVRIAS C. - *Contribution à l'étude du mode d'action de Bacillus thuringiensis Berliner vis-a-vis de la teigne de la farine Anagasta (Ephestia) kühniella Zeller (Lépidoptère).* - Entomophaga, vol. 7, 1962, pp. 101-159, 12 figg.

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA

- A sinistra.* — Piastra elettroforetica dell'emolinfa di 12 larve mature di *Anagasta kuehniella* Zell.: 1, 3, 7, larve maschili indenni da parassiti; 2, larva maschile parassitizzata da larva alla III età di *Devorgilla canescens* (Grav.); 4, 5, larve femminili indenni da parassiti; 6, larva femminile mediamente infestata da Sporozoi; 8, larva maschile fortemente infestata da Sporozoi; 9, larva maschile fortemente infestata da Sporozoi e parassitizzata da larva alla IV età di *D. canescens* (Grav.); 10, 11, larve femminili indenni da parassiti; 12, larva femminile fortemente infestata da Sporozoi e parassitizzata da larva alla III età di *D. canescens* (Grav.).
- A destra.* — Dall'alto in basso, Curve di assorbimento della luce delle piastre elettroforetiche relative, rispettivamente, alla larva n. 2, alla larva n. 3 e alla larva n. 4: LB, linea di base; S, linea di partenza; I-VII, le varie frazioni proteiche (la I è quella più vicina alla linea di partenza).

