

GIORGIO NUZZACI - ORESTE TRIGGIANI
Istituto di Entomologia Agraria dell'Università di Bari

**Osservazioni ultrastrutturali in larve di
Blepharita (Crino) solieri Boisduval (*Lepidoptera, Noctuidae*)
colpite da una poliedrosi citoplasmatica**

In allevamenti di *Blepharita solieri* Boisd. (*Lepidoptera, Noctuidae*) effettuati durante il 1980-1981 si verificò una elevata mortalità; le larve ammalate apparivano di dimensioni più piccole rispetto alle coetanee sane e, attraverso il tegumento, si intravedeva l'intestino medio infarcito di una sostanza bianca-lattescente.

Esaminando al microscopio ottico pezzi di tessuto dell'intestino medio ed il contenuto del lume intestinale, si evidenziarono numerosissimi cristalli esagonali tipici di una poliedrosi citoplasmatica (PC).

Le poliedrosi citoplasmatiche sono virosi intestinali delle larve di insetti (particolarmente dei lepidotteri) causate da virus con simmetria cubica, senza involucro, a RNA con doppia elica. Il diametro dei virioni varia da 50 a 65 nm. Questi virus appartengono al gruppo *Reoviridae* (MARTIGNONI, comunicazione personale).

Questi cristalli ed i virioni furono estratti (secondo la tecnica di LEWIS, 1960) tramite macerazione dell'intestino medio in acqua e successive filtrazioni e centrifugazioni. Per essere sicuri che la causa della mortalità fosse imputabile al suddetto virus, esso venne somministrato assieme all'alimento, a larve sane della medesima specie, alle condizioni di T° ed U.R. di laboratorio. Le larve così infettate cominciarono a morire circa quindici giorni dall'ingestione, riproducendo gli stessi sintomi della malattia già osservati.

MATERIALI E METODI

Il corion delle uova di *B. solieri* fu disinfettato in superficie con una soluzione al 10% di formalina per 60'; lavato per 2 ore in acqua corrente ed indi in acqua distillata sterile.

Gli autori sono riportati in ordine alfabetico. Entrambi hanno contribuito in egual misura alle osservazioni eto-morfologiche ed alla stesura della presente nota.

Le larve schiuse da queste uova furono alimentate con foglie di erba medica (*Medicago sativa* L.).

Raggiunto il secondo stadio, esse furono infettate tramite somministrazione di erba medica trattata con una sospensione acquosa del virus. La concentrazione virale era di $3,5 \times 10^9$ poliedri per ml di acqua.

L'intestino medio fu prelevato ad intervalli di 2 ore, fissato per 2 ore in glutaraldeide al 3% in tampone fosfato a pH 7 e, successivamente, per 2 ore in tetrossido di osmio al 2% (MARTIGNONI *et al.*, 1969).

Dopo disidratazione nella serie degli alcool, l'inclusione fu effettuata in araldite M. Sezioni ultrasottili (20-50 nm) furono ottenute con l'ultramicrotomo LKB III con lama di diamante e contrastate con acetato di uranile e citrato di piombo (REYNOLDS, 1963). Le griglie furono osservate al microscopio elettronico EM 109 Zeiss.

RISULTATI E CONCLUSIONI

L'ultrastruttura delle cellule dell'intestino medio, dopo 72 ore dalla ingestione del virus, mostra un reticolo endoplasmatico organizzato in modo differente da quello della cellula sana, assumendo una caratteristica disposizione (fig. 1, A-B) a forma di vescichette (SMITH, 1976). In questa fase non si nota ancora la presenza di cristalli proteici nel citoplasma delle cellule epiteliali.

Con il progredire dell'infezione, come fu osservato anche da altri autori (LIPA, 1977; SMITH, 1976 ed altri) si notano nelle cellule dense masse di viroplasma dalle quali si organizzano i virioni; essi dapprima liberi nella cellula, vengono inclusi successivamente in cristalli proteici (fig. 2, A-B; fig. 3, A-B-C).

I poliedri sono particolarmente abbondanti nei due terzi apicali delle cellule epiteliali, mentre nella parte basale delle stesse vi può essere presenza di viroplasma; gli organelli cellulari sono bene organizzati solamente nella parte della cellula ove il materiale virale non è presente (fig. 4, A-B). Sono soprattutto le cellule cilindriche quelle nel cui citoplasma si sviluppano i virus, ma, ad infezione avanzata, anche qualche cellula caliciforme può presentare i poliedri nel suo citoplasma (fig. 5).

Il poliedro maturo misura in media 0,7-1 μ m.

Durante l'infezione si osserva che la maggior parte dei virioni viene inglobata all'interno del poliedro, numerosi virioni si addensano superficialmente al poliedro ed altri rimangono completamente liberi, anche quando la cellula lisciosandosi riversa il suo contenuto nel lume intestinale (fig. 6, A-B).

Lo sviluppo del virus oggetto della presente nota, viene descritto per la prima volta in *B. solieri*. Quest'ospite è stato riportato come polifago su piante

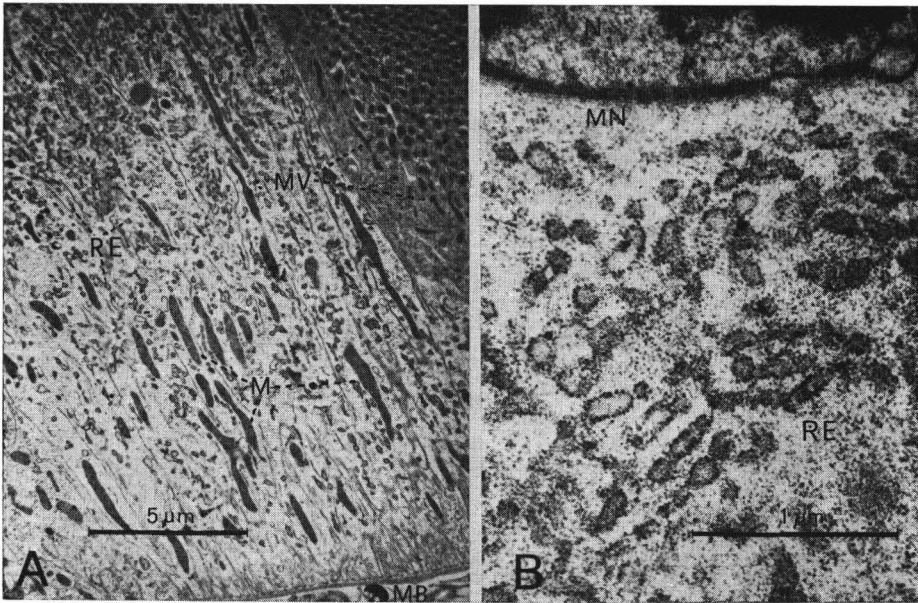


Fig. 1 - A: Cellula dell'intestino medio di *Blepharita solieri* all'inizio della infezione da virus della poliedrosi citoplasmatica. Il reticolo endoplasmico evidenzia una particolare disposizione conseguente all'inizio dell'infezione. B: stesso tipo di cellula, a maggiore ingrandimento, nella zona perinucleare. RE, reticolo endoplasmico; M, mitocondri; MN, membrana nucleare; MV, microvilli; N, nucleo.

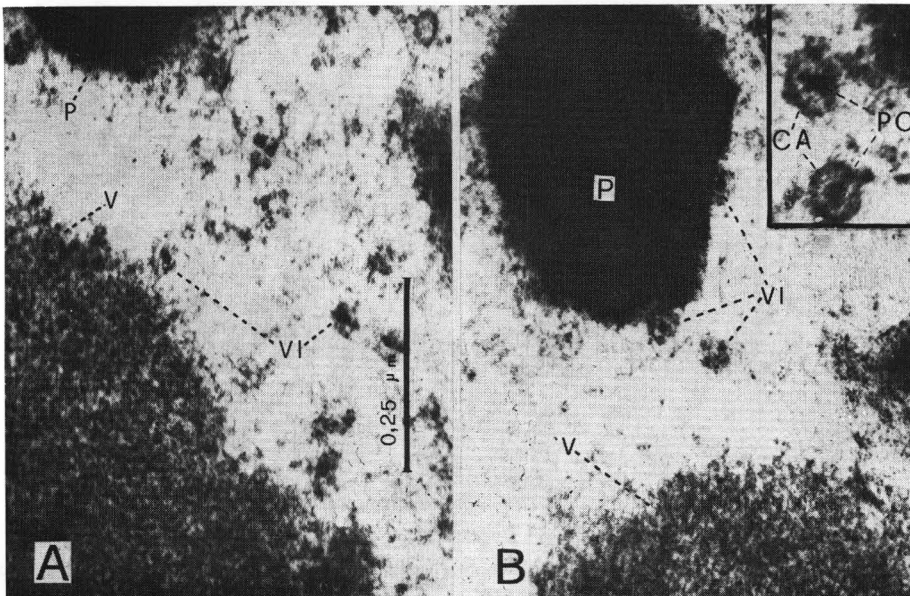


Fig. 2 - A, B: Particolari, allo stesso ingrandimento, di cellule dell'intestino medio di *B. solieri*, mostranti la formazione dei virioni da parte del viroplasma ed il loro processo di inclusione nei poliedri. CA, capsid; PC, parte centrale (« core »); P, poliedro; V, viroplasma.

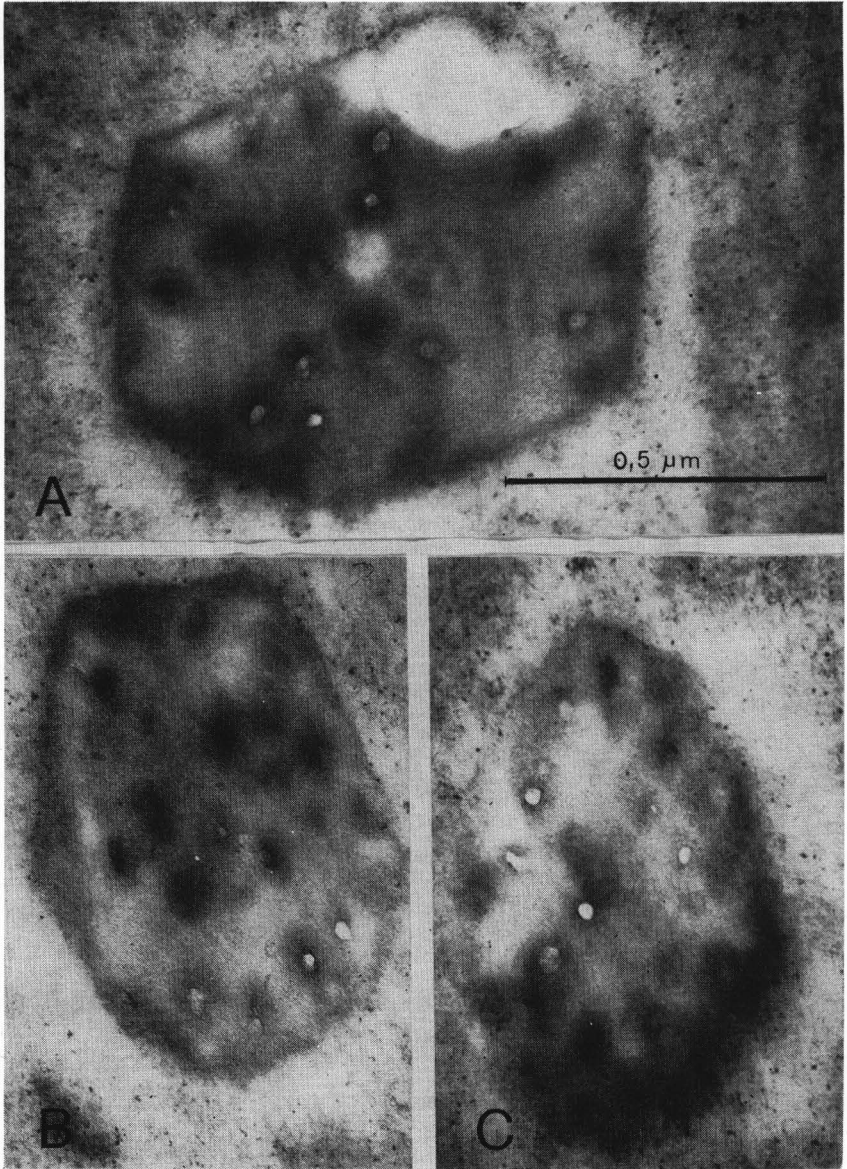


Fig. 3 - Poliedri della poliedrosi citoplasmatica della *B. solieri*. A, B, C: Micrografie allo stesso ingrandimento dei poliedri. Sono visibili le zone di localizzazione dei virioni.

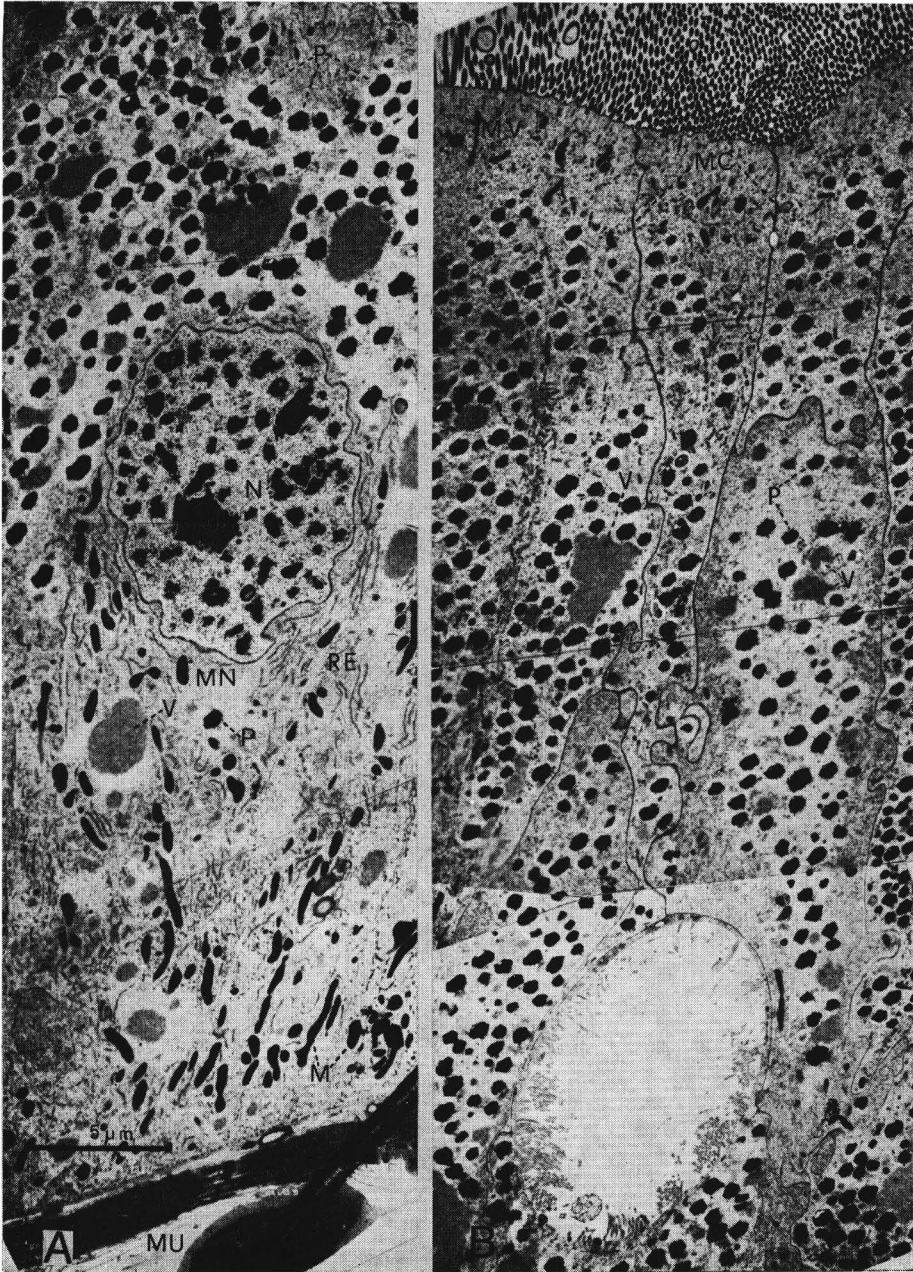


Fig. 4 - Cellule dell'intestino medio della *B. solieri* con virus della poliedrosi citoplasmatica; A, parte basale; B, parte apicale. ER, reticolo endoplasmico; M, mitocondri; MC, membrana cellulare; MN, membrana nucleare; MU, muscoli; MV, microvilli; N, nucleo; P, poliedri; V, viroplasma.

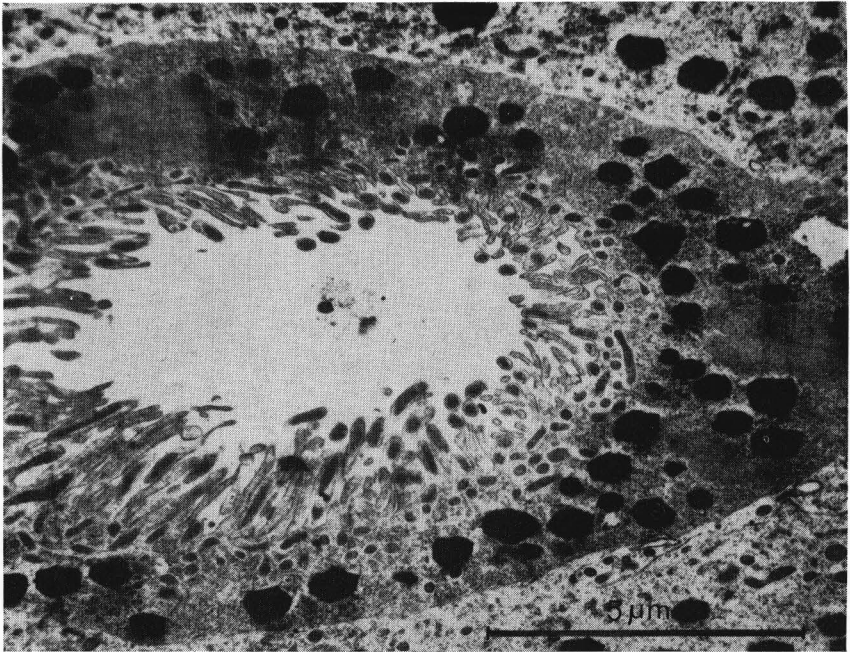


Fig. 5 - Micrografia di una cellula caliciforme mostrante, all'interno del citoplasma, numerosi poliedri.

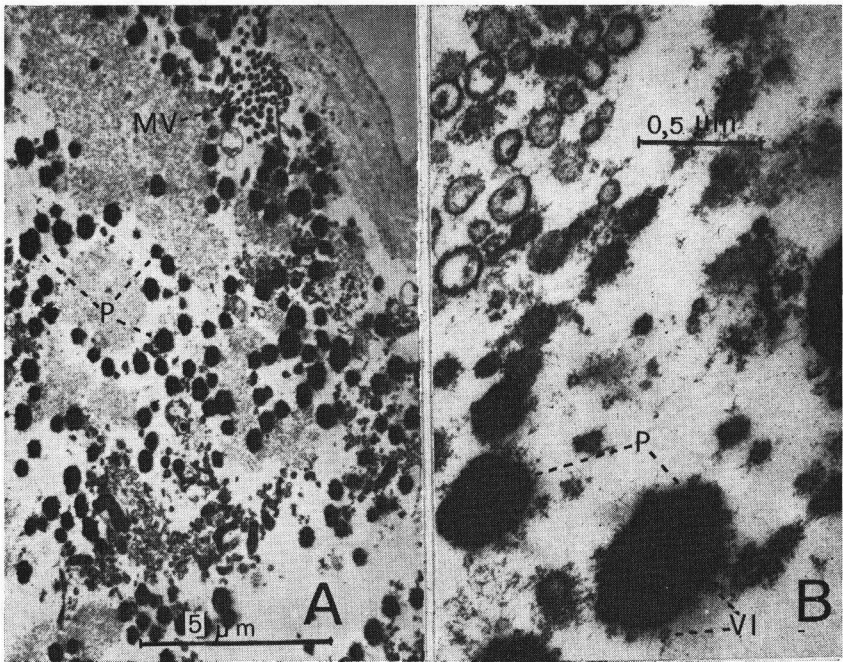


Fig. 6 - Micrografie mostranti poliedri con virioni, e virioni liberi provenienti da una cellula lizzata e riversatisi nel lume intestinale. MV, microvilli; P, poliedri; VI, virioni.

erbacee; in Campania (TREMBLAY, 1972) è stato segnalato dannoso al geranio coltivato. Tra le cause di limitazione della specie in natura erano già riportate, come tra le più importanti, generiche batteriosi. A queste batteriosi si aggiunge ora una virosi, la poliedrosi citoplasmatica da noi descritta.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia il Prof. MAURO E. MARTIGNONI del Forestry Sciences Laboratory di Corvallis, Oregon (Stati Uniti d'America), per la revisione del manoscritto.

RIASSUNTO

Sono effettuate osservazioni, al microscopio elettronico, sullo sviluppo di una poliedrosi citoplasmatica (PC) nelle cellule intestinali del Lepidottero Nottuide *Blepharita (Crino) solieri* Boisduval.

Le micrografie delle cellule dell'intestino medio mostrano che, dapprima il reticolo endoplasmatico delle cellule intestinali subisce una profonda trasformazione, indi si differenziano delle dense masse di viroplasma nelle quali si organizzano i virioni. Essi successivamente vengono inclusi in cristalli proteici.

La forma dei poliedri sembra costante anche se le dimensioni variano a seconda dello stadio di maturazione degli stessi. I poliedri appaiono circondati da un elevato numero di virioni.

SUMMARY

ELECTRON MICROSCOPE OBSERVATIONS ON LARVAE OF *Blepharita (Crino) solieri* BOISDUVAL
(*Lepidoptera, Noctuidae*) INFECTED BY CYTOPLASMIC POLYHEDROSIS VIRUS

Electron microscope observations on the development of CPV in midgut of larvae of *B. solieri* have been made.

Electron micrographs reveal, at first, that the endoplasmic reticulum of the infected cells is deeply transformed; later, dense patches of viroplasm develop. Virions develop in the viroplasm and are included later in polyhedra. The shape of polyhedra appears to remain constant, but their size varies, depending on their stage of development. The cytoplasmic polyhedra were surrounded by numerous virus particles.

BIBLIOGRAFIA

- LEWIS F. B., 1960 - How to collect and process small polyhedral viruses of insects. *Forest Res. Notes North. Forest Exp. St.*, N° 109.
- LIPA J. J., 1977 - Electron microscope observations on the development of Cytoplasmic Polyhedrosis Virus in *Scotogramma trifolii* Rott (*Lepidoptera, Noctuidae*). *Bull de L'Acad. Polon Scienc.*, 25 (3), 155-158.
- MARTIGNONI M. E., IWAI P. J., HUGHES K. M. and ADDISON R. B., 1969 - A Cytoplasmic Polyhedrosis of *Hemerocampa pseudotsugata*. *Journ. Invert. Path.*, 13, 15-18.
- REYNOLDS E. S., 1963 - The use of lead citrate at high pH an electron opaque stain in electron microscopy. *Journ. Cell. Biol.*, 17, 208-212.
- SMITH K. M., 1976 - Virus insect relationships. Ed. « Longman group Lim ».
- TREMBLAY E., 1972 - Notizie sullo svernamento di alcune specie di Lepidotteri *Noctuidae* e *Tortricidae*. *Boll. Lab. Ent. Agr. Portici*, 30, 117-130.
- TRIGGIANI O., 1980 - Controllo degli insetti fitofagi per mezzo dei microrganismi patogeni. Da « Prospettive di controllo biologico degli insetti in agricoltura » C.N.R., AQ/1/51-56, 123-144.