



Università degli Studi di Cagliari

*Dipartimento di Biologia Sperimentale
Sezione di Fisiologia Generale
Dottorato di Ricerca in Scienze Morfologiche*

L'attività dei motoneuroni correlati con il “calling behaviour” ed il meccanismo di rilascio del feromone della farfalla notturna *Lymantria dispar* è modulata dall'octopamina: evidenze elettrofisiologiche.

Tesi di Dottorato:
Dr.ssa Piera Angioni

Tutor:
Prof.ssa Anna Liscia

Coordinatore di dottorato:
Prof. Alessandro Riva

Anni Accademici: 2004-2007

INDICE

INTRODUZIONE	pag. 4
Ruolo del ganglio addominale terminale (TAG) nel meccanismo di produzione e rilascio del feromone sessuale negli insetti	pag. 4
Ruolo dell’octopamina negli insetti in relazione al rilascio e alla produzione del feromone sessuale.....	pag. 8
Impatto ambientale del lepidottero <i>Lymantria dispar</i> L. in Sardegna.....	pag. 10
Ciclo biologico del lepidottero <i>Lymantria dispar</i> L.....	pag. 13
SCOPO DELLA RICERCA	pag. 16
MATERIALI E METODI	pag. 17
Tecnica di dissezione del TAG e di derivazione elettrofisiologica dei potenziali d’azione.....	pag. 17
Tecnica di derivazione EAG e stimolazioni elettriche del complesso TAG/VNC.....	pag. 20
Modalità di somministrazione degli stimoli.....	pag. 21
Stimoli impiegati.....	pag. 21
Effetti di modulazione dell’octopamina sull’attività spontanea delle singole cellule che dal TAG proiettano tramite i nervi IV, V, VI.....	pag. 25
Attività dei nervi IV, V, VI in relazione al programma motorio che sta alla base del “calling behaviour”	pag. 26
Somministrazione di octopamina.....	pag. 26
Registrazioni elettrofisiologiche in vivo in relazione al “calling behaviour”.....	pag. 27
RISULTATI	pag. 29
Derivazioni EAG e effetti delle stimolazioni elettriche del complesso TAG/VNC.	pag. 29

Analisi dell'attività spontanea dei nervi IV, V e VI.....	pag. 31
Effetti di modulazione dell'octopamina sull'attività spontanea delle singole cellule che dal TAG proiettano tramite i nervi IV ,V, VI.....	pag. 33
Attività dei nervi IV, V, VI in relazione al programma motorio che sta alla base del “calling behaviour” in assenza o in seguito all'aggiunta di octopamina.....	pag. 34
Registrazioni elettrofisiologiche ”in vivo” in relazione al “calling behaviour”.	pag. 36
DISCUSSIONE	pag. 38
CONCLUSIONI	pag. 44
BIBLIOGRAFIA	pag. 46
FIGURE E TABELLE	pag. 60

INTRODUZIONE

Ruolo del ganglio addominale terminale (TAG) nel meccanismo di produzione e/o rilascio del feromone sessuale negli insetti

Il sistema nervoso degli insetti è costituito da un encefalo e da una serie di gangli intersegmentali distribuiti lungo una corda nervosa ventrale (VNC). Alcuni di questi gangli, principalmente coinvolti nel controllo della locomozione e del volo, sono localizzati nel torace, mentre quelli addominali sono maggiormente implicati nel controllo di altre funzioni, tra cui la digestione, l'escrezione e soprattutto la riproduzione.

In particolare, è stato dimostrato che, nelle farfalle notturne, il ganglio addominale terminale (TAG) svolge un ruolo fondamentale nel controllo del richiamo sessuale da parte degli esemplari di sesso femminile, il cosiddetto "calling behaviour" (Crnjar et al. 1988). Questo ganglio sembra essere anche coinvolto nel controllo della produzione e/o del rilascio del feromone sessuale grazie alla presenza di cellule ghiandolari specializzate (Solari et al. 2007; Christensen and Hildebrand 1995; Thyagaraja and Raina 1994; Christensen et al. 1994, 1991; Itagaki and Conner 1988; 1987).

La biosintesi del feromone in *L. dispar*, avviene grazie ad un meccanismo secondo cui cellule specializzate chiamate enociti, associate a cellule epidermiche addominali, producono un alchene precursore del feromone stesso (Jurenka et al. 2003). Tale molecola verrebbe poi

trasportata fino alle cellule ghiandolari del feromone da una lipoforina, proteina di trasporto multifunzionale (Pho et al. 1996; Gu et al. 1995; Jurenka e Roelofs 1993; Chino 1985), dove verrebbe convertita nella forma attiva finale epossidica attraverso vie biosintetiche non ben conosciute.

Il “calling behaviour”, nelle femmine di *Lymantria dispar*, consiste di un’alternanza di estensioni e retrazioni dei segmenti VIII e IX sostenuti da una forte attività muscolare coordinata. La maggior parte dell’attività a spike relativa ai movimenti dell’ovopositore osservata durante il “calling” viene effettuata dai nervi IV, V, VI, emergenti dal TAG, anche dopo il distacco del ganglio dal resto del sistema nervoso centrale (Crnjar et al. 1988).

E’ stato dimostrato sperimentalmente che, nelle femmine del Lepidottero notturno *Utetheisa ornatrix*, l’esposizione ritmica delle ghiandole del feromone osservata durante il “calling” sembra essere sotto il controllo neurale del TAG (Itagaki and Conner 1987). Analogamente, Crnjar e collaboratori (1988) hanno dimostrato che i movimenti ciclici alternati di estensione e retrazione dell’ovopositore associati al “calling” in *Lymantria dispar* vengono controllati dal TAG attraverso le tre paia di nervi più caudali IV, V, e VI.

Per contro, il coinvolgimento diretto del TAG nella produzione e/o nel rilascio del feromone sessuale rimane ancora abbastanza controverso e comunque sembra essere di tipo specie-specifico. Infatti, alcuni

ricercatori hanno dimostrato che in alcuni lepidotteri Nottuidi, *Helicoverpa zea* ed *Heliotis virescens*, le ghiandole del feromone sono sotto diretto controllo nervoso e che la stimolazione dei nervi terminali porta ad un aumento della biosintesi e del rilascio del feromone (Christensen et al. 1991, 1994). Diversamente, studi condotti su altri lepidotteri suggeriscono che le suddette ghiandole possono essere anche regolate direttamente da fattori presenti nell'emolinfa (Christensen and Hildebrand 1995; Raina 1993), come per esempio nei lepidotteri Saturniidi in cui è stato ipotizzato un controllo di tipo endocrino (Riddiford 1974, 1978; Riddiford e Williams 1971).

Nonostante la gran mole di dati disponibili, diversi ricercatori continuano a propendere per un meccanismo di tipo neurale (Tang et al. 1987; Itagaki e Conner 1986, 1987; Hollander e Yin 1982, 1985; Webster e Cardé 1984; Sasaki e Riddiford 1984; Sasaki et al. 1983; Röller et al. 1963).

Questa ultima ipotesi verrebbe avvalorata dal fatto che l'interruzione della catena gangliare o la rimozione dell'encefalo causerebbero cessazione del richiamo.

In definitiva, allo stato attuale delle ricerche, in *L. dispar* sembra essere assodato che il TAG esercita un ruolo nel controllo del "calling behaviour", soprattutto tramite le ultime tre paia di nervi e che possieda un rilevante grado di autonomia anche quando disconnesso dal sistema nervoso centrale.

Più recentemente Solari et al. (2007) e Olianias et al. (2006), nel tentativo di acquisire dati più definitivi sul ruolo del TAG nel controllo della produzione e rilascio del feromone sessuale in *L. dispar*, hanno marcato il TAG con destrani coniugati fluorescenti applicati per via retrograda. Questi AA, oltre ad evidenziare i singoli somi neuronali nel TAG hanno anche messo in evidenza un fascio di fibre nervose nel ganglio che si dirige sia verso la zona caudale dello stesso, sia nella zona più a monte. In particolare, per i nervi IV la colorazione evidenzia alcuni neuroni situati in prossimità dell'emergenza del ganglio, per i nervi V viene evidenziato un fascio di fibre diretto verso la corda nervosa ventrale, una serie di neuroni situati in prossimità del nervo e quattro cellule poste sulla linea mediana del ganglio; mentre nel caso dei nervi VI si evidenzia una serie di neuroni situati in prossimità della zona caudale del ganglio. Inoltre, utilizzando la stessa tecnica di colorazione ma per via anterograda, cioè con la marcatura dai tronconi nervosi ai distretti addominali più caudali, Solari et al. (2007) hanno dimostrato che le due paia di nervi V sono nervi misti. Infatti, essi contengono vuoi afferenze di meccanocettori e chemocettori - i quali sono presenti lungo tutta la superficie dell'ovopositore - sia le proiezioni che innervano i muscoli dell'ovopositore. Una morfologia simile è stata evidenziata anche per le proiezioni di nervi VI. Il dato comune a tutte le tre paia di nervi (IV, V e VI) sembra essere la presenza di motoneuroni.

A questo proposito, dati in letteratura riportano che, negli insetti,

L'ammina biogena octopamina può agire come neurotrasmettitore, neuromodulatore o neuormone (Evans 1985) in svariati processi fisiologici sia a livello centrale che periferico (Roeder 1999).

Non sono invece del tutto chiari gli effetti esercitati dall'octopamina sul TAG anche in relazione al controllo che questo ganglio esercita sul "calling behaviour" come riportato da Olianas et al. 2006.

Ruolo dell'octopamina negli insetti in relazione al rilascio e alla produzione del feromone sessuale.

L'octopamina è una ammina biogena, originariamente scoperta nelle ghiandole salivari di *Octopus* che, da un punto di vista strutturale, è in stretta relazione con la noradrenalina. Viene rilasciata da terminazioni neurosecretorie e veicolata dalla circolazione emolinfatica principalmente durante i periodi di aumentata attività o comunque di richiesta energetica (Adamo et al. 1995). Infatti, elevati livelli di octopamina sono stati spesso descritti sia in relazione al fotoperiodo che al comportamento ed in particolar modo allo stress (David et al. 1985a; Evans 1985).

Analogamente, somministrazioni sperimentali di octopamina nell'emolinfa possono modulare il comportamento dell'insetto, come ad esempio l'attività di volo nelle locuste (Stevenson e Kutsch 1987).

L'octopamina sembra inoltre migliorare la percezione e la reattività al

feromone nel maschio delle farfalle notturne *Grapholita molesta* e *Trichoplusia ni* (Linn e Roelofs 1986, 1984). In questi insetti è stato dimostrato sperimentalmente come esistano spiccate variazioni circadiane nel comportamento sessuale, inclusa l'emissione di feromone nelle femmine e l'orientamento verso la sorgente di feromone nei maschi. Questi Autori suggeriscono infatti che il ruolo principale svolto da questo neurotrasmettitore sia quello di modulare l'attività di neuroni localizzati nel sistema nervoso centrale, mentre la possibilità di un controllo diretto sui sistemi sensoriali a livello periferico non è stata presa in considerazione.

Studi precedenti sembrano invece indicare che l'octopamina, al pari di altre ammine biogene, agisca a livello periferico. In particolare, Kuppens e Thurm (1975) suggerirono, nella blatta *Blattella germanica*, un possibile effetto di attivazione non sui neuroni sensoriali veri e propri ma sulle cellule accessorie e dunque sul potenziale transepiteliale da esse generato. Una siffatta azione dell'octopamina rimane però ancora controversa.

Recettori octopaminergici sono stati clonati dal tessuto antennale delle farfalle notturne *Bombyx mori* ed *Heliothis virescens* (Nickisch-Rosenegk et al. 1996). Infine, in uno studio recente (Pophof 2000) è stato dimostrato che in *Antheraea polyphemus* le applicazioni di octopamina aumentano le risposte dei recettori per il feromone. D'altra parte anche in altri sistemi sensoriali era stata dimostrata un'influenza, sia di tipo

diretto che indiretto, delle ammine biogene, come ad esempio sui recettori gustativi (Blaney et al. 1986) o sui propriocettori (Braunig e Eder 1998; Matheson 1997).

Nel lepidottero *L. dispar*, oggetto del presente studio, è stata recentemente dimostrata la capacità dell'octopamina di modulare la formazione di cAMP e l'attività neuronale nel TAG isolato (Olianas et al. 2006). Questo effetto si esplica attraverso una stimolazione dose-dipendente dell'attività adenilato-ciclasica inibita dal Ca^{2+} e mediata da una proteina G. In particolare, l'utilizzo di alcuni antagonisti dell'octopamina in grado di discriminare tra i diversi tipi recettoriali, ha suggerito l'implicazione di un recettore neuronale di tipo 3 (OAR3) per questa ammina biogena.

Dalla gran mole di dati presenti in letteratura si evince dunque che l'octopamina svolge un ruolo centrale nella modulazione di svariate funzioni vitali per la sopravvivenza degli insetti, esplicando la sua azione in particolare a livello del sistema nervoso sia centrale che periferico.

Impatto ambientale del lepidottero Lymantria dispar L. in Sardegna

Il lepidottero *Lymantria dispar* L. (Fig. 1) è una delle specie dell'entomofauna fitofaga presente in Sardegna e rappresenta uno dei principali agenti dannosi del nostro patrimonio boschivo. L'insetto colpisce, in particolare, le quercete a sughera (*Quercus suber*), a leccio

(*Q. ilex*) ed a roverella (*Q. pubescens*) attraverso un'azione defogliante che può causare una notevole riduzione della biomassa fotosintetica delle piante colpite, con conseguente deperimento o addirittura la morte se in concomitanza con altri fattori ecologici sfavorevoli.

Le osservazioni effettuate nell'arco di diversi decenni hanno dimostrato che le popolazioni di *L. dispar* sono soggette a fluttuazioni che, da uno stato di latenza, ne portano la densità a superare ciclicamente il livello critico, causando ingenti danni al patrimonio boschivo (Cerboneschi et al. 1998; Luciano e Prota, 1982a).

In Sardegna è stato stimato che l'ampiezza del periodo delle fluttuazioni di *L. dispar*, calcolata in base alla conta delle ovature, varia da 5-6 a 11-12 anni in differenti aree dell'isola (Hildebrand, 1996; Gu et al., 1995; Hollander e Yin, 1982; Luciano et al., 1982; Diel, 1975). Alcune zone come il Marghine e il Logudoro sono infatti a rischio frequente; altre a rischio periodico, come Gallura e Mandrolisai; altre ancora a rischio saltuario, ad esempio Nuorese, Goceano, Ogliastra e Iglesias.

L'andamento ciclico delle popolazioni di *L. dispar* sembra essere controllato da diversi fattori quali il clima, le relazioni fitofago-pianta ospite, le risorse alimentari, la competizione inter ed intra-specifica, la densità delle popolazioni di parassiti e di predatori, l'incidenza delle malattie, il tasso di fecondità riproduttiva (Cerboneschi et al. 1998; Luciano e Prota, 1982a). Inoltre, sembrano avere rilevante influenza anche le variazioni intrinseche alla popolazione stessa del defogliatore,

sia quelle di carattere genetico che di carattere fisiologico.

Per tenere sotto controllo le popolazioni di questo lepidottero sarebbe necessario intervenire con accurati programmi operativi e prevedere in anticipo le aree dove si verificheranno le condizioni più favorevoli allo sviluppo dell'insetto e quindi ad un aumento delle probabilità di defogliazione del patrimonio arboreo.

Tradizionalmente, questo tipo di previsione si basa su dati storici delle dinamiche di popolazione e sostanzialmente sulla densità e distribuzione della deposizione delle uova o sulle mappe delle aree defogliate negli anni precedenti, e dunque legati alla fecondità delle femmine.

Inoltre, Carboneschi et al. (1998) hanno messo in evidenza un'altra variabile nelle dinamiche della popolazione: quella legata agli individui maschi ed alla loro capacità nel riconoscere le emissioni di feromone sessuale da parte di femmine co-specifiche.

Alla base del successo riproduttivo del lepidottero *L. dispar* due fattori risultano fondamentali: da una parte la regolazione della biosintesi, dell'immagazzinamento e del rilascio del feromone da parte di tessuti specializzati negli insetti di sesso femminile, e dall'altra l'interazione della stessa molecola con i recettori presenti nelle antenne degli esemplari maschili. In questo contesto l'elemento di interesse comune è sempre la molecola del feromone e per questa ragione, la fisiologia della produzione e del rilascio del feromone sessuale nelle farfalle notturne è oggetto di numerosi studi.

Ciclo biologico del lepidottero Lymantria dispar L.

Il ciclo biologico della *Lymantria dispar* L. (Fig. 1A-F) ha inizio tipicamente con l'ovoposizione che avviene subito dopo lo sfarfallamento degli adulti, tra la fine di giugno e la prima decade di luglio. Tale periodo si protrae fino al mese di settembre a quote via via crescenti. Il numero di insetti dipende, almeno in parte, a parità di quota, dalle condizioni climatiche generali che si sono succedute negli anni e dal diverso microclima nelle varie stazioni considerate. Le femmine adulte depongono, sui tronchi degli alberi o altri substrati, ovature contenenti da un centinaio a più di un migliaio di uova ricoperte da una cuticola costituita da una peluria corporea bruna che servirà da protezione (Fig. 1A). Le dimensioni delle ovature ed il numero di uova variano in base alle condizioni della popolazione: nelle popolazioni in decremento sono più piccole rispetto a quelle delle popolazioni in espansione. Lo sviluppo dell'embrione all'interno dell'uovo comincia appena dopo la deposizione, tuttavia le larve non nascono fino alla primavera successiva, ma entrano in diapausa e superano l'inverno allo stadio di uovo. Durante questo periodo possono tollerare brevi esposizioni a temperature molto basse (-35°C), come ad esempio accade in Nord America, ove la *L. dispar* è stata accidentalmente introdotta il secolo scorso.

Dopo la schiusa (Fig. 1B), che normalmente in Sardegna si verifica

all'inizio della primavera, le giovani larve del primo stadio possono rimanere nell'ovatura fino a 24 ore prima di risalire verso la cima dell'albero dove si appendono tramite dei filamenti sericei: se il vento è abbastanza forte i filamenti si rompono e le larve vengono trasportate sugli alberi vicini. Questo tipo di trasporto è la modalità naturale di diffusione più importante per questa specie, dal momento che le femmine adulte non volano: in questo modo le larve si spostano di solito di poche centinaia di metri, ma in certe condizioni di vento possono arrivare anche più lontano. Lo sviluppo dei bruchi prosegue poi attraverso una serie di stadi larvali (5 o 6 per i maschi, 6 o 7 per le femmine) intervallati da mute in cui l'esoscheletro viene perduto e sostituito da uno nuovo più grande (Fig. 1C). Tra maggio e l'inizio di luglio le larve giungono a maturità, consumano una quantità molto maggiore di fogliame rispetto ai primi stadi ed è appunto nel mese di giugno che si verifica la maggior parte delle defogliazioni (Figg. 2A, B).

Nelle ore diurne le larve mature sono solite sostare sotto lembi di corteccia o nelle fessure dei tronchi degli alberi, mentre di notte si dirigono verso la cima dell'albero e si alimentano. Questa migrazione quotidiana non può verificarsi nelle popolazioni ad alta densità nelle quali le larve, in competizione per le risorse di fogliame, si alimentano giorno e notte.

A completamento dello sviluppo le larve vanno alla ricerca di fessure o lembi di corteccia dove incrisalidarsi: tessono dei filamenti sericei (ma

non bozzoli come fanno le larve di altri Lepidotteri) e mutano nello stadio di pupa o crisalide (Fig. 1D). È possibile distinguere le crisalidi femminili da quelle maschili in quanto le prime sono generalmente più grandi. Lo stadio di crisalide dura all'incirca due settimane e lo sfarfallamento dell'adulto comincia con la prima settimana di luglio per continuare fino alla fine del mese con piccole variazioni a seconda della località. Le femmine adulte (Fig. 1E), riconoscibili per il colore bianco mazzato delle ali, sono inette al volo anche perché il loro addome è ricolmo di uova. Esse rimangono immobili sui tronchi degli alberi o dovunque possano emergere e rilasciare il feromone sessuale per attirare i maschi situati sottovento anche ad una certa distanza. Il feromone (“(+)-disparlure”) è stato identificato e prodotto sperimentalmente.

I maschi adulti (Fig. 1F), al contrario delle femmine, hanno livrea bruna ed hanno grandi antenne piumate contenenti diverse migliaia di chemorecettori specifici per il rilevamento del feromone. Dopo lo sfarfallamento i maschi volano secondo traiettorie casuali finché percepiscono la presenza di feromone, dopodiché proseguono il proprio volo controvento per localizzare la femmina e cominciare la fase dell'accoppiamento.

Completata questa fase, la femmina inizia a deporre le uova, mentre il maschio può accoppiarsi più volte.

Gli adulti di entrambi i sessi vivono solo pochi giorni.

SCOPO E FINALITA' DELLA RICERCA

Sulla base di quanto sopra riportato, l'attività di ricerca da me svolta è stata così articolata:

1. acquisire ulteriori dati atti a verificare, tramite stimolazioni elettriche del complesso TAG/VNC, se il rilascio di feromone si attua per via neurale o endocrina.
2. verificare sul TAG isolato dal resto del sistema nervoso, gli effetti di modulazione dell'octopamina sull'attività spontanea delle singole cellule che dal TAG proiettano tramite i nervi IV, V, VI.
3. mettere in relazione l'attività dei nervi IV, V, VI con il programma motorio che sta alla base del "calling behaviour".

MATERIALI E METODI

Insetti

Gli esperimenti sono stati eseguiti su esemplari femminili adulti di *Lymantria dispar* L. di età compresa tra i 2 e 3 giorni provenienti dagli allevamenti della Gypsy Moth Rearing Unit at the Otis Pest Survey Detection and Exclusion Laboratory (U.S. department of Agriculture, Otis ANGB, MA, USA), ricevuti in uno stadio larvale di pre-incrisalidamento. I campioni hanno completato il loro ciclo biologico presso i laboratori della Fisiologia Generale dell'Università di Cagliari, all'interno di celle climatizzate ad una temperatura di 24-25°C, fotoperiodo di 16 h luce / 8 h buio ed umidità relativa pari a circa il 60%, fino all'emergenza dell'adulto. Maschi e femmine sono stati separati per evitare di esporre i maschi al feromone sessuale femminile.

Tecnica di dissezione del TAG e di derivazione elettrofisiologica dei potenziali d'azione

L'attività a "spikes" veniva registrata dai nervi IV, V o VI del TAG isolato dal sistema nervoso centrale in femmine adulte, 24-48 ore dopo la nascita. Gli insetti venivano inizialmente anestetizzati a bassa temperatura e, dopo la rimozione della testa e del torace, la regione addominale era spillata, in opportuna soluzione fisiologica (NaCl 12

mM; KCl 6.4 mM; MgCl₂ 12 mM; CaCl₂ 1 mM; glucosio 354 mM; KOH 9.6 mM; pH 6.59) su un substrato di Sylgard e la cuticola recisa longitudinalmente sul lato ventrale. Il TAG veniva poi disconnesso dalla corda nervosa ventrale (VNC) e dalle tre paia di nervi più craniali sotto il campo visivo di uno stereomicroscopio (Fig. 4A, B). Il ganglio veniva quindi asportato insieme ai distretti addominali più periferici, ossia l'ottavo segmento con la relativa membrana intersegmentale ed il nono segmento (l'ovopositore). Tali segmenti conservavano dunque le connessioni nervose con le tre paia di nervi più caudali del TAG e la capacità di evocare un'attività motoria tipica del "calling behaviour". Un sottile filamento di Ag/AgCl, utilizzato come elettrodo di riferimento, veniva immerso nel bagno contenente il preparato. Un secondo filamento di Ag/AgCl, connesso ad un preamplificatore (WPI 707) ad elevata impedenza d'ingresso ($10^{13} \Omega$), veniva immerso nel bagno contenuto in una vaschetta di vaselina che veniva preventivamente costruita per isolare l'estremità recisa del nervo di cui si voleva derivare l'attività a spikes.

Per ciascuna prova si riproponeva dunque una condizione sperimentale in cui due delle tre coppie di nervi rimanevano integre e connesse con i distretti terminali dell'addome, mentre della restante coppia uno soltanto dei due nervi rimaneva integro ed il controlaterale veniva utilizzato per la derivazione.

Le scariche a potenziali d'azione così derivate venivano visualizzate

sullo schermo di un oscilloscopio (Tektronix 5100), al contempo digitalizzate tramite un convertitore A/D (Axon digitata 1200B; frequenza di conversione: 10.000 punti/s) ed immagazzinate su computer per le successive analisi (programma Axoscope 8.1 e Clampfit 8.0; fig 5). Una volta stabilizzata, l'attività spontanea basale a potenziali d'azione evocata da ciascun nervo veniva registrata per almeno 10 minuti, prima della somministrazione dell'octopamina. E' opportuno ricordare che, date le particolari modalità di derivazione che non garantiscono la registrazione simultanea dell'attività di tutti i neuroni che fanno capo ad un determinato nervo, è possibile che l'attività registrata sia di volta in volta ascrivibile a gruppi di fibre differenti. Le differenze statisticamente significative sono state calcolate tramite il test "t" di Student, con una soglia di significatività del 5% ($p \leq 0,05$).

1a. Tecnica di derivazione EAG e stimolazioni elettriche del complesso TAG/VNC

Per valutare - in tempo reale - il contenuto di feromone nei segmenti addominali responsabili della produzione e/o del rilascio del feromone dalle femmine in “calling” è stata usata la tecnica di derivazione ad elettroantennogrammi (EAG).

Le registrazioni sono state eseguite su antenne isolate di *L. dispar* maschili, una per insetto. Ciascuna antenna veniva posizionata con il lato ventrale rivolto in modo tale da esporre la maggior superficie possibile al flusso dello stimolo. L'elettrodo di registrazione, una micropipetta di vetro (con una punta avente diametro di 20 μm) riempita con soluzione fisiologica (tampone di fosfato di potassio 20 mM, NaCl 12 mM, KCl 6,4 mM, MgCl₂ 12 mM, CaCl₂ 1 mM, Glucosio 354 mM, KOH 9,6 mM, pH finale 6,60) (Kaissling 1995), contenente un filamento di Ag/AgCl, viene delicatamente posizionato contro la punta recisa dell'antenna. Un elettrodo simile Ag/AgCl, inserito alla base del rachide antennale, viene usato come elettrodo di riferimento. Gli EAG vengono registrati con un elettrometro ad alta impedenza (WPI M707), digitalizzati per mezzo dell'Axon Digitata 1200B convertitore A/D (10,000 Hz) e conservati su computer per l'analisi successiva (Axoscope 8.1). Il “*t*” di Student con un livello di confidenza al 95% ($p \leq 0,05$) è stato utilizzato per l'analisi statistica.

1b. Modalità di somministrazione degli stimoli

Gli stimoli venivano somministrati mediante il sistema di distribuzione mod. CS-55 della Syntech, che genera un flusso d'aria costante (flusso principale, 500 ml/min) (fig. 6A). Il flusso d'aria, preventivamente filtrata mediante carbone attivo e poi umidificata, veniva convogliato sull'antenna attraverso un tubo di vetro (8 mm di diametro, 10 cm di lunghezza), posizionato ad una distanza di 15 mm dal preparato. Durante la stimolazione, 100 ml/min (flusso secondario) di aria venivano deviati per 2 secondi attraverso una pipetta Pasteur (15 cm di lunghezza) contenente lo stimolo. L'aria contenente la sostanza test era rimossa dal luogo di sperimentazione per mezzo di una pompa a suzione operante ad una velocità di flusso leggermente superiore a quella di stimolazione. Quando non in uso, lo stimolo veniva conservato a -20°C.

1c. Stimoli impiegati

Allo scopo di accertare quali parti dell'addome della femmina erano coinvolte nella produzione e/o nel rilascio di feromone sessuale, le antenne del maschio venivano stimulate con i tre segmenti addominali terminali della femmina – il settimo segmento (S7), l'ottavo segmento (S8) (che comprende la membrana intersegmentale (IM) tra S7 e S8) e il nono segmento (S9) (l'ovopositore) ottenuti da circa 10 femmine. Gli insetti, prima di venire anestetizzati con il freddo, allo scopo di rendere

più agevole la resezione dei segmenti addominali, venivano indotti ad estrarre l'addome. Successivamente i vari segmenti isolati venivano posti all'interno di una pipetta Pasteur e utilizzati per la stimolazione delle antenne del maschio. In un gruppo di esperimenti, il S8 veniva ulteriormente suddiviso in porzione ventrale e dorsale. Gli stimoli venivano somministrati separati ad intervalli di almeno due minuti. Quando possibile, lo stimolo veniva ripetuto più volte per verificare la riproducibilità della risposta.

In un secondo gruppo di esperimenti, recettori antennali degli esemplari maschio di *L. dispar* erano sottoposti alla stimolazione costituita da femmine in "calling", in accordo con la procedura sperimentale riportata da Christensen et al. (1994). Brevemente, l'insetto, con il lato ventrale rivolto verso l'alto, veniva spillato ad una piattaforma di cera e la cuticola veniva tagliata lungo la linea mediana di S7 per esporre il TAG, l'emergenza dei nervi e la VNC. Il preparato era così posizionato a circa 5 mm dall'antenna sotto un flusso continuo d'aria generato dal sistema di distribuzione degli odori precedentemente descritto. Il TAG veniva continuamente bagnato con soluzione salina per prevenirne il disseccamento.

Le risposte EAG di ciascuna antenna di esemplari maschio venivano continuamente monitorate con la sequenza di stimoli seguente: aria pura, (+)-disparlure, femmine libere in fase di "calling", femmine con l'ovopositore spillato, in seguito a stimolazione elettrica della VNC in

femmine con l'ovopositore spillato prima e dopo la progressiva recisione del IV, V e VI paio di nervi, ed infine nuovamente (+)-disparlure e aria pura, che sono stati scelti come controllo (Fig. 7). Contemporaneamente alle registrazioni EAG, i movimenti di estensione e retrazione dell'ovopositore erano visualizzati su un monitor e registrati in tempo reale con targhette scritte o vocali su Axoscope 8.1.

La lunghezza dell'estensione e della retrazione dell'ovopositore, così come i relativi valori EAG ottenuti nei maschi, venivano calcolati su un massimo di cinque cicli completi (ogni ciclo comprende un'estensione dell'ovopositore e la successiva retrazione) evocati da ognuna delle dieci femmine in "calling" testate in questo gruppo di esperimenti (fig. 7A, B). La stimolazione elettrica della VNC anteriormente al TAG (fig. 7C) veniva eseguita in accordo con la tecnica descritta da Christensen et al. (1994). Di norma la sequenza degli stimoli era di 2-25 impulsi elettrici (tipicamente da 1-5 V) somministrati per mezzo di uno stimolatore elettronico alla frequenza di 20 Hz; l'ampiezza del voltaggio veniva aggiustata fino a che le contrazioni dei muscoli addominali potevano essere visualizzate.

Sulla base di esperimenti preliminari e dati in letteratura che dimostrano in questo periodo una minore variabilità sia nella sensibilità antennale degli esemplari maschili che nel rilascio del feromone da parte della femmina, le antenne del maschio, i segmenti addominali delle femmine e le femmine in "calling" erano testati tra 7 e 10 ore dopo l'inizio della

fotofase.

Una dose di 5 μ g (non saturante) di (+)-disparlure veniva disciolta in 25 μ l di olio di paraffina, applicata alla striscia di carta da filtro piegata a zig-zag (80mm x 5mm) ed usata in tutti gli esperimenti EAG come controllo. In ogni esperimento, prima di ogni stimolazione veniva testata la risposta all'aria ed il suo valore era sottratto al valore EAG ottenuto in risposta alla stimolazione con la sostanza testata.

2. Effetti di modulazione dell'octopamina sull'attività spontanea delle singole cellule che dal TAG proiettano tramite i nervi IV, V, VI.

Per ciascuno dei nervi considerati, le registrazioni dell'attività a spikes venivano suddivise in segmenti, "sweeps", ciascuno della durata di 10 ms. Tali segmenti venivano poi sovrapposti ed i potenziali d'azione contenuti in ciascuno di essi allineati (Fig. 9A). Tale procedura consentiva di caratterizzare i diversi potenziali d'azione, di misurarne l'ampiezza picco-a-picco e di rappresentarli graficamente, sulla base di questo parametro, rispetto al tempo in cui venivano evocati (Fig. 9B). Sono stati inoltre ottenuti degli istogrammi di distribuzione delle ampiezze (Fig. 9C) e dalla combinazione di entrambi i diagrammi è stato possibile calcolare il livello di soglia per la definitiva assegnazione dei potenziali d'azione alle diverse classi di appartenenza.

Negli istogrammi le frequenze dei potenziali d'azione appartenenti a ciascuna classe sono state calcolate ad intervalli di 10 s su un periodo totale di 300 s, sia per quanto riguarda l'attività spontanea basale che quella in seguito al trattamento con l'octopamina. Gli esperimenti preliminari sullo studio dell'attività basale a lungo termine sono stati eseguiti ed analizzati con le stesse modalità, ma su un periodo totale di 1000 s.

I differenti neuroni di volta in volta in attività sono stati indicati con un

numero progressivo crescente con l'ampiezza picco-a-picco del relativo potenziale d'azione.

3a. Attività dei nervi IV, V, VI in relazione al programma motorio che sta alla base del "calling behaviour"

Allo scopo di mettere in relazione l'attività dei nervi IV, V e VI con quella motoria conseguentemente evocata in S8 (compresa la relativa membrana intersegmentale), i movimenti di questi distretti sono stati monitorati tramite l'ausilio di una videocamera e di una scheda di acquisizione video ed immagazzinati su computer per le successive analisi.

3b. Somministrazione di octopamina

Nel presente studio ho utilizzato, come possibile modulatore dell'attività dei neuroni del TAG, una soluzione di octopamina 500 μ M disciolta in soluzione fisiologica. Il neuromodulatore veniva aggiunto direttamente al ganglio in rapporto di diluizione 1:10 (tipicamente 10 μ l ogni 100 μ l). (Si tiene conto di questo ulteriore fattore di diluizione nella suddetta concentrazione di octopamina). Al fine di verificare variazioni dell'attività spontanea legate ad artefatti sperimentali, la somministrazione del modulatore veniva preceduta dall'aggiunta di una pari quantità di soluzione fisiologica (controllo) secondo le stesse modalità.

3c. Registrazioni elettrofisiologiche “in vivo” in relazione al “calling behaviour”

Le registrazioni dell'attività a spikes dei nervi IV, V, VI emergenti dal TAG sono state eseguite 24-48 h dopo la nascita su 10 femmine che mostravano il “calling behaviour”. Per gli esperimenti “*in vivo*” veniva provocata una piccola apertura nella parte ventrale dell'addome della femmina per esporre il TAG e le emergenze dei nervi IV, V, e VI. Le registrazioni venivano eseguite contemporaneamente da due nervi intatti conservando le loro connessioni con i distretti addominali periferici. I movimenti dell'ovopositore associati al “calling behaviour” connessi all'attività a spikes erano simultaneamente video-monitorati.

Un sottile filo d'argento utilizzato come elettrodo di massa veniva immerso nella porzione del III segmento dell'addome della femmina. Un secondo e un terzo filo d'argento che connettono, ognuno, l'elettrodo di registrazione all'ingresso del pre-amplificatore (WPI 707) erano posizionati in modo da agganciare delicatamente il tronco del nervo selezionato e portarlo appena al di fuori della superficie della soluzione salina, allo scopo di ottimizzare il rapporto segnale/disturbo della derivazione. Le scariche erano monitorate su un CRO (Tetronix 5100), digitalizzate attraverso un convertitore Axon Digitata 1200B A/D e immagazzinate su un disco per analisi successive al computer. In ogni esperimento, l'attività a spike è stata registrata solo quando questa era

stabile almeno per 1 minuto. Aliquote di 10 μ l di soluzione salina venivano aggiunte per prevenire il disseccamento dei nervi. L'attività a spikes è stata analizzata per mezzo del Pclamp 10.0 software (Axon Instruments), secondo Dolzer et al (2001). Per ciascun nervo considerato, le registrazioni dell'attività a spikes sono state suddivise in segmenti "sweeps" ciascuno della durata di 10ms. Tali segmenti venivano sovrapposti ed i potenziali d'azione contenuti in ciascuno di essi allineati. Tale procedura consentiva di caratterizzare i diversi potenziali d'azione, di misurarne l'ampiezza picco-a-picco e di rappresentarli graficamente, sulla base di questo parametro, rispetto al tempo in cui venivano evocati. Sono stati inoltre generati degli istogrammi di distribuzione delle ampiezze (fig. 16 A-D) e dalla combinazione di entrambi i diagrammi è stato possibile calcolare il livello di soglia per la definitiva assegnazione dei potenziali d'azione alle diverse classi di appartenenza. Negli istogrammi le frequenze di potenziali d'azione appartenenti a ciascuna classe sono state calcolate ad intervalli di 0.5 s su un periodo totale di 60 s.

RISULTATI

1. Derivazioni EAG e effetti delle stimolazioni elettriche del complesso TAG/VNC

I segnali EAG registrati dall'antenna di un esemplare di sesso maschile in risposta al rilascio discontinuo del feromone da parte di una femmina in "calling" sono mostrati in fig. 7. Esse appaiono sincronizzate con i movimenti di estensione e retrazione dell'ovopositore, tipiche del "calling behaviour".

In dettaglio, il "calling" è inizialmente irregolare (fig 7), probabilmente dovuto allo stress provocato dalla precedente manipolazione a cui sono state sottoposte le femmine a causa della procedura sperimentale. Le risposte EAG variano in forma, ampiezza e durata, ma tipicamente si stabilizzano entro 2 o 3 minuti dall'inizio degli esperimenti. Come riassunto in fig. 7A, D i picchi di risposta nell'EAG ($0.32 \pm 0.04 \text{mV}$) sono strettamente associati con le estensioni dell'ovopositore, con una durata media di registrazione di circa 5.35 ± 0.45 secondi. Le risposte EAG associate con l'estensione dell'ovopositore sono comparabili nella traccia e nel tempo a quelle evocate nei campioni stimolati con il feromone sessuale, benché l'ampiezza delle prime siano mediamente inferiori a quelle ottenibili in risposta al (+)-disparlure 10^{-2} usato come controllo (fig. 6B, C). In particolare è possibile osservare come la fase di

depolarizzazione dell' EAG corrisponda alla fase di estensione dell'ovopositore. La retrazione dello stesso ovopositore ($1.71 \pm 0.11s$) corrisponde invece alla fase di ripolarizzazione del segnale EAG derivato dall'antenna dell'esemplare maschile. Come atteso, non si sono ottenute risposte EAG da parte dell'antenna del maschio dopo la rimozione della femmina dall'area sperimentale.

Quando l'ovopositore viene spillato in una posizione completamente estesa (fig. 7B), le risposte EAG decadono completamente in breve tempo (5-10 secondi), l'iniziale risposta residua è probabilmente dovuta a molecole di feromone presenti nel flusso d'aria corrente.

Analogamente, la stimolazione elettrica della VNC anteriormente al TAG nelle femmine con l'ovopositore esteso ma spillato, non evoca alcuna risposta EAG (fig. 7C). Il mancato rilascio di feromone avviene sia quando tutti i nervi dal TAG sono mantenuti connessi, sia quando siano intatti solo le paia di nervi IV, V e VI.

2a. Analisi dell'attività spontanea dei nervi IV, V e VI

Le figure 10, 11, 12 mostrano rispettivamente l'andamento dell'attività spontanea a potenziali d'azione derivata extracellularmente dai nervi IV, V e VI emergenti dal TAG, su un tempo totale di registrazione pari a 1000 s.

Come mostrato dai due diagrammi di distribuzione delle ampiezze piccola-picco degli spikes (figg. A e B), tutti i nervi considerati sono caratterizzati dall'attività spontanea di diversi neuroni che, come si vede dai relativi istogrammi della figura C, mantengono una frequenza di scarica relativamente costante per tutta la durata della derivazione. Ciò a dimostrazione del fatto che, nelle condizioni sperimentali utilizzate, l'integrità del preparato si conserva a lungo termine.

In dettaglio, dal nervo IV (fig. 10) è stato possibile registrare l'attività relativa ad un massimo di 5 differenti neuroni, ciascuno con una frequenza di scarica peculiare e che varia da 2.6 ± 0.24 a 132.29 ± 2.34 spikes/10 s (neuroni indicati in figura come 5 e 3 rispettivamente). Per quanto riguarda il nervo V (fig. 11), si è registrata l'attività di 7 differenti neuroni, la cui frequenza media di scarica varia tra 2.8 ± 0.21 e 90.14 ± 1.24 spikes/10 s per i neuroni 7 e 6, rispettivamente. Infine, dal nervo VI (fig. 12) è stata registrata un'attività spontanea basale da parte

di 3 neuroni con un minimo di 3.05 ± 0.64 spikes/10s (neurone 1) ad un massimo di 36.92 ± 0.33 spikes/10s (neurone 2).

2b. Effetti di modulazione dell'octopamina sull'attività spontanea delle singole cellule che dal TAG proiettano tramite i nervi IV, V, VI.

Come mostrato dagli esempi di scarica e dagli istogrammi delle figure 13, 14, 15 l'attività spontanea di diversi neuroni dei nervi considerati aumenta in seguito all'aggiunta dell'octopamina.

In dettaglio, nel caso del nervo IV (figg. 13 A e B), due neuroni sono risultati attivi in condizioni basali, indicati in figura come 1 e 2. Di questi, il neurone 2 aumenta la sua attività in seguito alla somministrazione del modulatore, mentre quello 1 sembra mantenere una frequenza di scarica piuttosto costante. Per contro, tre nuovi neuroni che in condizioni basali risultavano silenti, si attivano in seguito all'aggiunta di octopamina. Gli istogrammi in figura 13C indicano che le frequenze medie totali relative all'attività dei neuroni di questo nervo aumentano significativamente da 204.67 ± 50.68 a 412.33 ± 31.99 spikes/10 s per effetto dell'octopamina.

Nella derivazione dell'attività spontanea effettuata dal nervo V è stata riscontrata, in condizioni basali, l'attività di quattro differenti neuroni, di cui tre aumentano la frequenza di scarica in seguito all'aggiunta di octopamina (neuroni 1, 3 e 6), mentre il rimanente (2) mantiene attività costante (figg. 14 A e B). Anche in questo caso tre nuovi neuroni,

indicati come 4, 5 e 7, si attivano esclusivamente in seguito all'aggiunta del modulatore. Per questo nervo l'octopamina determina un aumento significativo delle frequenze medie totali da 148.17 ± 35.32 a 433.17 ± 96.29 spikes/10 s (fig. 14C).

Per quanto riguarda il nervo VI (figg. 15 A e B), delle tre unità dotate di attività spontanea, soltanto due sembrano aumentare la frequenza di scarica in seguito all'aggiunta di octopamina. Tale effetto sembra essere transitorio e di breve durata per l'unità 2, mentre sembra essere di minore entità ma più prolungato nel tempo per il neurone 1. Analogamente a quanto visto per gli altri due nervi, l'aumento di attività indotto dall'octopamina in termini di frequenze di scarica totali è significativo (passando da 93.67 ± 24.61 a 352.33 ± 84.59 spikes/10 s; fig. 15 C).

3a. Attività dei nervi IV, V, VI in relazione al programma motorio alla base del "calling behaviour" in assenza o in seguito all'aggiunta di octopamina.

Le derivazioni elettrofisiologiche dai neuroni dei nervi IV, V e VI emergenti dal TAG sono state messe in relazione con l'attività motoria a livello dell'ottavo segmento (compresa la membrana intersegmentale) che, ricordiamo, è la regione dell'addome in cui viene prodotto e/o rilasciato il feromone sessuale femminile. Gli istogrammi in figura 8 mostrano il numero medio di movimenti/min \pm errore standard riscontrati

quando i nervi IV, V e VI, oppure V e VI o soltanto il VI mantengono integre le connessioni con questo segmento addominale. Nel primo caso (nervi IV + V +VI) non è stata osservata alcuna variazione significativa tra il numero di movimenti rilevato in condizioni basali (9.52 ± 3.59 movimenti/min) o in seguito alla somministrazione di octopamina (11.68 ± 2.78 movimenti/min). Invece, quando il nervo IV veniva reciso e soltanto il V ed il VI mantenevano integre le connessioni con la muscolatura, l'attività motoria aumentava significativamente da 8.22 ± 4.22 a 48.25 ± 8.78 movimenti/min in seguito alla somministrazione del modulatore. Ciò sembra suggerire che il nervo V esplica, attraverso dei neuroni octopaminergici, un controllo sulla muscolatura di questo segmento che sembra essere antagonizzato dal nervo IV.

Infine, quando il solo nervo VI rimaneva connesso, il numero di movimenti osservato diventava del tutto trascurabile, sia in condizioni basali che di modulazione.

3b. Registrazioni elettrofisiologiche "in vivo" in relazione al "calling behaviour".

Le figure 17 e 18 mostrano rispettivamente l'andamento dell'attività spontanea derivata extracellularmente dai nervi IV e V emergenti dal TAG in femmine "in vivo" su un tempo totale di registrazione pari a un minuto.

Come mostrato dagli esempi di scarica e dai due diagrammi di distribuzione delle ampiezze picco-a-picco degli spikes, dal nervo IV (fig. 16 C, D) - diversamente da quanto riscontrato "in vitro" - "in vivo" è stato possibile registrare l'attività relativa ad un massimo di 3 differenti neuroni: due unità da estrusione ed una unità non correlata ai movimenti dell'ovopositore. Tale risultato è anche confermato dai dati riassuntivi mostrati in figura 17 che mettono in relazione la media dell'attività a spike in relazione ai movimenti di estensione e retrazione dell'ovopositore. In dettaglio, delle tre unità da cui è stato possibile derivare, le unità indicate come 1 e 3, aumentavano la frequenza di risposta a potenziali d'azione in corrispondenza dei movimenti che portavano alla estrusione dell'ovopositore. Per quanto riguarda la unità 2 non si ha corrispondenza tra frequenza a potenziali d'azione e movimenti dell'ovopositore stesso. Infatti, la retta di regressione mostrata nei grafici in figura 17 A, C dimostra una correlazione significativa per le unità 1 e 3 che aumentano la frequenza di risposta a spikes/0.5s

all'aumentare dell'estensione dell'ovopositore, mentre non esiste una correlazione per l'unità 2.

Nel nervo V (fig. 16 C, D) è stato possibile registrare l'attività relativa ad un massimo di 5 differenti neuroni: una unità da estrusione, tre unità da retrazione e una unità non correlata ai movimenti dell'ovopositore. I dati riassuntivi mostrati in figura 18 indicano che, delle cinque unità da cui è stato possibile derivare, l'unità indicata come 1, aumentava la frequenza di risposta a potenziali d'azione in corrispondenza dei movimenti che portavano alla estrusione dell'ovopositore. Le unità indicate come 2, 4, 5 aumentavano la frequenza di risposta a potenziali d'azione in corrispondenza dei movimenti che portavano alla retrazione dell'ovopositore. Nell'unità 3 non si ha corrispondenza tra frequenza a potenziali d'azione e movimenti dell'ovopositore stesso. Infatti, La retta di regressione mostrata nei grafici in figura 18 A-D dimostra una correlazione significativa per le unità 2, 4, 5 che aumentano la frequenza di risposta spikes/0.5s all'aumentare delle retrazioni dell'ovopositore, e all'aumentare delle estensioni dell'ovopositore per l'unità 1, mentre non esiste una correlazione per l'unità 3.

DISCUSSIONE

Nei Lepidotteri, l'attività di biosintesi e rilascio del feromone sessuale da parte delle cellule ghiandolari è stata precedentemente descritta come un meccanismo specie-dipendente che comprende fattori neuronali, ormonali o entrambi, probabilmente attivati in differenti periodi nel corso della vita dell'insetto (Christensen e Hildebrand 1995; Raina 1993; Christensen et al. 1991; Tang et al. 1987; Itagaki e Conner 1987, 1986; Sasaki e Riddiford 1984; Webster e Cardé 1984; Sasaki et al. 1983; Hollander e Yin 1982, 1985; Riddiford 1978, 1974; Riddiford e Williams 1971; Röller et al. 1963). Evidenze in diverse specie indicano che i fattori veicolati dall'emolinfa non sono necessari per l'induzione della biosintesi e del rilascio del feromone, poiché la ghiandola da feromone è innervata e regolata dall'attività neuronale proveniente dal TAG fornendo così una via funzionale alternativa per l'attivazione della ghiandola (Christensen et al. 1991). Questo è il caso di *Helicoverpa zea* e *Heliothis virescens*, dove le connessioni neuronali tra il TAG e la ghiandola del feromone esistono e mediano l'attività della ghiandola stessa (Christensen et al. 1991), così come in *Manduca sexta*, dove la stimolazione elettrica dei nervi terminali evoca un incremento sia nella produzione che nel rilascio del feromone (Christensen e Hildebrand 1995; Christensen et al. 1994, 1991). Al contrario, le osservazioni elettrofisiologiche riportate in questo lavoro di tesi ottenute usando le risposte EAG delle antenne di maschio come biosensore del rilascio - in

tempo reale - del feromone da parte della femmina, rivelano che nelle femmine di *Lymantria* in attività di “calling”, il rilascio di feromone è temporalmente associato ai movimenti ciclici di estensione e retrazione dell’ovopositore tipici del normale “calling behaviour”. Per di più, le emissioni discrete sono altamente sincronizzate con la fase di estensione dell’ovopositore, come dimostrato dalla contemporanea depolarizzazione descritta dagli EAG, mentre la retrazione dell’ovopositore è sempre associata alla fase di ripolarizzazione. Al contrario, quando l’ovopositore è sperimentalmente bloccato nella posizione di totale estensione, non si ottengono risposte EAG. L’assenza del rilascio di feromone si manifesta anche in seguito alla stimolazione elettrica del complesso TAG/VNC (utilizzando la stessa procedura descritta per *Manduca sexta* e *Heliothine*) (Christensen et al. 1994, 1991), sia quando tutti i nervi emergenti dal TAG sono mantenuti connessi sia quando i nervi vengono selettivamente recisi dal ganglio, lasciando intatti rispettivamente solo il IV, V, VI paio. Sulla base di quanto su esposto, nelle femmine di *L. dispar*, diversamente da quanto osservato nelle specie di Lepidotteri precedentemente menzionate, il rilascio di feromone si presenta come una conseguenza dei movimenti dell’ovopositore associati al “calling behaviour”, piuttosto che un controllo neurale direttamente esercitato dal TAG sulla ghiandola. Allo stesso tempo appare improbabile che le proiezioni superiori della VNC controllino i distretti riproduttivi topologicamente situati nella parte più caudale dei segmenti addominali.

Questa ipotesi è anche supportata dalle osservazioni morfologiche di Solari et al. (2007) ottenute con il TMR-DA che colora le proiezioni dei nervi IV, V e VI emergenti dal TAG. Infatti, in nessuno degli esemplari testati dai suddetti Autori, si sono evidenziate fibre discendenti da questi nervi e in contatto con le cellule della ghiandola del feromone. Gli stessi AA hanno invece dimostrato che il colorante è in grado di raggiungere i distretti più caudali dell'ovopositore. In altre parole sebbene non si possa escludere che alcune delle proiezioni dalle tre paia di nervi IV, V e VI emergenti dal TAG possano innervare la ghiandola del feromone in *L. dispar*, le evidenze sia morfologiche che elettrofisiologiche escludono una innervazione diretta della stessa.

Come già detto, il feromone è rilasciato solo durante la fase di estensione dell'ovopositore: in *Lymantria* quindi si ipotizza lo stesso meccanismo proposto da Raina et al. (2000) per *H. zea*, in base al quale il feromone attivo prodotto nelle cellule ghiandolari della IM, viene trasferito attraverso la cuticola dall'interno verso il lato esterno. In dettaglio, durante l'attività di "calling", nella fase in cui l'ovopositore è nello stato di estensione, aumenta l'area della superficie esposta e l'attraente sessuale viene quindi più prontamente dissipato; nella successiva fase di retrazione dell'ovopositore una nuova aliquota di feromone viene trasferita dall'interno alla superficie esterna della cuticola ed esposta all'aria durante la successiva estensione dell'ovopositore. La sequenza si

ripete ciclicamente attraverso l'attività del cosiddetto "calling behaviour".

Per quanto riguarda la produzione di feromone, studi precedenti condotti nelle farfalle Eliotine dimostrano che il neurotrasmettitore octopamina provoca un incremento della produzione dello stesso dipendente dall'età e dal fotoperiodo (Christensen et al. 1992, 1991). Gli stessi Autori però non sono in grado di attribuire all'ammina biogena un ruolo esatto così come non è chiaro il suo sito d'azione (Rafaeli e Gileadi 1995; Ramaswamy et al. 1995). In *L. dispar* il TAG manifesta un'importante attività octopaminergica attraverso specifici recettori accoppiati ad una isoforma dell'adenilato ciclasi inibita dal Ca^{2+} e mediata da una proteina G (Olianas et al. 2006). In quest'ultimo studio si è dimostrato che l'octopamina incrementa l'attività a spike dei nervi IV-V-VI emergenti dal TAG, suggerendone così un ruolo nel controllo del "calling".

Uno degli scopi del mio lavoro di tesi era quello di fornire ulteriori elementi utili a chiarire il ruolo dell'octopamina nella risposta a spike dei motoneuroni nel TAG in relazione ai movimenti dell'ovopositore associati al "calling behaviour" nelle femmine di *L. dispar*. I risultati ottenuti mostrano che l'aggiunta di octopamina al TAG aumenta l'attività totale dei nervi emergenti da questo ganglio, aumentando sia la frequenza degli spikes delle unità ad attività spontanea che reclutando nuove unità. In particolare, le registrazioni extracellulari dell'attività assonale registrate dai nervi IV e V in relazione ai movimenti di

estensione e retrazione dell'ovopositore suggeriscono un aumento nel numero di estensioni dello stesso, quando entrambi i nervi IV e V vengono lasciati intatti e viene aggiunta l'octopamina al preparato del ganglio.

I risultati riportati suggeriscono che l'iniezione di octopamina nel TAG intatto evoca un apprezzabile incremento nel rilascio del feromone solo quando le femmine sono libere di effettuare un normale "calling behaviour", determinando l'incremento nella frequenza dei movimenti ciclici.

E' possibile ipotizzare un meccanismo per spiegare il controllo del TAG sull'attività motoria delle porzioni addominali implicate nella produzione e/o nel rilascio del feromone sessuale. La ricerca tesa a chiarire questi aspetti ha messo in relazione l'attività dei nervi IV, V e VI con l'attività muscolare alla base del "calling behaviour". I miei risultati indicano che, quando le tre paia di nervi sono connesse, i movimenti muscolari sono poco evidenti e certamente non collegabili ad un "calling", sia in presenza che in assenza di octopamina. Quando il quarto paio viene disconnesso ed i nervi V e VI sono connessi alla muscolatura i movimenti diventano più evidenti ed il grado di coordinazione appare più simile ad un "calling" fisiologico soltanto in seguito all'aggiunta di octopamina. I soli nervi VI non sono in grado di evocare il "calling", per quanto siano evidenti dei movimenti dell'ovopositore (dati non mostrati). L'attività a spike derivata dagli esperimenti "*in vivo*" spiega come i

nervi più caudali, soprattutto il IV e il V, siano coinvolti nei movimenti di estrusione e retrazione dell'ovopositore. Per il nervo IV le unità riscontrate sono tre: l'unità 1 e la 3 sono coinvolte principalmente nell'estrusione dell'ovopositore, mentre l'unità 2 non sembra essere coinvolta nel meccanismo del "calling".

Per il nervo V sono riscontrabili 5 unità: l'unità 1 è l'unità coinvolta nell'estrusione, le unità 2, 4, 5 sono quelle coinvolte nella retrazione, mentre l'unità 3 non sembra essere coinvolta nel "calling".

CONCLUSIONI

In conclusione, i risultati da me ottenuti suggeriscono che:

- il rilascio e la produzione del feromone in *L. dispar* sono sotto controllo neuro-endocrino piuttosto che neurale, infatti il feromone è rilasciato da un meccanismo di spremitura a livello dell'ovopositore: il cosiddetto "squeezing", dovuto all'attività ritmica alla base del "calling behaviour". Tale attività è controllata dal TAG, tramite il controllo motorio, in modo che il feromone possa raggiungere la superficie cuticolare esterna della membrana intersegmentale (IM) in quantità discrete durante la retrazione dell'ovopositore ed essere alternativamente esposto all'aria durante l'estensione dell'ovopositore stesso;
- l'attività octopaminergica nel TAG è correlata al controllo motorio che sta alla base del "calling behaviour";
- l'aggiunta di octopamina aumenta, in alcuni casi in modo molto rilevante, l'attività di base dei neuroni che proiettano attraverso i suddetti nervi. Tale aumento si esplica anche attraverso un potenziamento della ritmicità dei neuroni, diminuendo l'intervallo tra due treni di spikes successivi.

L' utilizzo *in vivo* di modulatori farmacologici agonisti e antagonisti delle ammine biogene, porterà ulteriori dati utili alla comprensione degli effetti da me riscontrati negli esperimenti *in vitro* e riportati in questo

lavoro. Inoltre, sarà possibile chiarire il ruolo di molecole prodotte e rilasciate dai distretti più a monte del TAG che non è stato possibile evidenziare nei miei esperimenti *in vitro*.

BIBLIOGRAFIA

Adamo S.A., Linn C.E., Hoy R.R. (1995). The role of neurohormonal octopamine during “fight or flight” behaviour in the field cricket *Gryllus bimaculatus*. *J. Exp. Biol.* 198:1691-1700.

Blaney W.M., Schoonhoven L.M. and Simmonds M.S.J. (1986). Sensitivity variations in insect chemoreceptors; a review. *Experientia* 42:13-19.

Braunig P. and Eder M. (1998). Locust dorsal unpaired median (DUM) neurons directly innervate and modulate hindleg proprioceptors. *J. Exp. Biol.* 201: 3333-3338.

Cerboneschi A., Crnjar R., Liscia A., Majone R., Solari P. (1998). Influence of microclimatic variations on EAG responses of *Lymantria dispar* (Lepidoptera, Lymantridae) males to sex pheromone. *Ital. J. Zool.* 65, 267-272.

Chino H. (1985). Lipid transport: biochemistry of emolimph lipophorin. In: Kerkut G.A., Gilbert L.I., editors. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Oxford: Pergamon Press 115-135.

Christensen T.A., Hildebrand J.G. (1995). Neural regulation of sex pheromone glands in Lepidoptera. *Invert Neurosci* 1:97-103.

Christensen T.A., Itagaki H., Teal P.E.A., Jasensky R.D., Tumlinson J.H., Hildebrand J.G. (1991). Innervation and neural regulation of the sex pheromone gland in female *Heliothis moths*. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:4971-4975.

Christensen T.A., Lehman H.K., Teal P.E.A., Itagaki H., Tumlinson J.H., Hildebrand J.G. (1992). Diel changes in the presence and physiological actions of octopamine in the female sex-pheromone glands of heliothine moths. *Insect Biochem Mol Biol* 22(8):841-849.

Christensen T.A., Lashbrook J.M., Hildebrand J.G. (1994). Neural activation of the sex-pheromone gland in the moth *Manduca sexta*: real-time measurement of pheromone release. *Physiol Entomol* 19:265-270.

Crnjar R., Angioy A.M., Pietra P., Yin C-M, Liscia A., Tomassini Barbarossa I. (1988). Control mechanisms of calling behaviour in *Lymantria dispar*: an electrophysiological investigation on the role of the terminal abdominal ganglion. *J Insect Physiol* 34:1087-1091.

David J.C., Coulon J.F. and Lafon-Cazal M. (1985). Octopamine changes in nervous and non-nervous tissues of the locust *Locusta migratoria* L., after different flight conditions. *Comp. Biochem. Physiol.*, 82C, 427-432.

Diel P.A. (1975). Synthesis and release of hydrocarbons by the oenocytes of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *J. Insect Physiol.* 21:1237-1246.

Dolzer J., Krannich S., Fischer K., Stengl M. (2001). Oscillations of the transepithelial potential of moth olfactory sensilla are influenced by octopamine and serotonin. *J Exp Biol* 204:2781-2794.

Evans P.D. (1985). Octopamine. In: Kerkhut G.A., Gilbert L. (eds). *Comprehensive insect biochemistry, physiology and pharmacology*. Pergamon, Oxford, pp500-530.

Giebultowicz J.M., Webb R.E., Raina A.K., Ridgway R.L. (1992). Effects of temperature and age on daily changes in pheromone titer in laboratory reared and wild gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae). *Environ Entomol* 21:821-826.

Golubeva E., Kingan T.G., Blackburn M.B., Maser E.P. (1997). The distribution of PBAN (Pheromone Biosynthesis Activating Neuropeptide)-like immunoreactivity in the nervous system of the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Arch Insect Biochem Physiol* 34:391-408.

Gu X., Quilici D., Juarez P., Blomquist G.J., Schal C. (1995). Biosynthesis of hydrocarbons and contact sex pheromone and their transport by lipophorin in females of the German cockroach (*Blattella germanica*). *J. Insect Physiol.* 41:257-267.

Hildebrand J.G. (1996). Olfactory control of behavior in moths: central processing of odor information and the functional significance of olfactory glomeruli. *J. Comp. Physiol. A* 178: 5-19.

Hollander A.L., Yin C-M. (1982). Neurological influences on pheromone release and calling behavior in the gypsy moth *Lymantria dispar*. *Physiol Entomol* 7:163-166.

Hollander A.L., Yin C-M, Schwalbe C.P. (1982). Location, morphology and histology of sex pheromone glands of the female gypsy moth, *Lymantria dispar* (L.). *J. Insect Physiol* 28:513-518.

Itagaki K. and Conner W. E. (1986). Physiological control of pheromone release behaviour in *Manduca sexta* (L.). *J. Insect Physiol.* 32, 657-664.

Itagaki H., Conner W.E. (1987). Neural control of rhythmic pheromone gland exposure in *Utetheisa ornatrix* (Lepidoptera: Arctiidae). *J Insect Physiol* 33(3):177-181.

Itagaki H., Conner W.E. (1988). Calling behavior of *Manduca sexta* (L) (Lepidoptera: Sphingidae) with notes on the morphology of the female sex pheromone gland. *Ann Entomol Soc Am* 81:798-807.

Kaissling K.E. (1995). Single unit and electroantennogram recordings in insect olfactory organs. In: Spielman AI, Brand JG (eds) *Experimental Cell Biology of Taste and Olfaction*, Current Techniques and Protocols. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 361-377.

Kaneko T., Saeki K., Lee T., Mizuno N. (1996). Improved retrograde axonal transport and subsequent visualization of tetramethylrhodamine (TMR)-dextran amine by means of an acidic injection vehicle and antibodies against TMR. *J Neurosci Methods* 65:157-165.

Kuppers J. and Thurm U. (1975). Humoral control of an ion transport mechanism at epithelial receptors of insects (in German.). *Verh. Dtsch.*

Zool. Ges., 1974, 46-50.

Jurenka R.A., Roelofs W. L. (1993). Biosynthesis and endocrine regulation of fatty acid derived sex pheromones in moths. In: Stanley-Samuelson D.W., Nelson D.R., editors. *Insect lipids: chemistry, biochemistry and biology*. Lincoln: University of Nebraska Press 353-388.

Jurenka R.A., Subchev M., Abad J-L, Choi M-Y, Fabrias G. (2003). Sex pheromone biosynthetic pathway for disparlure in the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:809-814.

Linn C.E. (1997). Neuroendocrine factors in the photoperiodic control of male moth responsiveness to sex pheromone. In: Carde' R.T., Minks A.K. (eds). *Insect pheromone research. New directions*. Chapman & Hall, New York, pp 194-209.

Linn C.E. Jr and Roelofs W.L. (1984). Sublethal effects of neuroactive compounds on pheromone response thresholds in male oriental fruit moths. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 1, 331-344.

Linn C.E. and Roelofs W.L. (1986). Modulatory effects of octopamine and serotonin on male sensitivity and periodicity of response to sex

pheromone in the cabbage looper moth, *Trichoplusia ni*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 3, 161-171.

Linn C.E., Campbell M.G. and Roelofs W.L. (1992). Photoperiod cues and the modulatory action of octopamine and 5-hydroxytryptamine on locomotor and pheromone response in male gypsy moths, *Lymantria dispar*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 20, 265-283.

Linn C.E. Jr, Poole K.R. and Roelofs W.L. (1994 a). Studies on biogenic amines and their metabolites in nervous tissue and hemolymph of adult male cabbage looper moth-I. Quantitation of photoperiod changes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 108C, 73-75.

Linn C.E. Jr, Campbell M.G., Poole K.R. and Roelofs W.L. (1994 b). Studies on biogenic amines and their metabolites in nervous tissue and hemolymph of adult male cabbage looper moth-II. Photoperiod changes relative to random activity and pheromone-response thresholds. *Comp. Biochem. Physiol.*, 108C, 87-98.

Linn C.E. Jr, Poole K.R. and Roelofs W.L. (1994 c). Studies on biogenic amines and their metabolites in nervous tissue and hemolymph of adult male cabbage looper moth-III. Fate of injected octopamine, 5-hydroxytryptamine and dopamine. *Comp. Biochem. Physiol.*, 108C, 99-

106.

Linn C.E., Campbell M.G., Poole K.R., Wu W-Q, Roelofs W.L. (1996). Effects of photoperiod on the circadian timing of pheromone response in male *Trichoplusia ni*: relationship to the modulatory action of octopamine. *J. Insect Physiol.* 42: 881-891.

Luciano P., Delrio G., Prota R. (1982). I defogliatori delle foreste a *Quercus suber* L. Studi Sass., sez III. Ann. Fac. Agr. Univ. Sassari, XXIX: 321-365.

Luciano P., Prota R. (1982a). La dinamica di popolazione di *Lymantria dispar* L. in Sardegna. II. Osservazioni sul parassitismo nel corso della gradazione. *Mem. Soc. Ent. Ital.*, 60: 227-234.

Ma P.W.K., Roelofs W.L. (2002). Sex pheromone gland of the female European corn borer moth, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera, Pyralidae): ultrastructural and biochemical evidences. *Zool Sci* 19:501-511.

Matheson T. (1997). Octopamine modulates the responses and presynaptic inhibition of proprioceptive sensory neurons in the locust *Schistocerca gregaria*. *J. Exp. Biol.* 200: 1317-1325.

Nickisch-Rosenegk E. v, Krieger J., Kubick S., Laage R., Strobel J., Strotmann J., Breer H. (1996). Cloning of biogenic amine receptors from moths (*Bombyx mori* and *Heliothis virescens*). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26: 817-827.

Olianas M.C., Solari P., Garau L., Liscia A., Crnjar R., Onali P. (2006). Stimulation of cyclic AMP formation and nerve electrical activity by octopamine in the terminal abdominal ganglion of the female gypsy moth *Lymantria dispar*. *Brain Res* 1071:63-74.

Percy-Cunningham J.E., MacDonald J.A. (1987). Biology and ultrastructure of sex pheromone-producing glands. In: Prestwich GD, Blomquist GJ (eds) *Pheromone Biochemistry*. Academic Press, New York, NY, pp 27-75.

Pho D.B., Pennanec'h M., Jallon J.M. (1996). Purification of adult *Drosophila melanogaster* lipophorin and its role in hydrocarbon transport. *Arch Insect Biochem Physiol* 31:289-304.

Pophof B. (2000). Octopamine modulates the sensitivity of silkworm pheromone receptor neurons. *J. Comp. Physiol.*, 186A, 307-313.

Rafaeli A., Gileadi C. (1995). Modulation of the PBAN-stimulated

pheromonotropic activity in *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochem Mol Biol* 25:827-834.

Raina A.K. (1993). Neuroendocrine control of sex pheromone biosynthesis in Lepidoptera. *Annu Rev Entomol* 38:329-349.

Raina A.K., Wergin W.P., Murphy C.A., Erbe EF. (2000). Structural organization of the sex pheromone gland in *Helicoverpa zea* in relation to pheromone production and release. *Arthropod Struct Dev* 29:343-353.

Ramaswamy S.B., Jurenka R.A., Linn C.E., Roelofs W.L. (1995). Evidence for the presence of a pheromonotropic factor in hemolymph and regulation of sex pheromone production in *Helicoverpa zea*. *J Insect Physiol* 41:501-508.

Raspotnig G., Schicho R., Stabentheiner E., Magnes C., Stelzl M. (2003). Morphology of female sex pheromone gland in the horse chestnut leafminer *Cameraria ohridella* (Lep., Gracillariidae). *J Appl Entomol* 127:121-126.

Richmond F.J., Gladdy R., Creasy J.L., Kitamura S., Smits E., Thomson D.B. (1994). Efficacy of seven retrograde tracers, compared in multiple-labelling studies of feline motoneurons. *J Neurosci Methods* 53:35-4.

Riddiford L.M. and Williams C.M. (1971). Role of the corpora cardiaca in the behaviour of the saturniid moth. I. Release of sex pheromone. *Biol. Bull. mar. biol. Lab., Woods Hole* 140, 1-7.

Riddiford L.M. (1974). The role of hormones in the reproductive behaviour of the female wild silkmoths. In *Experimental Analysis of Insect Behaviour* (Ed. by Barton-Brown L.), pp. 278-285. Springer, New York.

Riddiford L.M. (1978). Role of the corpora cardiaca in the sex pheromone release by female saturniid moth. In *Insect Chemoreception*, No. 3 (Ed. by Skirkevicius A.), pp 9-16. Lithuanian Academy of Sciences.

Roeder T. (1999). Octopamine in invertebrates. *Progr Neurobiol* 59: 533-556.

Röller H. H., Pipho H. and Holz I. (1963). Zum problem der hormon-abhängigkeit des paarungsverhaltens bei insekten. Untersuchungen an *Galleria melonella* (L.). *J. Insect Physiol.* 9, 187-194.

Sasaki M., Riddiford L. M., Truman J. W. and Moore J. K. (1983). Re-

evaluation of the role of corpora cardiaca in calling and oviposition behaviour of giant silk moths. *J. Insect Physiol.* 29, 695-705.

Sasaki M. and Riddiford L.M. (1984). Regulation of reproductive behaviour and egg maturation in the tobacco hawk moth, *Manduca sexta*. *Physiol Ent.* 9, 315-327.

Solari P., Crnjar R., Spiga S., Sollai G., Loy F., Masala C., Liscia A. (2007). Release mechanism of sex pheromone in the gypsy moth *Lymantria dispar*: a morpho-functional approach. *J Comp Physiol* 193:775-785.

Stevenson P.A. and Kutsch W.A. (1987). A reconsideration of the central pattern generator concept for locust flight. *J. Comp. Physiol.*, 161A, 115-129.

Tang J.D., Charlton R.E., Cardé R.T., Yin C-M. (1987). Effect of allatectomy and ventral nerve cord transection on calling, pheromone emission and pheromone production in *Lymantria dispar*. *J Insect Physiol* 33:469-476.

Tang J.D., Charlton R.E., Cardè R.T., Yin C-M. (1992). Diel periodicity and influence of age and mating on sex pheromone titer in gypsy moth *Lymantria dispar* (L.). *J Chem Ecol* 18:749-760.

Thyagaraja B.S., Raina A.K. (1994). Regulation of pheromone production in the gypsy moth, *Lymantria dispar*, and development of an *in vivo* bioassay. *J Insect Physiol* 40(11):969-974.

Tredici G., Di Francesco A., Miani A., Pizzini G. (1993). Real complete three-dimensional reconstruction of Golgi-impregnated neurons by means of a confocal laser scanning microscope. *NeuroImage* 1(2):87-93.

Webster R. P. and Cardè R. T. (1984). The effects of mating, exogenous juvenile hormone and a juvenile hormone analogue on pheromone titre, calling and oviposition in the omnivorous leafroller moth (*Platynota stultana*). *J. Insect Physiol.* 30, 113-118.

Figura 1

A) femmina che depone le uova sulla corteccia di un albero; B) schiusa delle uova; C) larva; D) crisalide; E) femmina adulta; F) maschio adulto.

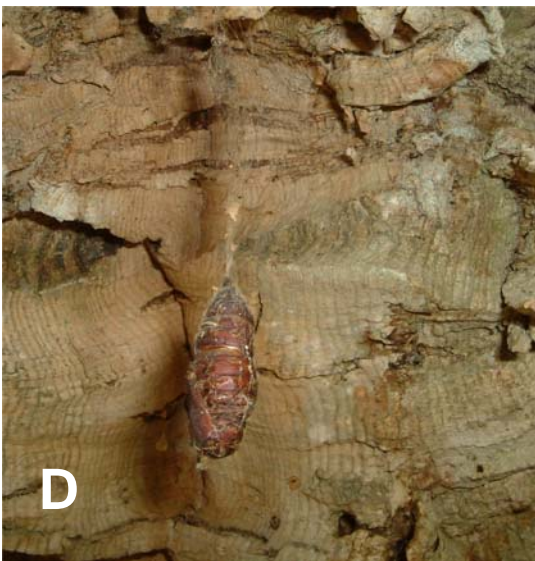


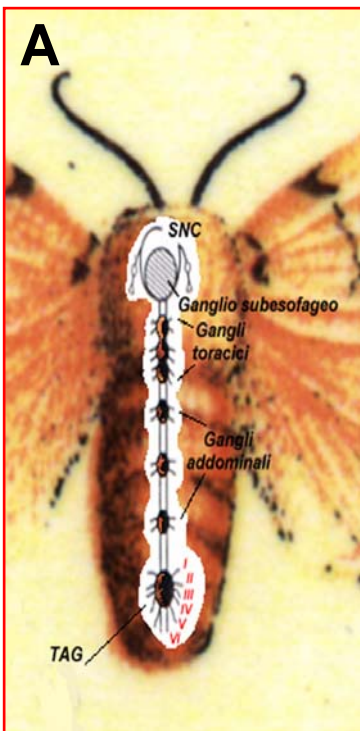
Figura 2

A, B) esempi di defogliazione causata da *Lymantria dispar* L. in una sughereta dell'Iglesiente (Maggio 2003).



Figura 3

(A) Sistema nervoso della femmina di *L.dispar.* (B) ganglio addominale terminale (TAG) con le paia di nervi dal I al VI.



Nervo ⇨

Nervo ⇨

Nervo ⇨

Nervo ⇨

Nervo ⇨

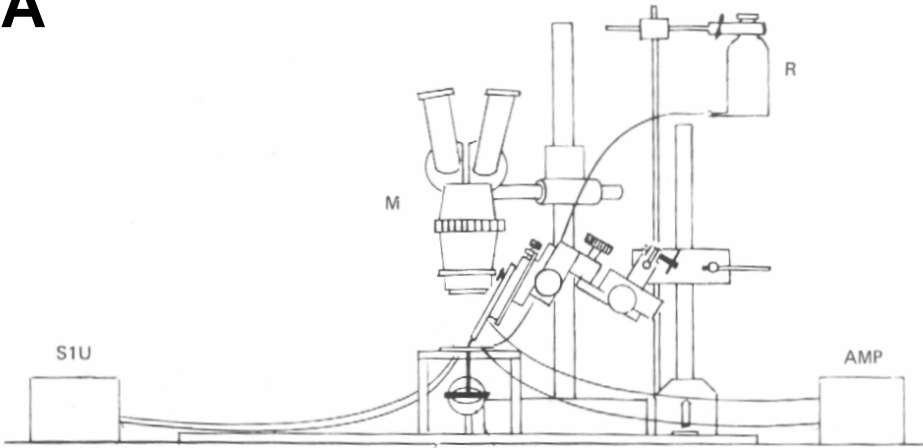
Nervo ⇨



Figura 4

A, B) Apparato di derivazione elettrofisiologica e di somministrazione dell'octopamina. B, binoculare; R, sistema di perfusione; D, strumentazione di derivazione; Sp, sistema di aspirazione della perfusione.

A



B

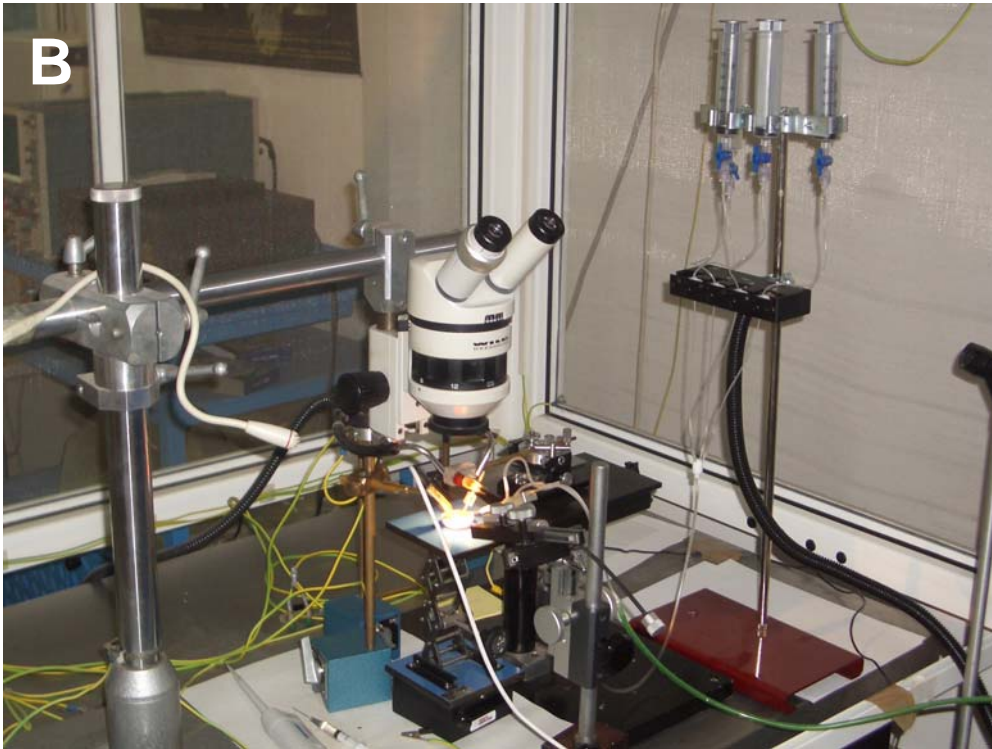


Figura 5

Esempio di scarica a “spikes” dell’attività nervosa basale digitalizzata
tramite il software di acquisizione Axoscope 8.1

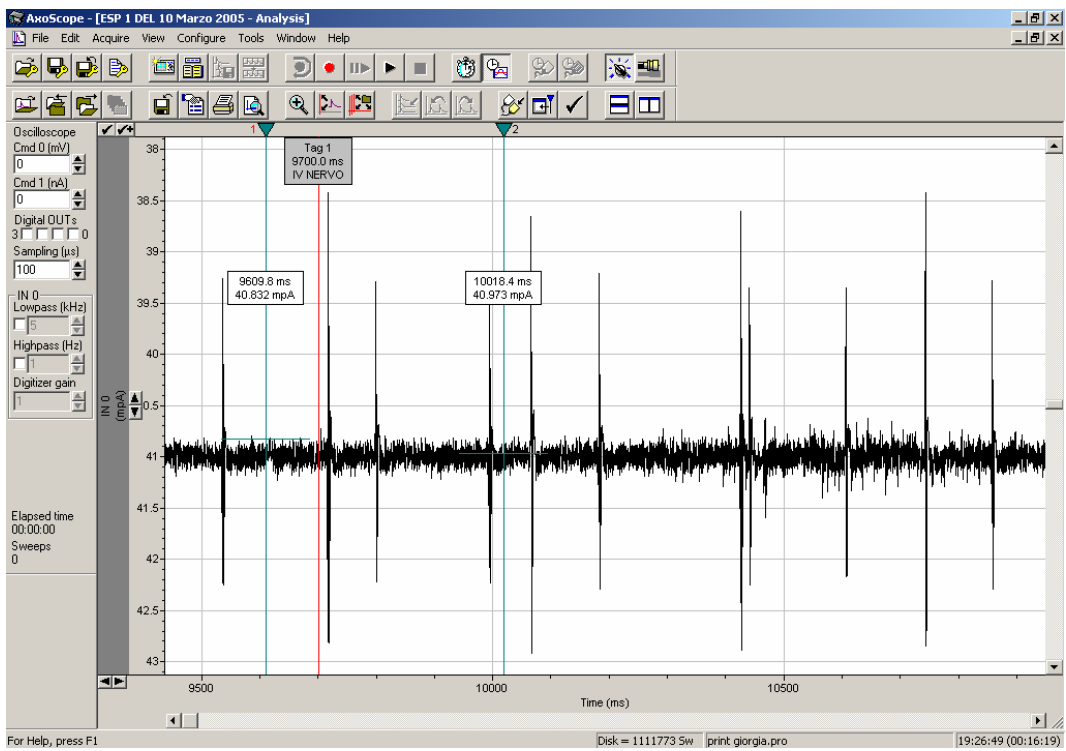


Figura 6 (A)

Schema del sistema olfattometrico;

P₁, P₂, P₃= pompe elettriche a membrana;

F₁, F₂= filtri di carbonio attivo;

F_x= flussimetri ad aria variabile;

V= tubatura di plastica ad ugello di vetro;

P_r= preparato;

O_s= oscilloscopio;

M_g= registratore a nastro magnetico;

T= interruttore a tempo programmabile;

W= ritorno dell'aria all'ambiente;

E= elettrovalvola a solenoide;

O_d= cartuccia ricaricabile contenente lo stimolo.

Derivazione EAG (**B**) e media dei valori dell'ampiezza \pm SE (**C**) registrata dai recettori antennali di dieci esemplari di sesso maschile di *L. dispar* in seguito alla stimolazione con il feromone sessuale (+)-disparlure (5 μ g).

La linea tra le tracce EAG rappresenta la durata dello stimolo.

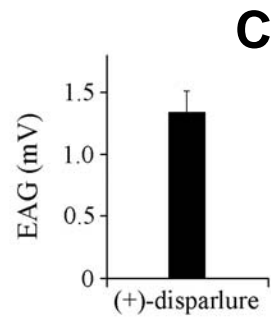
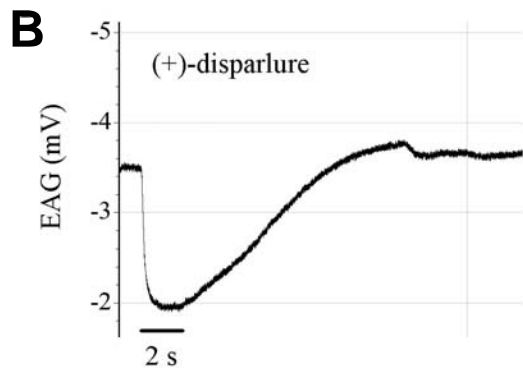
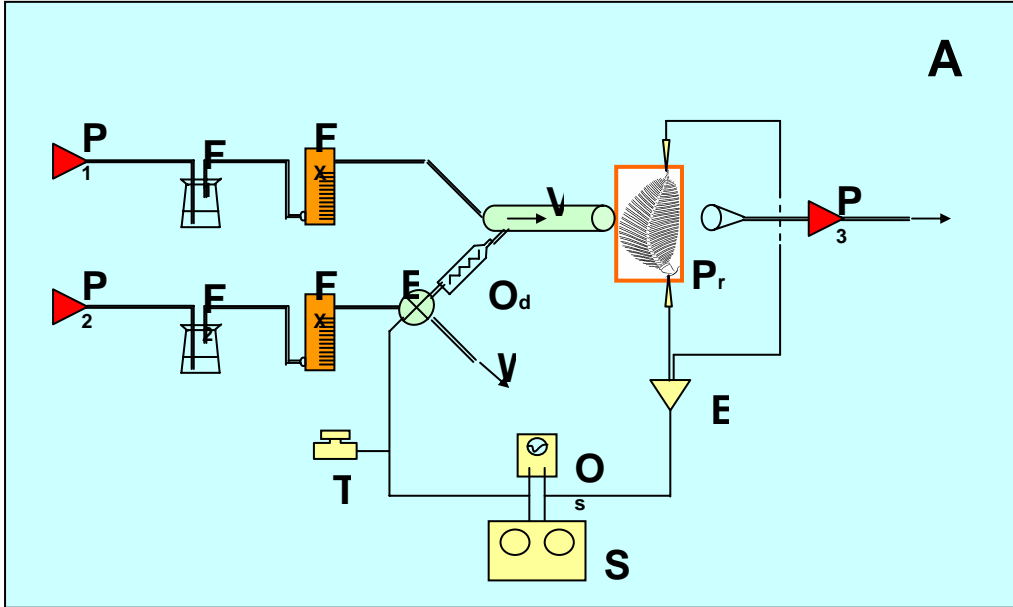


Figura 7

Derivazione EAG registrata dai recettori antennali di un esemplare di sesso maschile di *L. dispar* in risposta al feromone sessuale rilasciato da un esemplare femmina durante il “calling behaviour” (**a**), con l’ovopositore spillato in posizione completamente estrusa, prima (**b**) e dopo (**c**) stimolazione elettrica della VNC (frequenza: 20 Hz).

I *numeri* in (**c**) rappresentano il numero di impulsi per ciascuna stimolazione elettrica. Le barre nere e le barre bianche in (**a**) indicano la fase corrispondente all’estensione dell’ovopositore e alla retrazione rispettivamente.

Gli istogrammi rappresentano la media \pm SE delle lunghezze relative dell’ovopositore, 5 estensioni e 5 retrazioni per ognuna delle 10 femmine testate (n=50). In (**d**) sono riportate le ampiezze medie dei valori EAG \pm SE, 5 EAG per ognuno dei dieci maschi testati (n=50).

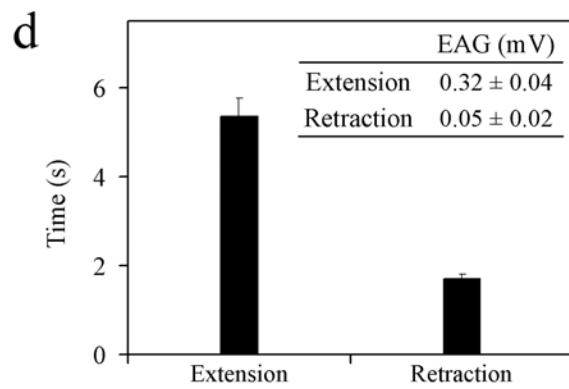
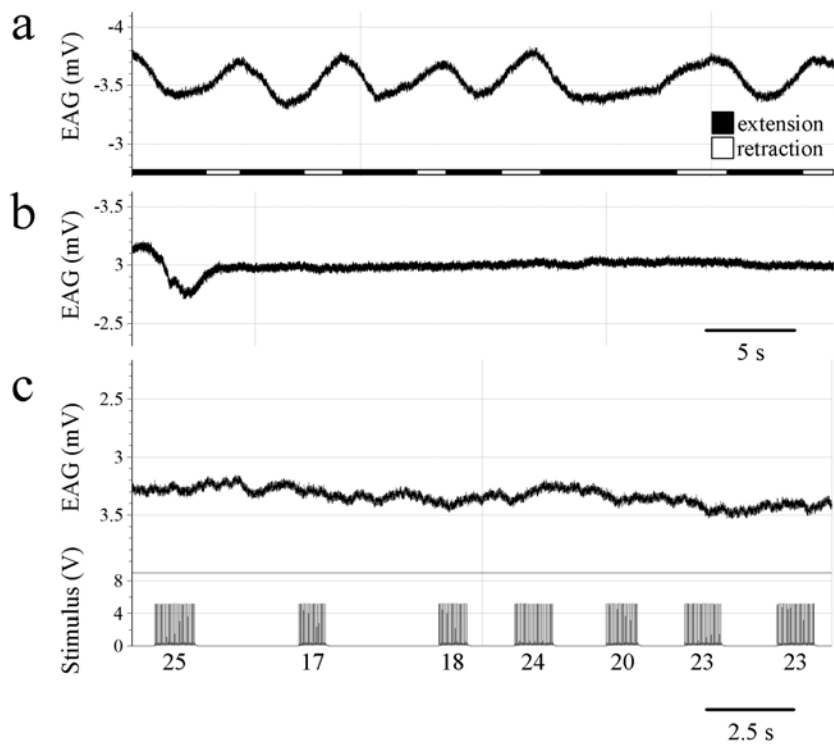


Figura 8

Istogrammi dei valori medi \pm errore standard dei movimenti/min dei muscoli della membrana intersegmentale annessa all'ottavo segmento addominale riscontrati prima e dopo l'aggiunta di octopamina al TAG, quando i nervi IV, V e VI, oppure V e VI o soltanto il VI mantengono integre le connessioni con questo segmento.

Il singolo ed il doppio asterisco indicano una differenza statisticamente significativa ($p \leq 0,05$) rispetto alla condizione Nervi IV+V+VI o Nervi V-VI (n=8).

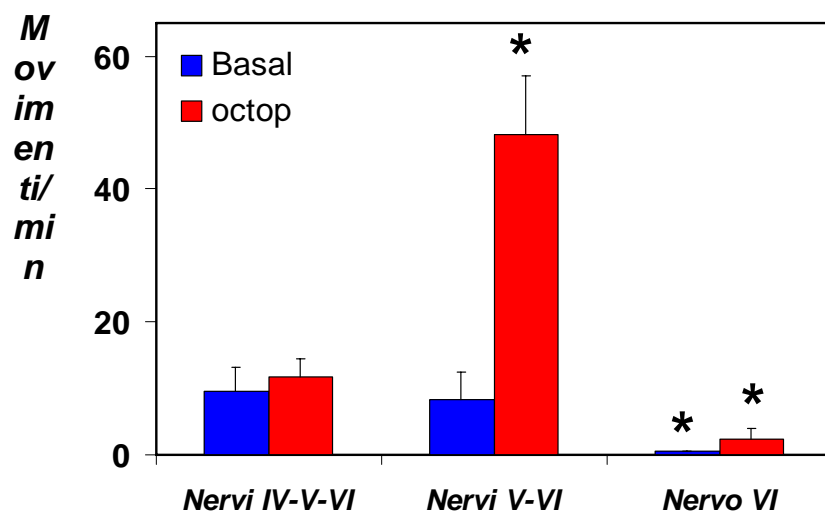


Figura 9

Differenti modalità di analisi (software Clampfit 8.0) delle registrazioni elettrofisiologiche dai nervi per la classificazione dei diversi tipi di spikes.

- A. Le registrazioni dell'attività a spikes sono state suddivise in segmenti, "sweeps", ciascuno della durata di 10 ms. I segmenti vengono poi sovrapposti ed i potenziali d'azione contenuti in ciascuno di essi allineati.
- B. Diagramma in cui i potenziali d'azione vengono suddivisi nelle varie ampiezze picco-a-picco in funzione del tempo.
- C. Istogrammi di distribuzione delle ampiezze picco-a-picco dei potenziali d'azione.

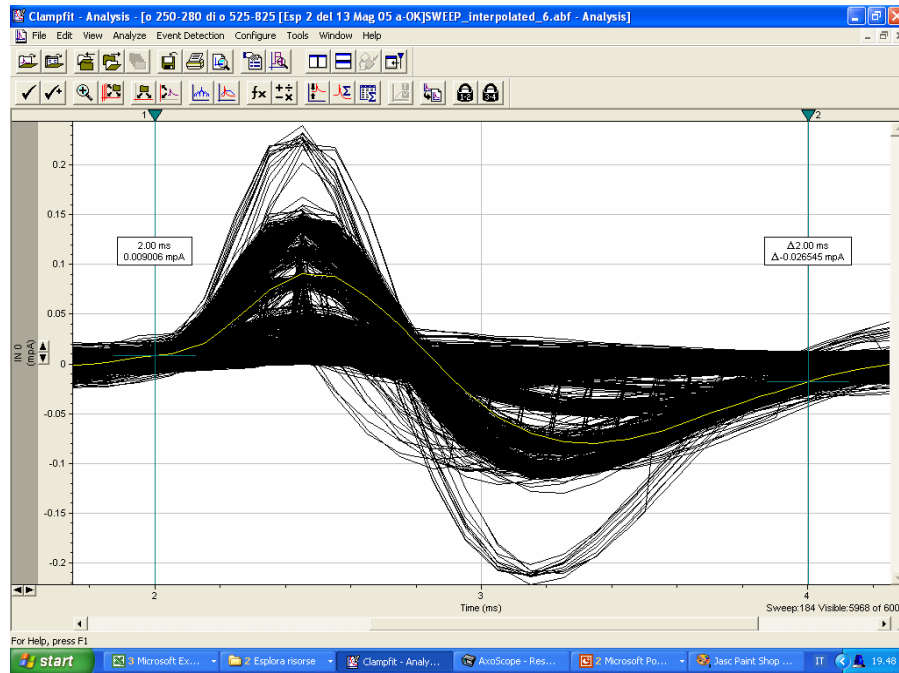
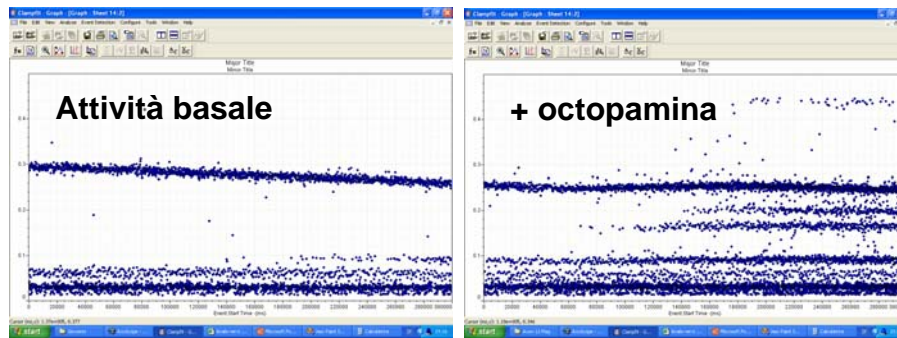
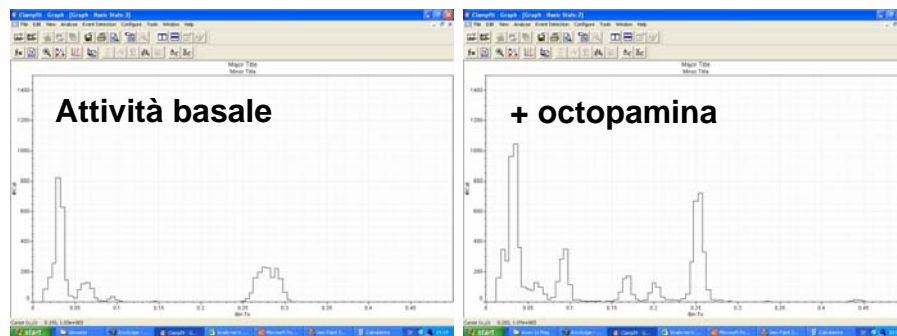
A**B****C**

Figura 10

Attività basale a lungo termine registrata dal nervo IV.

A, B) Diagrammi di distribuzione della ampiezze picco-a-picco dei potenziali d'azione.

C) Curve di distribuzione delle diverse classi di potenziali d'azione in funzione del tempo. Le frequenze sono state calcolate ad intervalli di 10 s su un periodo totale di 1000 s.

Nervo IV

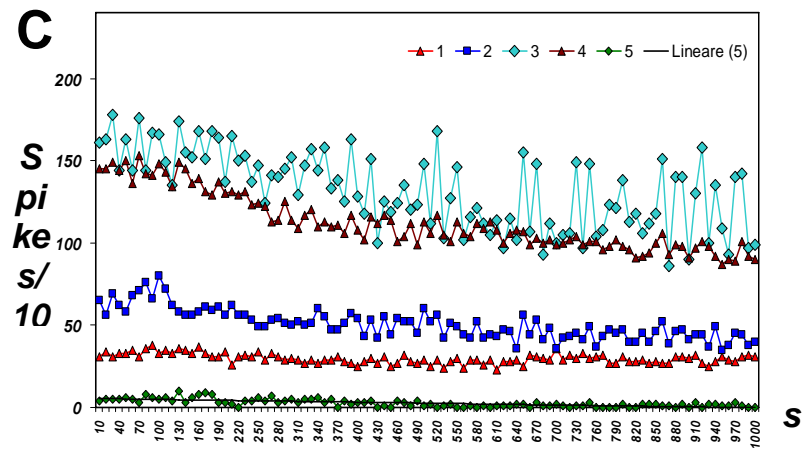
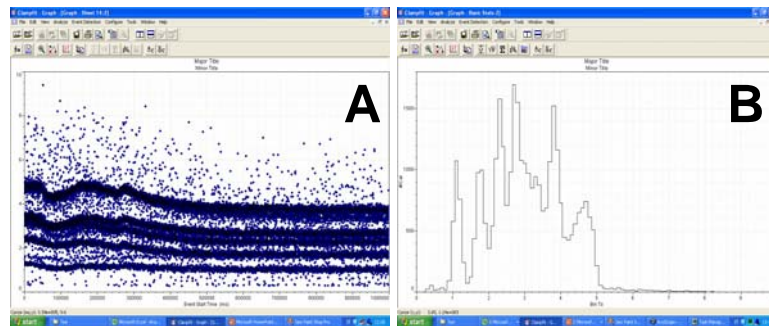


Figura 11

Attività basale a lungo termine registrata dal nervo V.

A, B) Diagrammi di distribuzione della ampiezze picco-a-picco dei potenziali d'azione.

C) Curve di distribuzione delle diverse classi di potenziali d'azione in funzione del tempo. Le frequenze sono state calcolate ad intervalli di 10 s su un periodo totale di 1000 s.

Nervo V

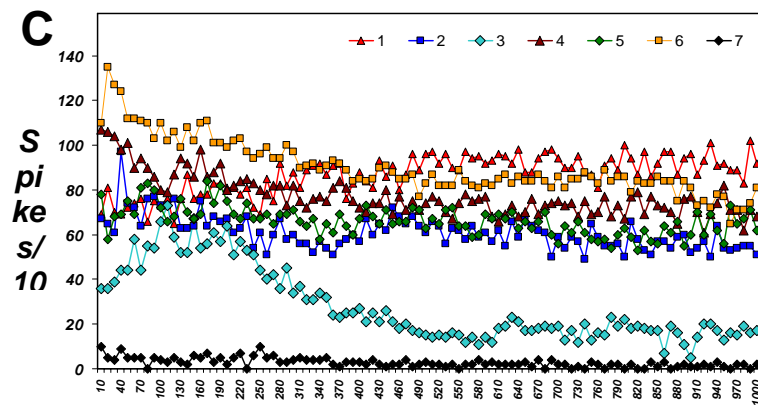
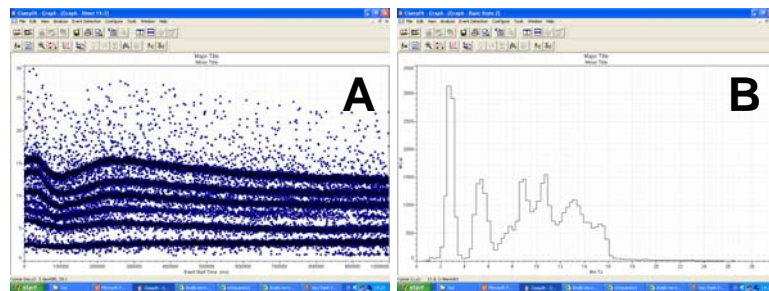


Figura 12

Attività basale a lungo termine registrata dal nervo VI.

A, B) Diagrammi di distribuzione della ampiezze picco-a-picco dei potenziali d'azione.

C) Curve di distribuzione delle diverse classi di potenziali d'azione in funzione del tempo. Le frequenze sono state calcolate ad intervalli di 10 s su un periodo totale di 1000 s.

Nervo VI

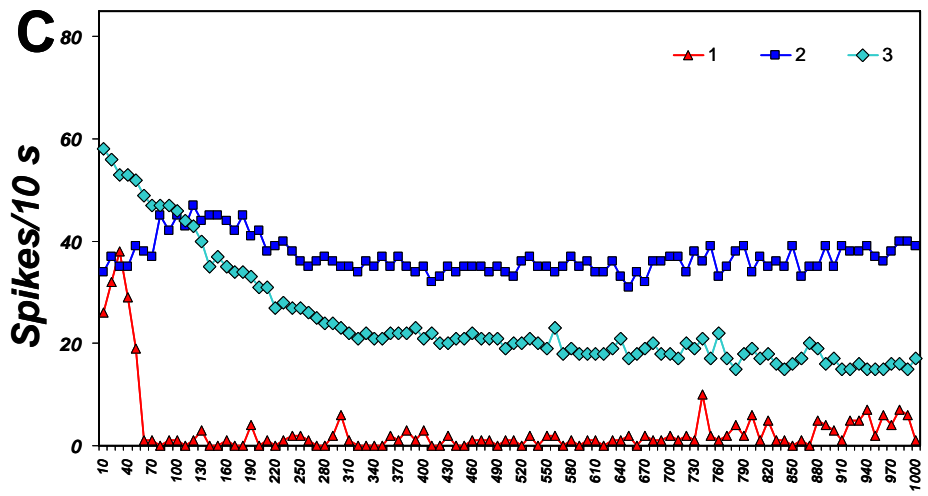
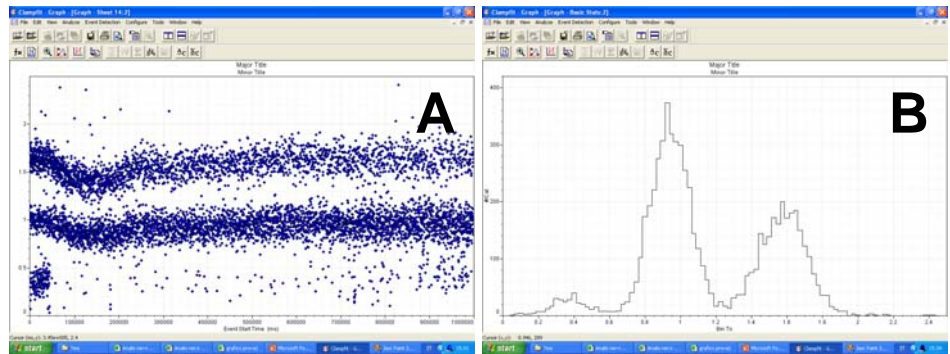


Figura 13

A, B) Esempi di scariche a spikes e attività dei diversi neuroni del nervo IV prima e dopo la somministrazione di octopamina.

C) Istogrammi dei valori medi \pm errore standard dei potenziali d'azione evocati dal nervo IV prima e dopo l'aggiunta di octopamina. L'asterisco indica una differenza statisticamente significativa ($p \leq 0,05$) ($n = 7$)

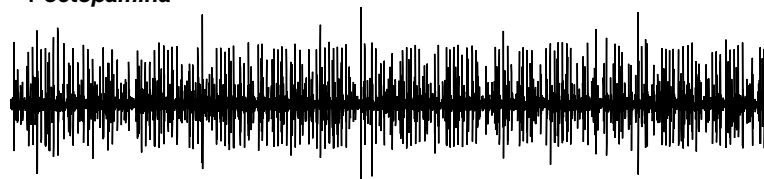
Nervo IV

A

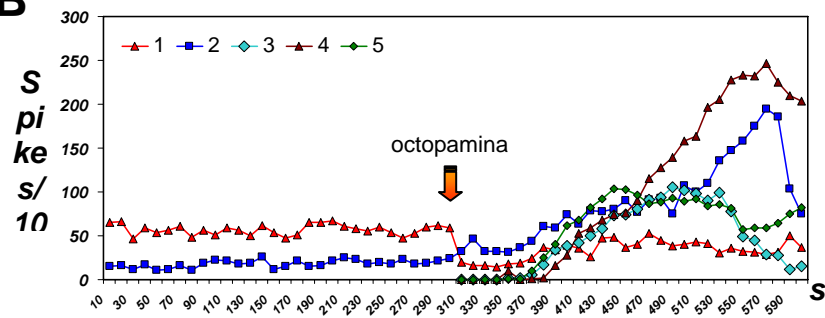
Attività basale



+ octopamina



B



C

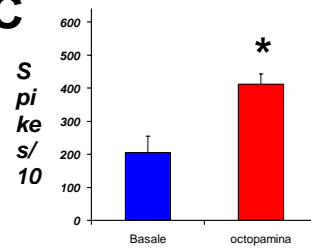


Figura 14

A, B) Esempi di scariche a spikes e attività dei diversi neuroni del nervo V prima e dopo la somministrazione di octopamina.

C) Istogrammi dei valori medi \pm errore standard dei potenziali d'azione evocati dal nervo V prima e dopo l'aggiunta di octopamina. L'asterisco indica una differenza statisticamente significativa ($p \leq 0,05$) ($n = 6$)

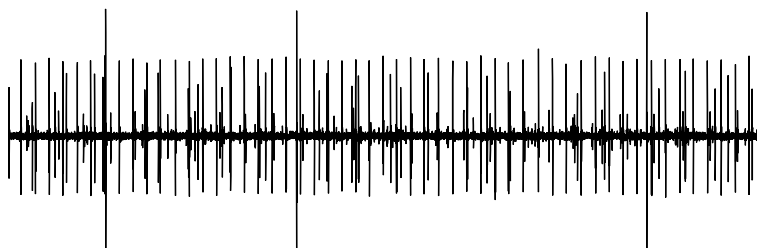
Nervo V

A

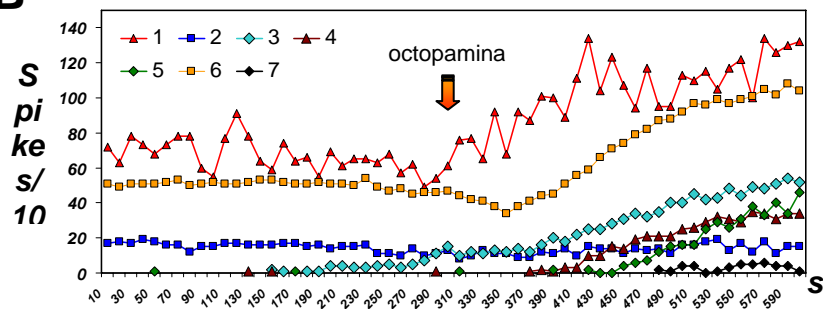
Attività basale



+ octopamina



B



C

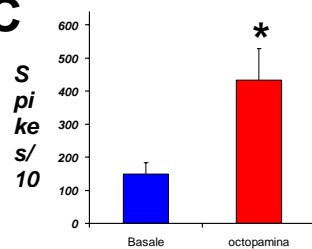


Figura 15

A, B) Esempi di scariche a spikes e attività dei diversi neuroni del nervo VI prima e dopo la somministrazione di octopamina.

C) Istogrammi dei valori medi \pm errore standard dei potenziali d'azione evocati dal nervo VI prima e dopo l'aggiunta di octopamina. L'asterisco indica una differenza statisticamente significativa ($p \leq 0,05$) ($n = 7$)

Nervo VI

A

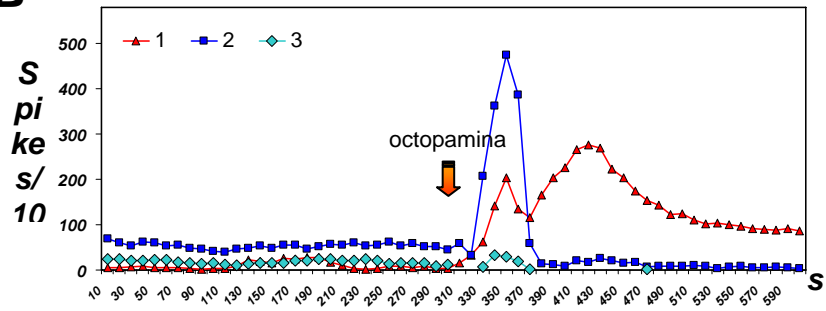
Attività basale



+ octopamina



B



C

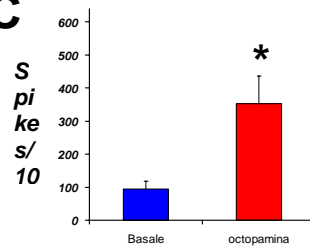


Figura 16

Esempi di scariche a spikes, attività dei diversi neuroni e differenti modalità di analisi (software Clampfit 8.0) delle registrazioni elettrofisiologiche “*in vivo*” dai nervi V e IV per la classificazione dei diversi tipi di spikes.

A, B) Diagrammi e istogrammi di distribuzione delle ampiezze picco-a-picco dei potenziali d'azione derivati dai nervi V in funzione del tempo

C, D) Diagrammi e istogrammi di distribuzione delle ampiezze picco-a-picco dei potenziali d'azione derivati dai nervi IV in funzione del tempo

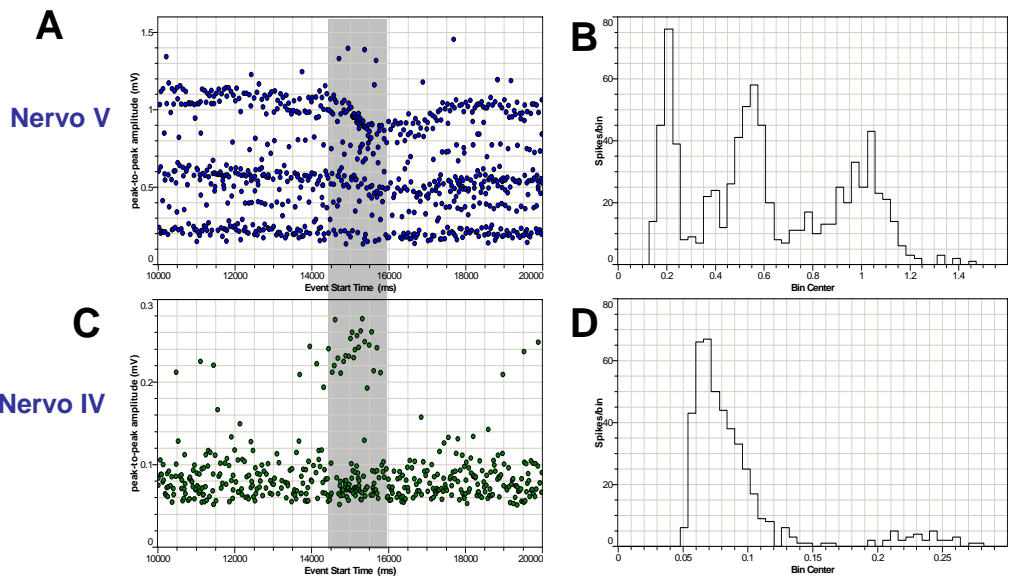
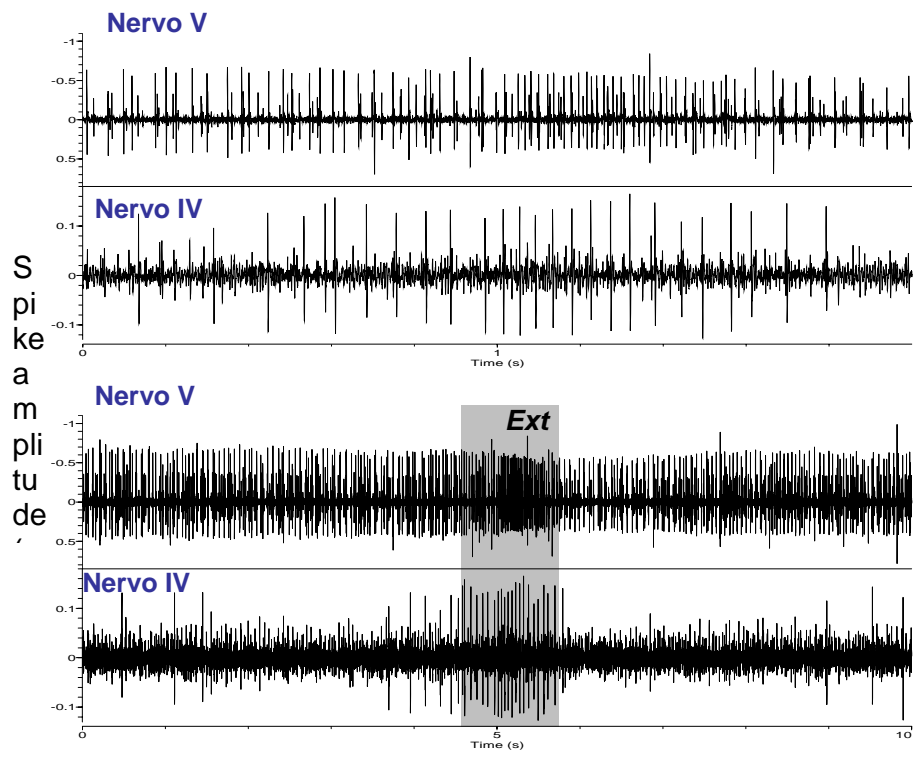


Figura 17

(A) Scariche a spikes/0.5s rappresentative delle singole cellule del nervo IV in funzione del tempo, comparate con i movimenti di estensione e retrazione dell'ovopositore in (B).

(C) Relazione tra l'attività a spike delle singole unità del nervo V e ampiezza dei movimenti addominali in funzione del tempo.

La barra grigia rappresenta il tempo di massima estensione dell'ovopositore.

r^2 = coefficiente di correlazione

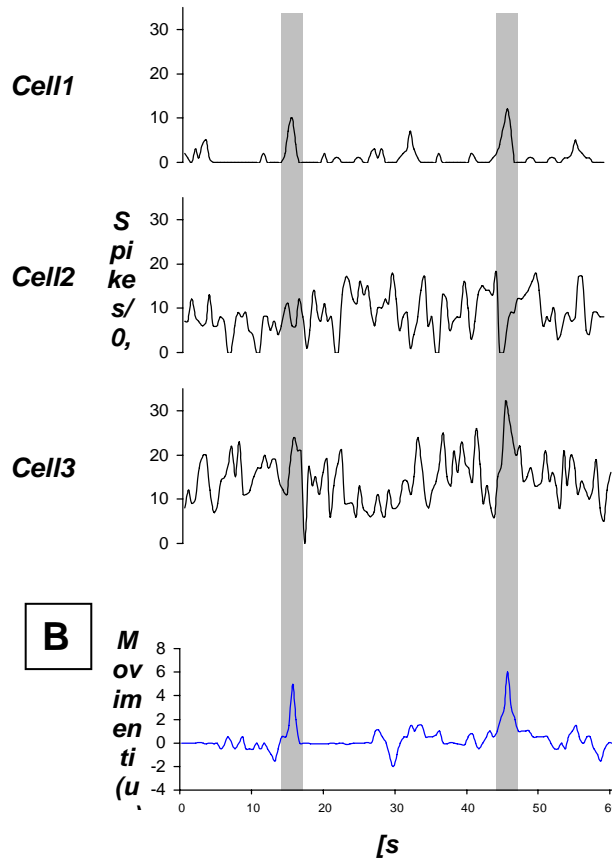
slope= pendenza

$n=118$

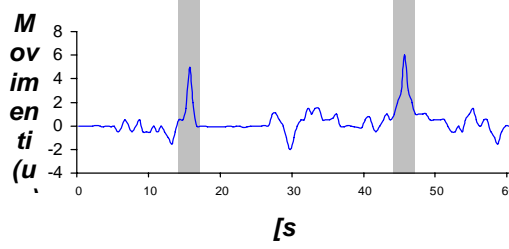
L'asterisco indica una differenza significativa ($p \leq 0.05$)

Nervo IV

A



B



C

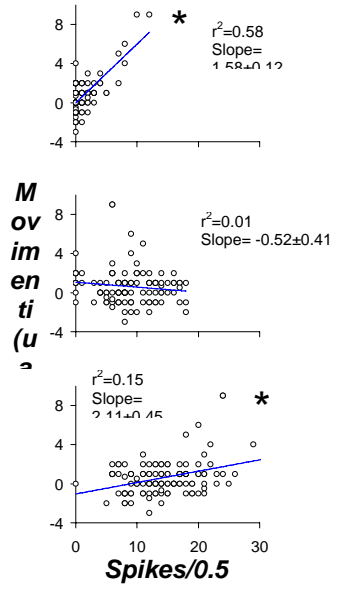


Figura 18

(A) Scariche a spikes/0.5s rappresentative delle singole cellule del nervo V in funzione del tempo, comparate con i movimenti di estensione e retrazione dell'ovopositore in (B).

(C) Relazione tra l'attività a spike delle singole unità del nervo V e ampiezza dei movimenti addominali in funzione del tempo.

La barra grigia rappresenta il tempo di massima estensione dell'ovopositore.

r^2 = coefficiente di correlazione

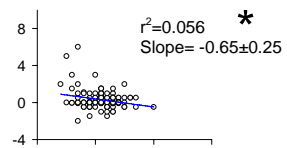
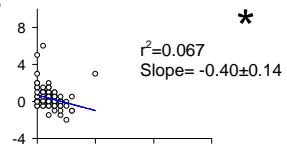
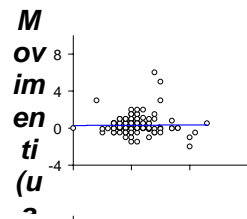
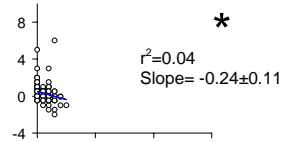
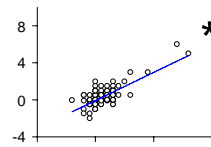
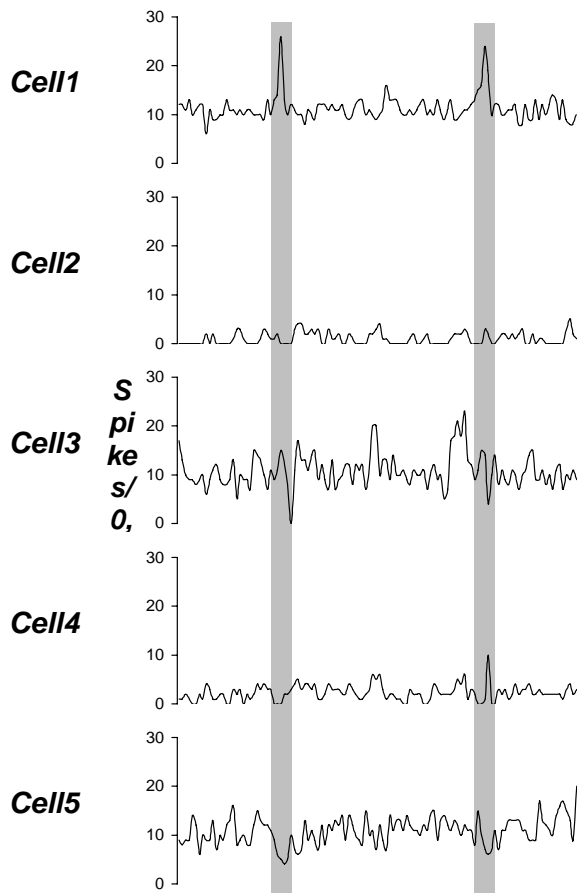
slope= pendenza

$n=118$

L'asterisco indica una differenza significativa ($p \leq 0.05$)

A

Nervo V



Spikes/0.5

B

