

GUIDO CAMPADELLI - MARIA LUISA DINDO*

Istituto di Entomologia «Guido Grandi» dell'Università di Bologna

Recenti progressi nello studio delle diete artificiali per l'allevamento di insetti entomofagi parassiti

(Ricerche eseguite col contributo del C.N.R.)

INDICE

1) GENERALITÀ	pag.	105
2) ALLEVAMENTO DI PARASSITOIDI IMENOTTERI	pag.	107
a) Parassiti di uova	pag.	107
b) Parassiti di pupe	pag.	109
c) Parassiti di larve	pag.	110
3) ALLEVAMENTO DI PARASSITOIDI DITTERI	pag.	112
4) POSSIBILITÀ DI ALLEVAMENTO CONTINUO DI PARASSITOIDI SU DIETA ARTIFICIALE	pag.	114
5) CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE	pag.	118
RIASSUNTO	pag.	119
SUMMARY	pag.	119
BIBLIOGRAFIA CITATA	pag.	119

1) GENERALITÀ

L'utilizzazione di diete artificiali per l'allevamento di insetti parassiti entomofagi comporta, almeno teoricamente, benefici di carattere scientifico ed economico. Essa, infatti, da un lato può consentire l'approfondimento di conoscenze relative alla biologia e alla fisiologia dei parassitoidi; dall'altro, in un futuro auspicabilmente non lontano, tale tecnica renderà forse possibile la produzione massale di entomofagi a costi contenuti, con evidenti vantaggi ai fini della lotta biologica e integrata.

Le possibilità di allevamento dei parassitoidi su dieta artificiale sono state oggetto di ampie revisioni bibliografiche, tra cui si segnalano in particolare quella di Mellini (1975a), e quella più recente di Thompson (1986), alle quali si

(*) * Borsista della Cassa di Risparmio di Verona, Vicenza e Belluno.

rimanda per un inquadramento generale dell'argomento. Comunque, la dieta impiegata deve non solo corrispondere ai fabbisogni nutrizionali del parassitoide in questione, ma deve anche possedere caratteristiche fisico-chimiche tali da garantirgli un ambiente idoneo per poter respirare, accrescersi, svilupparsi nelle migliori condizioni. Fattori quali la pressione osmotica e il pH possono essere pertanto determinanti. Inoltre, occorre tener presente che l'insetto parassita è in natura adattato a vivere a spese di un ospite vitale con il quale possono instaurarsi dei rapporti fisiologici più o meno complessi. Perciò, come è stato puntualizzato da alcuni Autori (ad es. Grenier et alii, 1986), una conoscenza il più possibile approfondita riguardo ai rapporti ospite — parassita, volta in particolare ad accertare le esigenze fisiologiche dell'entomofago, può essere di importanza notevole ai fini del successo e del miglioramento delle tecniche di allevamento su dieta artificiale.

Come è noto, quasi tutti gli insetti parassiti entomofagi uccidono l'ospite, comportandosi dunque, almeno per una parte della loro vita larvale, da zoosaprofagi e zoonecrofagi. La morte della vittima avviene in tempi più o meno brevi, a seconda della specie di appartenenza dei due simbiotici e a seconda dello stadio attaccato. In particolare, essa è in genere piuttosto rapida per i parassiti di uova e per quelli di pupe, mentre è più dilazionata per i parassiti larvali e larva-pupali, i quali, più che i primi, instaurano con la vittima — finché essa è vitale — relazioni fisiologiche complesse e contraddistinte da opposte influenze, esercitate dall'ospite sul parassitoide da un lato (Mellini 1975b; 1983) e dal parassitoide sull'ospite dall'altro (Vinson e Iwantsch, 1980; Thompson, 1983a; Dindo, 1987). Più precisamente, come è stato enfatizzato da Mellini (1983), nel caso dei parassitoidi Ditteri prevalgono gli effetti indotti dall'ospite sull'entomofago, specie a livello ormonale; viceversa nel caso degli Imenotteri, le cui femmine sono spesso in grado di iniettare secreti nell'ospite al momento dell'ovideposizione, il buon esito della simbiosi sembra piuttosto condizionato, o quanto meno influenzato, soprattutto dalle alterazioni indotte dal parassitoide nella vittima, in particolare a livello della fisiologia. Determinanti appaiono in tal senso non solo i secreti delle ghiandole del veleno, ma anche, per quanto riguarda diverse specie di Icneumonoidei, le particelle virali ritrovate nei fluidi del calice, recentemente definite «polydnavirus» (Stoltz et alii, 1984). Tali particelle sono infatti spesso responsabili di notevoli variazioni a livello della fisiologia dell'accrescimento e dello sviluppo dell'ospite, incluse quelle che appaiono in qualche modo vantaggiose per il parassitoide.

Riguardo all'allevamento di un entomofago su dieta artificiale, esso, in linea di massima, potrà risultare tanto più difficoltoso quanto più complessi sono i rapporti con l'ospite vitale. Se il parassita è larvale o larva-pupale, dunque in natura adattato ad accrescersi a spese di stadi soggetti ad intensi cambiamenti, potranno inoltre rendersi necessarie condizioni fisiologiche non uniformi anche durante il suo sviluppo *in vitro*.

Occorre peraltro precisare che — come sottolineato da Mellini (1975a) — su substrato inerte, dunque in assenza dei condizionamenti legati ai rapporti con

l'ospite, e soprattutto in assenza di eventuali reazioni di difesa da parte dell'ospite medesimo, si potrà in futuro addirittura arrivare ad ottenere un acceleramento dei cicli biologici dei parassitoidi, a tutto vantaggio della loro produzione massale.

Per quel che concerne più specificatamente le esigenze nutrizionali dei parassitoidi, senza addentrarsi nel merito (si rimanda per questo, oltre alle già citate revisioni bibliografiche, al lavoro di House, 1958) ci si limita qui a ricordare che esse sono del tutto paragonabili a quelle degli altri insetti. Tale omogeneità costituisce un elemento incoraggiante: i dati relativi ad alcune specie, infatti, possono servire da base per la messa a punto di un mezzo alimentare adatto ad altre specie, anche molto diverse dal punto di vista sistematico e comportamentale.

Naturalmente, la dieta artificiale ideale deve consentire non solo il completamento del ciclo biologico dei parassiti fino allo sfarfallamento degli adulti, ma deve anche garantire che questi risultino vitali e fecondi, conservando intatta la capacità di reperire e parassitizzare le vittime in natura.

Infine, ai fini applicativi e soprattutto in previsione dell'utilizzazione dei parassitoidi in lotta biologica e integrata, sarebbe determinante arrivare a metter a punto efficaci diete di tipo oligidico, realizzate cioè applicando in prevalenza prodotti naturali grezzi e di costo possibilmente non elevato, affinché tali tecniche di allevamento risultino economicamente convenienti.

Alla luce di queste considerazioni e a complemento del lavoro di Mellini (1975a), ci siamo qui proposti di esaminare i risultati conseguiti in questo campo nel corso dell'ultima decina d'anni, alla ricerca di notizie utili ai fini dell'applicazione e del miglioramento delle tecniche di allevamento *in vitro*.

2) ALLEVAMENTO DI PARASSITOIDI IMENOTTERI

a) Parassiti di uova

Fino a una decina d'anni fa, l'unico risultato di rilievo ottenuto nel campo dell'allevamento *in vitro* di forme oofaghe, era stato lo sviluppo completo, da uovo ad adulto, di *Trichogramma pretiosum* Ril. (Trichogrammatidae) (Hoffman et alii, 1975). Tale allevamento era stato effettuato su carta da filtro imbevuta di emolinfa di larve di *Heliothis zea* (Bod.) (Lep. Noctuidae). Benché i tempi di sviluppo fossero stati più lunghi, le percentuali di impupamento e di sfarfallamento degli adulti furono del tutto simili a quanto riscontrato nelle uova dell'ospite *Trichoplusia ni* (Hb.) (Lep. Noctuidae). I medesimi Autori hanno anche ottenuto lo sviluppo completo di *T. pretiosum*, a partire dall'ovideposizione, in uova artificiali contenenti emolinfa. Più recentemente, per merito di ricercatori cinesi, il completo sviluppo *in vitro* di questo ed altri oofagi è stato ottenuto anche su mezzi nutritizi privi di qualsiasi componente appartenente all'ospite, con risultati incoraggianti, benché non ancora tali da consentire una produzione

massale di tali entomofagi. Ad esempio, Liu e Wu (1982) hanno allevato con un certo successo su substrato artificiale tre specie appartenenti al genere *Trichogramma* (*T. dendrolimi* Mats., *T. pretiosum* e *T. confusum* Viggiani). La dieta impiegata era costituita per il 60% da una miscela (di per sé già in grado di stimolare l'ovideposizione da parte delle femmine del parassitoide) composta da idrolisato di lievito, siero di embrione di vitello e soluzione di Grace; il rimanente 40% era formato da embrione di pulcino, tuorlo d'uovo e latte bovino. Le percentuali di impupamento e di sfarfallamento degli adulti, che manifestavano uno sviluppo alare anormale, sono state rispettivamente del 17-36% e dell'1-2%. *T. dendrolimi* è stato inoltre allevato, da uovo ad adulto, anche da Guan et alii (1978) e da Wu et alii (1982). In ambo i casi sono state impiegate diete semisintetiche somministrate col metodo della goccia sospesa, a base la prima di tuorlo e albume d'uovo, idrolisato di caseina e acidi nucleici, e la seconda di tuorlo d'uovo, embrione di pulcino, latte bovino, peptoni e una miscela di aminoacidi. Sia nel primo che nel secondo substrato trofico i tempi di sviluppo sono stati del tutto paragonabili a quelli riscontrati nelle uova dell'ospite *Antheraea pernyi* Guér (Lep. Saturniidae). Più in particolare, Wu et alii (1982) hanno dimostrato che tuorlo d'uovo e aminoacidi sono componenti essenziali del mezzo nutritizio da essi impiegato, dal momento che, in mancanza dell'uno o dell'altro, non è stato possibile ottenere uno sviluppo completo del parassitoide. Viceversa, in presenza di ambedue i costituenti, le percentuali di impupamento e di sfarfallamento sono state pari rispettivamente al 53% e al 7-16%.

Risultati più soddisfacenti, con tassi di impupamento e di sfarfallamento prossimi a quelli rilevati nelle uova dell'ospite, sono stati ottenuti con mezzi nutritizi nella cui composizione entrava a far parte anche emolinfa della vittima. Così Ding et alii (1980) hanno allevato *Tetrastichus schoenobii* Ferr. (Tetrastichidae) su dieta contenente, insieme ad emolinfa di *Attacus cynthia* (Dru.) (Lep. Saturniidae), vari componenti tra cui tuorlo d'uovo e latte bovino, conseguendo percentuali di sfarfallamento del parassitoide pari a circa l'80%. Gli adulti, inoltre, non presentavano malformazioni evidenti e si sono dimostrati normalmente fecondi. Risultati simili sono stati ottenuti da Strand e Vinson (1985) riguardo a *T. pretiosum*, allevato su substrato contenente quantità definite di proteine, carboidrati, lipidi, sali, vitamine e circa il 40% di emolinfa di *Heliothis virescens* (F.) (Lep. Noctuidae). Mantenendo invariata la composizione della dieta, ma diminuendo il quantitativo di emolinfa, è stato registrato un progressivo calo nelle percentuali di impupamento e di sfarfallamento, le quali sono scese a zero nella dieta contenente solo il 10% di emolinfa.

Tentativi di allevamento mediante procedure e contenitori adatti alla produzione massale sono stati effettuati, per *T. pretiosum*, da Xie e alii (1986a), utilizzando una dieta oligidica a base di emolinfa, tuorlo d'uovo e latte bovino. Benché le percentuali di sfarfallamento ottenute siano state nel complesso piuttosto basse, e benché gran parte degli adulti presentassero malformazioni evidenti, i risultati conseguiti lasciano ugualmente ben sperare che, in futuro, si possa

arrivare a produrre massalmente gli oofagi in maniera conveniente anche ai fini applicativi. Tra l'altro, gli Autori hanno riscontrato che parecchie sostanze ad azione antibiotica non sono tossiche nei confronti di *T. pretiosum*, se impiegate ad una concentrazione non superiore allo 0,5%.

Successivamente, Xie et alii (1986b) hanno saggiato l'efficacia di diete di composizione di base analoga a quella su citata, ma addizionate l'una (BD) di sola emolinfa dell'ospite *Manduca sexta* (L.) (Lep. Sphingidae), e l'altra (BDE), oltre che di emolinfa, anche di un liquido ottenuto dalle uova della vittima. Mentre nel primo caso le percentuali di sfarfallamento si sono mantenute piuttosto basse (6-7% al massimo), nel secondo hanno toccato punte superiori al 60%. Le uova del parassitoide erano state ottenute facendo ovideporre le femmine o a) in uova dell'ospite, o b) in uova artificiali contenenti l'uno o l'altro dei due substrati su menzionati, o una soluzione di cloruro di potassio e solfato di magnesio, stimolante l'ovideposizione (Nettles et alii, 1982). Le uova venivano poi trasferite e allevate secondo le procedure già indicate da Xie et alii (1986a) in uno dei due mezzi nutritizi indicati. È stato così provato che, pure nella dieta più efficace (BDE), le percentuali di adulti subivano un certo calo (da circa il 60% al 49%) se l'allevamento era stato effettuato a partire da uova deposte in uova artificiali contenenti la soluzione salina.

Infine, vanno menzionati i risultati soddisfacenti ottenuti in campo applicativo da alcuni Autori. Lanci di *Trichogramma* sp. (Gao et alii, 1982) *Trichogramma confusum* (Liu et alii, 1985), *Anastatus* sp. (Eupelmidae) (Liu et alii, 1986) allevati su uova artificiali, si sono rivelati, nel contenimento di popolazioni di Lepidotteri, altrettanto efficaci di quelli di parassitoidi conspecifici prodotti su ospiti vitali. Le percentuali di parassitizzazione in tutti e tre i casi hanno toccato punte fino al 90%, a dimostrazione della potenziale validità delle tecniche di allevamento *in vitro* per la produzione massale di entomofagi da distribuire in campo per interventi di lotta biologica.

b) Parassiti di pupe

In comune con gli oofagi, i parassiti di pupe presentano la caratteristica di accrescersi a spese di uno stadio dell'ospite che mantiene inalterata la propria massa, pur con notevoli variazioni nella natura della struttura interna.

Inoltre, così come gli oofagi, i parassiti di pupe determinano in genere la morte della vittima in tempi piuttosto brevi, comportandosi dunque, per la maggior parte del loro sviluppo, da zoosaprofagi e zoonecrofagi. Pertanto, i rapporti fisiologici intercorrenti con l'ospite non sono, in linea di massima, così specializzati come nei parassiti larvali e larva-pupali, tanto che, come è noto, in alcuni casi, lo sviluppo postembrionale dell'entomofago può verificarsi, sia pure a livelli ridotti e in tempi più lunghi, anche quando la parassitizzazione avviene a spese di pupe già morte. Questo è quanto è stato osservato, ad esempio, per *Brachymeria intermedia* Nees (Chalcididae) (Dindo, 1987).

Specie evolventesi a spese di pupe figurano tra i primi parassiti Imenotteri allevati fino allo stadio adulto *in vitro*: su dieta oligidica *Pimpla turionellae* (L.) (Ichneumonidae) (Bronskill e House, 1957) e *Pteromalus puparum* (L.) (Pteromalidae) (Hoffman e Ignoffo, 1974), e su dieta meridica *Itopectis conquisitor* (Say) (Ichneumonidae) (Yazgan, 1972; House, 1978).

In seguito, anche grazie a studi approfonditi finalizzati all'ampliamento delle conoscenze relative alle esigenze nutrizionali e fisiologiche dei parassitoidi, sono stati conseguiti altri incoraggianti risultati.

Thompson (1980) ha ottenuto lo sviluppo larvale di *B. intermedia* su dieta chimicamente definita, ma la maggior parte degli individui non ha superato lo stadio di prepupa e nessuno è andato oltre lo stadio di pupa. Un esito in un primo tempo solo parzialmente soddisfacente hanno avuto anche i tentativi relativi a *Brachymeria lasus* (Wlk.) e *Pachycrepoideus vindimiae* Rond. (Pteromalidae), entrambi allevati *in vitro* su dieta olidica fino allo stadio di larva matura da Thompson, 1981a; nel medesimo studio, l'Autore ha accertato l'importanza determinante degli steroli, e in particolare del colesterolo, ai fini dell'accrescimento larvale delle suddette specie.

Successivamente, è stato ottenuto il completo sviluppo *in vitro* tanto di *B. lasus* (Thompson, 1981b) che di *P. vindimiae* (Thompson et alii, 1983). *B. lasus* è stato allevato su dieta contenente albumina (15%), aminoacidi liberi (1%), glucosio (4%), lipidi (2,5%), sali minerali (0,3%), vitamine del gruppo B (0,01%) e fattori lipogenetici (0,2%). La percentuale di sfarfallamento è stata pari all'80% e gli adulti si sono rivelati fecondi nonché in grado di attaccare prontamente pupe di *Trichoplusia ni* loro esposte. I tempi di sviluppo, in questa dieta, sono stati però circa due volte più lunghi che nell'ospite vitale. Successivamente lo stesso Thompson (1983b), in diete analoghe ma contenenti l'1 o il 2 o il 4% di aminoacidi e il 2% di glucosio, ha ottenuto il completo sviluppo di *B. lasus*, con ritmi di accrescimento larvale simili a quelli osservati nell'ospite vitale, migliorando così i risultati già conseguiti.

Tra i fattori maggiormente in grado di condizionare il successo dell'allevamento su dieta artificiale di questo e altri parassiti entomofagi figura la pressione osmotica, pari, nel mezzo nutritizio su menzionato, a circa 600 mOs/kg. Questo valore, ottimale per *B. lasus*, si è invece rivelato eccessivo per *P. vindimiae*. Tale specie è stata allevata con successo fino allo stadio adulto, e in tempi paragonabili a quelli rilevati *in vivo*, su dieta di composizione simile a quella impiegata per *B. lasus*, ma con pressione osmotica notevolmente più bassa (circa 400 mOs/kg) (Thompson et alii, 1983); si è potuto ottenere l'abbassamento da 600 a 400 mOs/kg sostituendo il glucosio con trealosio e impiegando una miscela di poliaminoacidi anziché di aminoacidi liberi. Va comunque sottolineato che vi sono anche parassitoidi, come *Itopectis conquisitor* (Yazgan, 1972), in grado di tollerare *in vitro* pressioni osmotiche molto elevate (ca. 2000 mOs/kg).

Infine Yazgan (1981) ha ottenuto il completo sviluppo, da larvetta neo-sguisciata ad adulto, di *Pimpla turionellae* su dieta meridica, conseguendo una per-

centuale di sfarfallamento del 70%. L'Autore, ha inoltre dimostrato che il livello dei sali minerali può essere determinante ai fini del successo dell'allevamento di questa specie. Infatti, se tale livello supera, nella dieta, lo 0,55%, aumenta considerevolmente, nell'ambito degli adulti sfarfallati, quelli che presentano qualche anomalia.

c) Parassiti di larve

I risultati maggiormente di rilievo finora conseguiti sono quelli relativi a *Exeristes roborator* (Fab.) (Ichneumonidae), ectoparassitoide di larve di Lepidotteri. Il completo sviluppo, da uovo ad adulto, fu ottenuto da Thompson (1975), su dieta chimicamente definita contenente proteine (6%), carboidrati (2%), lipidi (0,25%), vitamine (0,25%), sali minerali (0,25%). L'Autore puntualizzò, tra l'altro, che, per questa specie, è essenziale, ai fini della sopravvivenza delle larve, la costante disponibilità di ossigeno atmosferico (fenomeno facilmente comprensibile, trattandosi di un ectoparassitoide); il substrato nutritizio, dunque, deve in ogni caso essere in forma semi-solida, al fine di evitare una rapida morte per soffocamento delle larvette, evidentemente non adattate a respirare in un mezzo liquido.

Proseguendo gli studi, allo scopo di meglio evidenziare le reali esigenze nutrizionali di *Exeristes roborator*, Thompson (1976a) ha poi dimostrato l'assoluta necessità, per il parassitoide, di 10 aminoacidi essenziali: arginina, istidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina. Lo sviluppo dell'entomofago non è mai proceduto oltre il 3° stadio larvale su diete carenti di questi componenti. Grazie a successive ricerche, sempre per *E. roborator*, lo stesso Thompson (1976b) ha inoltre messo in luce che, in presenza di glucosio (2%) e trioleina (0,2%), la mortalità larvale non è influenzata dal quantitativo di aminoacidi nella dieta; infatti, aumentandone il livello da 1% a 6%, le percentuali di sopravvivenza e di sfarfallamento di *Exeristes* sono state in tutti i casi simili a quelle relative agli individui allevati sull'ospite *Pectinophora gossypiella* (Sanders) (Lep. Gelechiidae). I medesimi parametri non hanno subito sensibili variazioni quando i parassitoidi sono stati allevati su substrati contenenti il 6% di aminoacidi e privi tanto di glucosio che di trioleina. Viceversa, su diete contenenti minori percentuali di aminoacidi, il glucosio si è dimostrato necessario per garantire elevati tassi di sopravvivenza e di sviluppo; in assenza di glucosio e con un livello di aminoacidi solo di 1%, tutti gli individui sono infatti morti, come larve di 1° o 2° stadio, nel giro di 48 ore. Tuttavia il glucosio — la cui importanza per il buon esito dell'allevamento di *E. roborator* è emersa anche da studi successivi (Thompson, 1979; 1982) — non può essere considerato un succedaneo degli aminoacidi, in quanto, con la diminuzione di questi ultimi, i tempi di sviluppo si sono in ogni caso sensibilmente allungati. L'omissione di trioleina, invece, non ha avuto significativi effetti né sulla sopravvivenza, né sullo sviluppo del parassitoide.

Thompson (1977) ha inoltre messo in luce che gran parte degli acidi grassi liberi sono altamente tossici per le larvette di *E. roborator*; non così i triglicerici-

di, i quali, però, nemmeno hanno mostrato di apportare evidenti benefici all'entomofago.

Per quel che riguarda i parassitoidi endolarvali, nessuno dei tentativi fino ad oggi compiuti ha avuto successo, nel senso che mai ne è stato ottenuto lo sviluppo *in vitro* fino al raggiungimento di stadi avanzati. Come evidenziato da Thompson (1986), questo è probabilmente dovuto al fatto che tali entomofagi sono quelli che maggiormente interagiscono con l'ospite, influenzandone la fisiologia ed essendone, nel contempo, influenzati, soprattutto a livello ormonale, e soprattutto nel caso di specie a sviluppo discontinuo⁽²⁾ (cfr. Mellini, 1975b; 1983). Trattandosi di parassitoidi Imenotteri, possono prevalere gli effetti indotti dall'entomofago nell'ospite, a causa del diretto intervento della femmina ovideponente; le interazioni con la vittima, comunque, sono in genere altamente complesse, spiegando in parte la difficoltà di ottenere, in ambiente artificiale, idonee condizioni di sviluppo per il parassitoide. I risultati più salienti finora conseguiti riguardano due endoparassitoidi solitari, *Cotesia marginiventris* (Cress.) e *Microplitis croceipes* (Cres.) (Braconidae) (Greany, 1986). Ambedue le specie sono state allevate, su dieta del tutto priva di elementi appartenenti all'ospite, dallo stadio di uovo, subito dopo la formazione della stria germinativa, fino al completamento della 1^a età larvale. Nessuna larva, comunque, ha potuto mutare alla 2^a età. Un componente essenziale ai fini sia della schiusa delle uova che dell'accrescimento delle larvette (in ogni caso assai più lento di quanto normalmente si verifica nelle larve dei Lepidotteri ospiti) è risultato essere il siero di feto bovino.

3) ALLEVAMENTO DI PARASSITOIDI DITTERI

I primi fortunati tentativi di allevamento *in vitro*, fino allo stadio adulto, di parassitoidi Ditteri, riguardano entomofagi appartenenti alla famiglia dei Sarcofagidi (cfr. Mellini, 1975a), nel cui ambito, come è noto, sono comprese anche moltissime specie a regime dietetico zoosaprofago e zoonecrofago. Nel caso di forme parassite, la vittima viene di solito attaccata in stadi avanzati e rapidamente uccisa, di modo che lo sviluppo delle larvette avviene per la maggior parte a spese di un ospite morto. Trattasi di un parassitismo assai poco sofisticato in cui i rapporti tra i due simbiotici sono, in linea di massima, ancora meno complessi che nei sistemi ad antagonista imenottero oofago o pupifago.

Viceversa, per quel che riguarda i Tachinidi, che pure sono affini ai Sarcofagidi, le relazioni ospite-parassita sono assai più complicate. Determinanti possono essere, in questo caso, soprattutto gli effetti indotti dall'ospite sul parassitoide, particolarmente nelle specie a sviluppo discontinuo, strettamente dipen-

⁽²⁾ Per parassitoidi a sviluppo discontinuo si intendono quelli che subiscono una diapausa in dipendenza dello stato fisiologico dell'ospite.

denti dal bilancio ormonale dell'ospite. Tali specie sono quelle per cui l'allevamento *in vitro* si prospetta più difficoltoso.

Ad esempio, nel caso di *Pseudogonia rufifrons* Wied. (= *Gonia cinerascens* Rond.), le larve di 1^a età mutano in 2^a età solamente quando vengono attivate dagli ecdisteroidi dell'ospite. Fino a poco tempo fa si pensava che questo si verificasse esclusivamente in concomitanza col passaggio della vittima allo stadio di pupa, dunque in assenza di ormone giovanile (Baronio e Senhal, 1980); assai di recente, Fanti et alii (in corso di stampa) hanno invece dimostrato che, in caso di parassitizzazione precoce, alcune larvette parassite sono stimolate a mutare in 2^a età già durante una muta tra due successive età larvali dell'ospite. Un tentativo di allevamento *in vitro* di *P. rufifrons* è stato compiuto da Baronio e Senhal (1980), i quali hanno utilizzato allo scopo un substrato a base di omogeneizzato di pupe dell'ospite (il lepidottero galleriide *Galleria mellonella* L.), ma non sono riusciti ad ottenere la muta dalla 1^a alla 2^a età larvale nemmeno con l'aggiunta di 20-idrossiecdisone; viceversa, alcune larve di 2^a e 3^a età hanno raggiunto, sul medesimo substrato non addizionato con ormoni, lo stadio adulto, fornendo così un'ulteriore conferma al fatto che lo sviuppo di individui in età successive alla 1^a non dipende direttamente dagli ormoni dell'ospite.

In generale, la biologia e la fisiologia dei Tachinidi, nonché la natura dei loro rapporti con l'ospite, sono meno studiate, e quindi meno conosciute, rispetto agli Imenotteri. Per tale motivo, e per il fatto che i tentativi di allevamento *in vitro* di questi entomofagi sono finora stati piuttosto scarsi (oltre che per le obiettive difficoltà), il completo sviluppo su dieta artificiale è stato per adesso conseguito solo per un numero limitatissimo di specie.

Phryxe caudata Rond. è il primo tachinide allevato con qualche successo *in vitro*. Ne è stata infatti ottenuta la sopravvivenza, allo stadio di larva di 1^a età, fino ad un massimo di 100 giorni, su dieta olidica di composizione di base desunta dall'analisi dell'emolinfa dell'ospite *Galleria mellonella* (Grenier et alii, 1974); lo sviluppo fino alla 3^a età iniziale è stato invece conseguito su substrato di composizione basata sull'analisi protidica di larve del parassita stesso (Grenier et alii, 1975). Secondo Bonnot et alii (1976), il motivo del mancato accrescimento della larvetta oltre il 3^o stadio iniziale sarebbe da ricercarsi nell'insufficiente livello di proteine nella dieta; d'altro canto, elevando il quantitativo di aminoacidi liberi si provocherebbe nel contempo un innalzamento di pressione osmotica fatale per le larvette. Il problema, secondo gli Autori, sarebbe superabile integrando la dieta con proteine e polipeptidi, meno incidenti sulla pressione osmotica, tenendo però presente che il bilanciamento tra i vari aminoacidi deve essere comunque rispettato.

Sempre riguardo a *P. caudata*, Grenier (1977) ha poi constatato che la nipagina, già a dosi dello 0,01%, è tossica nei confronti delle larvette, per cui — indipendentemente dal tipo di substrato utilizzato — il suo uso come fungistatico va evitato.

Il ciclo completo di un tachinide, su substrato artificiale, è stato per la prima volta ottenuto da Grenier et alii (1978) per *Lixophaga diatraeae* (Townsend.),

pur con bassissime percentuali di sfarfallamento. La dieta impiegata era a base di acidi organici, sali minerali, vitamine, aminoacidi, altre componenti proteiche (tra cui caseina e lattalbumina) e fattori lipogenetici. Tale dieta, inoltre, era in forma non liquida, come quelle precedentemente utilizzate per *P. caudata* (cfr. Grenier et alii, 1974; 1975), ma di gel, più consona alle esigenze respiratorie delle larvette.

Risultati incoraggianti sono stati inoltre ottenuti da Nettles et alii (1980) per *Eucelatoria bryani* Sab., allevata con successo fino allo stadio adulto su dieta di composizione analoga a quella su indicata per *L. diatraeae*, ma integrata con basi puriniche e pirimidiniche, trealosio, trioleina, idrolisato di lievito. Pure in questo caso, comunque, le percentuali di sfarfallamento sono state piuttosto basse, con punte massime di 13% quando l'allevamento veniva effettuato a partire da larvette estratte dall'ospite 18-24 h dopo la parassitizzazione (dunque ancora in 1^a età secondo Ziser et alii, 1978). Un punto cruciale ai fini del buon esito dell'allevamento *in vitro* era rappresentato dalle esigenze respiratorie delle larve, le quali, nell'ospite naturale, nel corso della 1^a età sono ematofaghe e respirano attraverso il tegumento, mentre durante la 2^a e 3^a età passano a nutrirsi anche a spese di altri tessuti — in particolare quello adiposo — e ricevono ossigeno dalle trachee dell'ospite mediante un imbuto respiratorio. Su substrato artificiale, l'ostacolo è stato aggirato ponendo per 24 ore la sola dieta (contenente l'1,5% di agar) a umidità relativa del 50%, per spostarla poi a umidità relativa del 90% una volta introdotte le larvette del parassita. Si è in questo modo venuto a formare, sulla superficie del mezzo nutritizio, un film liquido, ideale per l'accrescimento delle larvette di 1^a età. Grazie al successivo, graduale assorbimento del liquido di superficie da parte del substrato, le larve in 2^a e 3^a età si sono poi potute venire a trovare a diretto contatto con l'ossigeno atmosferico.

In seguito, Nettles (1986) ha migliorato i risultati già conseguiti, aggiungendo la dieta di diverse componenti proteiche. In particolare, tra i vari substrati saggiati, il più efficace si è rivelato quello contenente, oltre ad una miscela di aminoacidi, farina di soia. Le percentuali di sfarfallamento ottenute (partendo da larvette estratte dall'ospite 20-28 h dopo la parassitizzazione) sono state pari a circa il 39% (dunque 3 volte superiori a quelle conseguite sul mezzo nutritizio in precedenza utilizzato da Nettles et alii, 1980). L'Autore sottolinea inoltre che l'integrazione con farina di soia consente una riduzione del costo totale della dieta, ed è dunque vantaggiosa anche dal punto di vista economico.

Infine, sempre secondo Nettles (1986), il pH ottimale della dieta per *Eucelatoria bryani* è compreso tra 5,5 e 8,00.

Nella tabella I è presentato un quadro riassuntivo delle specie di parassitoidi finora allevate fino allo stadio adulto su dieta artificiale. Purtroppo, solo in rari casi i vari Autori hanno saggiato se gli individui ottenuti erano o non erano

TABELLA I - Parassitoidi di Lepidotteri allevati *in vitro* fino allo stadio adulto.
Parasitoids of Lepidoptera reared to adults on artificial media.

Specie	Famiglia	Dieta	Autori
IMENOTTERI			
oofagi			
<i>Trichogramma pretiosum</i> Ril.	Trichogrammatidae	olidica	Hoffman et alii, 1975 Liu e Wu, 1982 Strand e Vinson, 1985 Xie et alii, 1986a
<i>Trichogramma dendrolimi</i> Mat.	»	»	Guan et alii, 1978 Liu e Wu, 1982 Wu et alii, 1982
<i>Trichogramma confusum</i> Vigg.	»	»	Liu e Wu, 1982
<i>Tetrastichus schoenobii</i> Ferr.	Tetrastichidae	»	Ding et alii, 1980
pupifagi			
<i>Pteromalus puparum</i> (L.)	Ichneumonidae	»	Hoffman e Ignoffo, 1974
<i>Pimpla turionellae</i> (L.)	»	»	Bronskill e House, 1957
»	»	meridica	Yazgan, 1981
<i>Itopectis conquisitor</i> (Say)	»	»	Yazgan, 1972 House, 1978
<i>Brachymeria lasus</i> (Wlk.)	Chalcididae	olidica	Thompson, 1981b
<i>Pachycrepoideus vindimiae</i> Rond.	Pteromalidae	»	Thompson et alii, 1983
larvifagi (ectoparassitoidi)*			
<i>Exeristes roborator</i> (Fab.)	Ichneumonidae	»	Thompson, 1975
DITTERI**			
larvifagi			
<i>Lixophaga diatraeae</i> (Townsend)	Tachinidae	meridica	Grenier et alii, 1978
<i>Eucelatoria bryani</i> Sab.	»	»	Nettles et alii, 1980

* Nessun Imenottero larvifago endoparassitoide è stato finora allevato con successo *in vitro* fino allo stadio adulto.

** In questo elenco non sono compresi i parassitoidi Sarcofagidi. Chi vi fosse interessato può consultare Mellini, 1975a, pag. 272.

fecondi. Per tal motivo non ci è stato possibile dare, nella tabella, questa pure importante indicazione.

4) POSSIBILITÀ DI ALLEVAMENTO CONTINUO DI PARASSITOIDI SU DIETA ARTIFICIALE

L'allevamento *in vitro* di parassitoidi, le cui uova siano state deposte dalle femmine direttamente nella dieta, è un obiettivo che, in pratica, ancora non è stato raggiunto.

Un caso a noi noto è quello di *Trichogramma pretiosum*, di cui sono stati conseguiti l'ovideposizione e il successivo sviluppo, fino allo stadio adulto, in uova artificiali costituite da capsule di resina di 2,5 mm di diametro riempite

con emolinfa dell'ospite *Heliothis zea* (Hoffman et alii, 1975). Inoltre, in un ospite artificiale contenente dieta meridica (pH = 6,8), House (1978) ha ottenuto il ciclo completo, a partire dall'ovideposizione, del parassita di pupe *Itopectis conquisitor*, sia pure di un solo esemplare (maschio). L'Autore puntualizza tra l'altro che, in generale, determinanti ai fini dell'ovideposizione e della schiusura dell'uovo *in vitro* sono i valori di pH e di pressione osmotica del mezzo impiegato, che devono essere analoghi a quelli dell'emolinfa degli insetti ospiti (cfr. Buck, 1953).

Di solito, comunque, le uova (o le larvette) di parassitoidi utilizzate per l'allevamento su dieta artificiale vengono immerse nel mezzo nutritizio dopo la deposizione, la quale avviene, a seconda dei casi, o nell'ospite naturale, o su opportuni substrati (qualora si tratti di entomofagi le cui femmine non attaccano direttamente la vittima) oppure anche, in tempi recenti e limitatamente a Imenotteri Tricogrammatidi, in ospiti artificiali, abitualmente però non impiegati per il successivo sviluppo delle larve neonate (cfr. ad es. Xie et alii, 1986a,b).

Più specificatamente, l'ovideposizione *in vitro*, una delle condizioni necessarie per l'allevamento continuo di parassitoidi su dieta artificiale, presuppone una buona conoscenza dei meccanismi in grado di stimolare le femmine ad ovideporre *in vivo*, fatto del resto già messo in evidenza da vari Autori (ad es. Mellini, 1975a; Thompson, 1986).

Come è noto, il processo di selezione dell'ospite può essere suddiviso in tre tappe successive: a) localizzazione dell'habitat dell'ospite; b) localizzazione e c) accettabilità dell'ospite (Vinson, 1976). Fondamentali, per il buon esito del processo, sono dei fattori in primo luogo chimici (kairomoni o, più in generale, sostanze in grado di attrarre le femmine e/o di indurle a ovideporre), ma anche di altra natura (stimoli visivi, sonori, o gli stessi movimenti dell'ospite, qualora questo subisca l'attacco in uno stadio di sviluppo in cui è mobile). Forma, colori, dimensioni della vittima possono pertanto essere determinanti, soprattutto ai fini della localizzazione e dell'accettabilità della vittima.

Importante è poi conoscere le modalità di contaminazione della vittima da parte delle diverse specie di parassitoidi; come è stato evidenziato in particolare da Mellini (1978) esse possono essere sostanzialmente ricondotte a 4 tipi: deposizione a) nel corpo dell'ospite, b) sul corpo dell'ospite, c) nell'ambiente da esso frequentato o d) sul suo pabulum. Pur essendo tutte le modalità sfruttate da parassitoidi sia Imenotteri che Ditteri, la prima è, in linea di massima, la più diffusa nell'ambito degli Imenotteri, mentre le altre tre sono più diffuse tra i Ditteri.

Ovviamente, a diverse modalità di contaminazione *in vivo* possono corrispondere diversi fattori in grado di condizionare l'ovideposizione dei parassitoidi *in vitro*.

Per quanto riguarda gli Imenotteri, gli studi più avanzati sono quelli relativi agli oofagi. Ad esempio, Ding et alii (1980) hanno ottenuto l'ovideposi-

zione di *Tetrastichus schoenobii* in uova artificiali contenenti idrolisato di caseina o mezzo di cultura di tessuti BML-TC10 (Gardiner e Stockdale, 1975).

Gran parte delle ricerche hanno comunque finora riguardato oofagi appartenenti al genere *Trichogramma*. Saranno qui citati alcuni tra i contributi più significativi ai fini dell'allevamento continuo su dieta artificiale.

L'ovideposizione di *Trichogramma californicum* Nagaraja & Nagarkatti è stata ottenuta da Rajendram (1978a) in soluzione fisiologica (0,85 g NaCl in 100 ml di H₂O), in soluzione di Neisenheimer, e in substrato di Grace modificato, incapsulati in goccioline di paraffina. In due uova artificiali contenenti substrato di Grace si è anche conseguito lo sviluppo delle larvette fino alla seconda età. Successivamente, lo stesso Rajendram (1978b) ha constatato l'importanza del materiale impiegato per le capsule, essendo l'eccessiva durezza dello stesso fattore in grado di limitare la capacità di ovideposizione da parte delle femmine.

Femmine di *Trichogramma dendrolimi*, *T. pretiosum* e *T. confusum* hanno ovideposto in un mezzo costituito da idrolisato di lievito, siero di feto bovino e soluzione di Grace, a ritmi non dissimili da quelli rilevati in uova artificiali contenenti emolinfa dell'ospite *Antheraea pernyi* (Liu e Wu, 1982). Wu e Qin (1982) hanno poi constatato che, ai fini dell'ovideposizione *in vitro* di *T. dendrolimi*, componenti essenziali del substrato sono la leucina, la fenilalanina, l'isoleucina e, in minor misura, l'istidina.

Nettles et alii (1982) hanno rilevato l'elevata efficacia (superiore di 500-1000 volte rispetto alla soluzione di Neisenheimer) di una soluzione di cloruro di potassio (0,125 M) e solfato di magnesio (0,037 M) nell'indurre l'ovideposizione in uova di paraffina da parte di *T. pretiosum* e di *T. minutum*. In uno studio successivo, Nettles et alii (1983) hanno poi evidenziato l'azione sinergica dei due sali, nonché dei singoli cationi, K⁺, Cl⁻, Mg⁺⁺, SO₄⁻⁻, nel determinare l'effetto suddetto. Va comunque sottolineato che l'aggiunta di tale soluzione ad una dieta oligidica, approntata per l'allevamento di *T. pretiosum* determina un abbassamento nelle percentuali di sfarfallamento del parassita da più del 60% al 49% (Xie et alii, 1986b). Tale calo, peraltro, viene dagli stessi Autori definito non tale da far escludere in modo assoluto la possibilità di un eventuale utilizzo di questa soluzione per l'allevamento massale di *T. pretiosum* su dieta artificiale.

Morrison et alii (1983) hanno ottenuto l'ovideposizione di *T. confusum*, sempre nella medesima soluzione salina, attraverso una membrana sintetica.

Per quanto riguarda gli Imenotteri parassiti di pupe, Arthur et alii (1972) hanno conseguito l'ovideposizione di *Itoplectis conquisitor* in un mezzo artificiale contenente arginina (0,05 M), serina (0,5 M), leucina (0,005 M) e cloruro di magnesio (0,025 M); in tale substrato il numero di uova deposte da ogni femmina è stato circa il doppio che in emolinfa dell'ospite *Galleria mellonella*. Secondo uno studio eseguito da Hegdekar e Arthur (1973), i componenti dell'emolinfa dell'ospite in grado di stimolare l'ovideposizione da parte del parassitoide sono rappresentati da aminoacidi e, come loro sinergizzanti, da zuccheri esosi.

Tersac e Guerdoux (1981) hanno messo a punto un ospite artificiale, di forma cilindrica, nel quale, se riempito di estratto acquoso di crisalidi dell'ospite

te *Pieris brassicae*, le femmine del parassitoide *Pimpla instigator* (Ichneumonidae) ovidepongono. Le pupe artificiali, in paraffina, sono tali da consentire l'osservazione diretta dell'ovideposizione, nonché il conteggio delle uova.

Riguardo ai Tachinidi, la larvideposizione da parte di *Archytas marmoratus* nelle vicinanze dell'ospite *Heliothis virescens* è stimolata da una sostanza presente nelle feci, nell'emolinfa, e nel corpo in toto delle larve della vittima; tale sostanza è solubile in acqua, in acido cloridrico 0,1 N e in acido actico 0,1 N, ma non in solventi apolari (Nettles e Burks, 1975).

Burks e Nettles (1978) hanno sperimentalmente dimostrato che l'ovideposizione da parte di *Eucelatoria bryani* è indotta tanto da fattori chimici (kairomoni dell'ospite) che fisici (la forma in particolare). Una sostanza stimolante l'ovideposizione è stata estratta da cuticole di larve di *Heliothis virescens* per mezzo di cloroformio e metanolo (2:1). Alle cuticole medesime riempite con agar è stato poi riapplicato l'estratto che si è dimostrato attivo, avendo le femmine del parassita regolarmente ovideposto in tali substrati. L'efficacia dell'estratto si è invece rivelata molto ridotta quando esso è stato applicato a cuticole cui non era stata conferita la forma cilindrica.

5) CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

I pur incoraggianti risultati conseguiti nell'ultima decina d'anni nel campo delle diete artificiali per parassiti entomofagi sono ancora, nel complesso, piuttosto limitati, sicuramente non tali da far ragionevolmente sperare in una possibile applicazione di tali tecniche per la produzione massale degli entomofagi, nei tempi brevi.

Secondo Thompson (1986), le cause di ciò sono da ricercarsi soprattutto in una conoscenza tuttora alquanto lacunosa della fisiologia dei parassiti, nonché delle loro esigenze nutrizionali. È comunque presumibile che, di pari passo con l'acquisizione di sempre nuove cognizioni in tali settori, anche le possibilità di allevamento *in vitro* diventino una realtà più concreta per un numero sempre maggiore di specie.

Come si può desumere da questa rassegna, sono soprattutto gli Imenotteri oofagi e, in minor misura, i pupifagi, quelli per i quali le speranze di applicazione pratica sono più tangibili. Per gli oofagi in particolare, sono più avanzati che per gli altri parassiti anche gli studi circa le possibilità di allevamento continuo su dieta artificiale.

Riguardo a quest'ultimo settore, occorre accennare al fatto che, in futuro, esso potrà comportare dei problemi legati a fattori genetici. Infatti, come è stato messo in evidenza da alcuni Autori (ad es. Mackauer, 1976), per parassitoidi allevati *in vivo* in laboratorio per molte generazioni (specie su ospiti di sostituzione) può avvenire una selezione di particolari popolazioni dalla biologia e dal comportamento in qualche modo dissimili rispetto alla popolazione originale, e pertanto meno efficaci, come agenti di controllo, una volta liberate in campo.

Benché per ora non esistano studi specifici al riguardo (né, d'altronde, ciò sarebbe possibile dato che i risultati finora raggiunti ancora non consentono un approfondimento in questo senso) è comunque presumibile che, anche nel caso di entomofagi prodotti massalmente e continuativamente *in vitro*, si possano alla lunga presentare inconvenienti analoghi. Ovviamente, solo accurate ricerche potranno, a tempo debito, verificare se e in che misura questa ipotesi sia fondata.

RIASSUNTO

In questa revisione bibliografica sono stati presi in esame i risultati finora conseguiti nel campo delle tecniche di allevamento *in vitro* per insetti parassiti entomofagi, con particolare riferimento all'ultimo decennio.

Principalmente a causa delle conoscenze non ancora sufficientemente approfondite circa le esigenze fisiologiche e nutrizionali dei parassitoidi, il completo sviluppo, da uovo ad adulto, è stato per ora conseguito solo per una dozzina di specie (cfr. tabella I). Si tratta per lo più di Imenotteri oofagi e pupifagi i quali, *in vivo*, non instaurano in genere complessi rapporti fisiologici con l'ospite, che uccidono di solito piuttosto rapidamente.

È dunque per questi parassiti — e in particolare per gli oofagi — che le prospettive di allevamento massale *in vitro*, ai fini dell'utilizzazione in lotta biologica e integrata, si presentano più concrete, anche se, forse, non per l'immediato futuro. Riguardo ai parassiti larvali e larva-pupali, la cui fisiologia è solitamente ben più complessa e notevolmente integrata con quella dell'ospite, l'allevamento massale presuppone, a tutt'oggi, il superamento di difficoltà obiettivamente ancora maggiori.

Recent progress in rearing insect parasitoids on artificial media: an overview.

SUMMARY

The most important results achieved at culturing insect parasitoids *in vitro* — particularly during the last ten years — were reviewed.

The current knowledge of the physiology and nutrition of parasitoids is still limited. Nevertheless some species have been successfully cultured from egg to adult on artificial media (table I). Most of them are hymenopterous oophagous or pupal parasites. Generally, such insects kill their hosts quickly and do not display a great degree of interaction with the living host physiology.

At moment, the possibility of artificial mass rearing, for use in biological control programmes, seems to be more at hand for pupal, and, particularly, oophagous rather than for larval and larval-pupal parasitoids, that generally appear to be more specialized and more integrated with the host physiology.

BIBLIOGRAFIA CITATA

- ARTHUR A.P., HEGDEKAR B.M., BATSCH W.W., 1972. - A chemically defined, synthetic medium that induces oviposition in the parasite *Itopectis conquisitor* (Hymenoptera: Ichneumonidae). - *Can. Ent.*, 104: 1251-1258.
- BARONIO P., SENHAL F., 1980. - Dependence of the parasitoid *Gonia cinerascens* on the hormones of its lepidopterous host. - *J. Insect Physiol.*, 26: 619-626.
- BONNOT G., GRENIER S., DELOBEL B., 1976. - Elevage *in vitro* d'un diptere entomophage endoparasite, *Phryxe caudata* (Tachinidae). - Congr. cent. Soc. Zool. de France, Paris, settembre 1976: 13.

- BRONSKILL J.F., HOUSE H.L., 1957. - Notes on rearing a pupal parasite, *Pimpla turionellae* (L.) (Hymenoptera: Ichneumonidae), on unnatural food. - *Can. Ent.*, 89: 483.
- BUCK J.B., 1953. - Physical properties and chemical composition of insect blood. - In K.D. Roeder (Ed.), *Insect Physiology*. Acad. Press, New York, pp. 147-190.
- BURKS M.L., NETTLES W.C., 1978. - *Eucelatoria* sp.: effects of cuticular extracts from *Heliothis virescens* and other factors on oviposition. - *Env. Ent.*, 7: 897-900.
- DINDO M.L., 1987. - Effetti indotti da insetti parassitoidi nei loro ospiti. - Tesi di Dottorato di ricerca in Entomologia agraria (I° ciclo), 174 pp.
- DING D.C., QIU H.G., HWANG C.B., 1980. - *In vitro* rearing of an egg-parasitoid *Tetrastichus schoenobii* Ferriere (Hymenoptera: Tetrastichidae). - *Contr. Shanghai Inst. Entomol.*, pp. 55-58 (in cinese).
- DING D.C., ZHANG T.P., ZHONG Y.K., 1980. - Studies on *Tetrastichus schoenobii* Ferriere (Hymenoptera: Tetrastichidae): oviposition into artificial media. - *Contr. Shanghai Inst. Entomol.*, pp. 59-61 (in cinese).
- FANTI P., BRATTI A., MELLINI E., 1987. - Precocious activation of the larval-pupal parasitoid *Pseudogonia rufifrons* Wied. (Diptera Tachinidae) during the larval stage of its substitute host *Galleria mellonella* L. - «Parasitoid insects Workshop», Lyon (France), 8-10/9/1987. *Coll. INRA* (in corso di stampa).
- GAO Y.G., DAI K.J., SHONG L.S. et al., 1982. - Studies on the artificial host egg for *Trichogramma*. - «Les Trichogrammes», Antibes (France), 20-23/4/1982. *Coll. INRA*, 9: 182.
- GARDINER G.R., STOCKDALE H., 1975. - Two tissue culture media for production of lepidopteran cells and nuclear polyhedrosis viruses. - *J. Invert. Path.*, 25: 363-370.
- GREANY P., 1986. - *In vitro* culture of hymenopterous larval endoparasitoids. - *J. Insect Physiol.*, 32: 409-419.
- GRENIER S., 1977. - Effets nocifs de la nipagine M sur le parasitoïde *Phryxe caudata* (Dipt. Tachinidae). - *Entomophaga*, 22: 223-236.
- GRENIER S., BONNOT G., DELOBEL B., 1974. - Définition et mise au point de milieux artificiels pour l'élevage *in vitro* de *Phryxe caudata* Rond. (Dipt. Tachinidae). I. - Survie du parasitoïde sur milieux dont la composition est basée sur celle de l'hémolymphe de l'hôte. - *Ann. Zool. Ecol. anim.*, 6 (4): 511-520.
- GRENIER S., BONNOT G., DELOBEL B., 1975. - Définition et mise au point de milieux artificiels pour l'élevage *in vitro* de *Phryxe caudata* Rond. (Dipt. Tachinidae). II - Croissance et mues larvaires du parasitoïde en milieux définis. - *Ann. Zool. Ecol. anim.*, 7 (1): 13-25.
- GRENIER S., BONNOT G., DELOBEL B., LAVIOLETTE P., 1978. - Développement en milieu artificiel du parasitoïde *Lixophaga diatraeae* (Townsend) (Dipt. Tachinidae). Obtention de l'imago à partir de l'oeuf. - *C.R. Acad. Sc. Paris*, 287: 535-538.
- GRENIER S., DELOBEL B., BONNOT G., 1986. - Physiological considerations of importance to the success of *in vitro* culture: an overview. - *J. Insect Physiol.* 32: 403-408.
- GUAN X.C., WU Z.X., WU T.N., FENG H., 1978. - Studies on rearing *Trichogramma dendrolimi* Matsumura *in vitro*. - *Acta Entomol. Sin.*, 21: 122-126 (in cinese).
- HEGDEKAR B.M., ARTHUR A.P., 1973. - Host hemolymph chemicals that induce oviposition in the parasite *Itopectis conquisitor* (Hymenoptera: Ichneumonidae). - *Can. Ent.*, 105: 787-793.
- HOFFMAN J.D., IGNOFFO C.M., 1974. - Growth of *Pteromalus puparum* in a semisynthetic medium. - *Ann. Ent. Soc. Am.*, 66: 633-634.
- HOFFMAN J.D., IGNOFFO C.L., DICKERSON W.A., 1975. - *In vitro* rearing of the endoparasitic wasp *Trichogramma pretiosum*. - *Ann. Ent. Soc. Am.*, 68: 335-336.
- HOUSE H.L., 1958. - Nutritional requirements of insects associated with animal parasitism. - *Exp. Parasitol.*, 7: 555-609.
- HOUSE H.L., 1978. - An artificial host: encapsulated synthetic medium for *in vitro* oviposition and rearing the endoparasitoid *Itopectis conquisitor* (Hymenoptera: Ichneumonidae). - *Can. Ent.*, 110: 331-333.
- LIU W.H., WU Z.X., 1982. - Recent results in rearing *Trichogramma in vitro* with artificial media devoid of insectan additives. - *Acta Entomol. Sin.*, 25: 160-163 (in cinese).

- LIU Z., SUN Y., WANG Z., LIU J., ZHANG L., ZHANG Q., DAI K., GAO Y., 1985. - Field release of *Trichogramma confusum* reared on artificial host eggs against sugarcane borers. - *Chin. J. Biol. Cont.*, 1: 2-5 (in cinese).
- LIU Z., WANG Z., SUN Y., LIU J., YANG W., 1986. - Mass propagation of *Anastatus* sp., a parasitoid of Litchi stink bug, with artificial host eggs. - *Chin. J. Biol. Cont.*, 2: 54-58 (in cinese).
- MACKAUER M., 1976. - Genetic problems in the production of biological control agents. - *Ann. Rev. Entomol.*, 21: 369-385.
- MELLINI E., 1975a. - Possibilità di allevamento di insetti entomofagi parassiti su dieta artificiale. - *Boll. Ist. Ent. Univ. Bologna*, 32: 257-290.
- MELLINI E., 1975b. - Studi sui Ditteri Larvevoridi. XXV. Sul determinismo ormonale delle influenze esercitate dagli ospiti sui loro parassitoidi. - *Boll. Ist. Ent. Univ. Bologna*, 31: 165-203.
- MELLINI E., 1978. - Moderni problemi di entomoparassitologia. - *Atti XI Congr. Naz. Ital. Entomol.* Portici - Sorrento, 10-15 maggio 1976: pp. 263-292.
- MELLINI E., 1983. - L'ipotesi della dominazione ormonale, esercitata dagli ospiti sui parassitoidi, alla luce delle recenti scoperte nella endocrinologia degli insetti. - *Boll. Ist. Ent. «Guido Grandi» Univ. Bologna*, 38: 135-166.
- MORRISON R.K., Successful oviposition by *Trichogramma pretiosum* through a synthetic membrane. - *Southwest. Entomol.*, 8: 248-251.
- NETTLES W.C., 1986. - Effects of soy flour, bovine serum albumin, and three amino acid mixtures on growth and development of *Eucelatoria bryani* (Dipt. Tachinidae) reared on artificial diets. - *Env. Ent.*, 15: 1111-1115.
- NETTLES W.C., BURKS M.L., 1975. - A substance from *Heliothis virescens* larvae stimulating larviposition by females of the tachinid, *Archytas marmoratus*. - *J. Insect Physiol.*, 21: 965-978.
- NETTLES W.C., MORRISON R.K., XIE Z.N., BALL D., SHENKIR C.A., VINSON S.B., 1982. - Synergistic action of potassium chloride and magnesium sulfate on parasitoid wasp oviposition. - *Science* 218: 164-166.
- NETTLES W.C., MORRISON R.K., XIE Z.N., BALL D., SHENKIR C.A., VINSON S.B., 1983. - Effect of cations, anions and salts concentration on oviposition of *Trichogramma pretiosum* in wax eggs. - *Ent. exp. & appl.*, 33: 283-289.
- NETTLES W.C., MORRISON R.K., XIE Z.N., BALL D., SHENKIR C.A., VINSON S.B., 1985. - Effect of artificial diet media, glucose, protein hydrolyzates, and other factors on oviposition in wax eggs by *Trichogramma pretiosum*. - *Ent. exp. & appl.*, 38: 121-129.
- NETTLES W.C., WILSON C.M., ZISER S.W., 1980 - A diet and methods for the *in vitro* rearing of the tachinid, *Eucelatoria* sp. - *Ann. Ent. Soc. Am.*, 73: 180-184.
- RAJENDRAM G.F., 1978a. - Some factors affecting oviposition by *Trichogramma californicum* (Hymenoptera Trichogrammatidae) in artificial media. - *Can. Ent.*, 345-352.
- RAJENDRAM G.F., 1978b. - Oviposition behavior of *Trichogramma californicum* on artificial substrates. - *Ann. Ent. Soc. Am.*, 71: 92-94.
- STOLTZ D.B., KRELL P., SUMMERS M.D., VINSON S.B., 1984. - Polydnaviridae - a proposed family of insect viruses with segmented double, doublestranded, circular DNA genomes. - *Intervirology*, 21: 1-4.
- STRAND M.R., VINSON S.B., 1985. - *In vitro* culture of *Trichogramma pretiosum* on an artificial medium. - *Ent. exp. & appl.*, 39: 203-209.
- TERSAC J., GUERDOUX J., 1981. - Élevage de *Pimpla instigator* (Hym.: Ichneumonidae) dans des conditions artificielles: I. Ponte dans un leurre. - *Entomophaga*, 26: 221-232.
- THOMPSON S.N., 1975. - Defined meridic and holidic diets and aseptic feeding procedures for artificially rearing the ectoparasitoid *Exeristes roborator* (Fabricius). - *Ann. Ent. Soc. Am.*, 68: 202-226.
- THOMPSON S.N., 1976a. - The amino acid requirements for larval development of the hymenopterous parasitoid *Exeristes roborator* Fabricius (Hymenoptera: Ichneumonidae). - *Comp. Biochem. Physiol.*, 53a: 211-213.

- THOMPSON S.N., 1976b. - Effects of dietary amino acid level and nutritional balance on larval survival and development of the parasite *Exeristes roborator*. - *Ann. Ent. Soc. Am.*, 69: 835-838.
- THOMPSON S.N., 1977. - Lipid nutrition during larval development of the parasitic wasp, *Exeristes*. - *J. Insect Physiol.*, 23: 579-583.
- THOMPSON S.N., 1979. - The effects of dietary carbohydrate on larval development and lipogenesis in the parasite, *Exeristes roborator* (Fabricius) (Hymenoptera: Ichneumonidae). - *J. Parasitol.*, 65: 849-854.
- THOMPSON S.N., 1980. - Artificial culture techniques for rearing larvae of the chalcidoid parasite, *Brachymeria intermedia*. - *Ent. exp. & appl.*, 27: 133-143.
- THOMPSON S.N., 1981a. - *Brachymeria lasus* and *Pachycrepoides vindimiae*: sterol requirements during larval growth of two hymenopterous insect parasites reared in vitro on chemically defined media. - *Exp. Parasit.*, 51: 220-235.
- THOMPSON S.N., 1981b. - *Brachymeria lasus*: culture in vitro of a chalcid insect parasite. - *Exp. Parasit.*, 52: 414-418.
- THOMPSON S.N., 1982. - *Exeristes roborator*: quantitative determination of in vitro larval growth rates in synthetic media with different glucose concentrations. - *Exp. Parasit.*, 54: 229-234.
- THOMPSON S.N., 1983a. - Metabolic and physiological effects of metazoan endoparasites on their host species. - *Comp. Biochem. Physiol.*, 74B: 183-211.
- THOMPSON S.N., 1983b. - Larval growth of the insect parasite *Brachymeria lasus* reared in vitro. - *J. Parasitol.*, 69: 425-427.
- THOMPSON S.N., 1986. - Nutrition and in vitro culture of insect parasitoids. - *Ann. Rev. Entomol.*, 31: 197-219.
- THOMPSON S.N., BEDNAR L., NADEL H., 1983. - Artificial culture of the insect parasite *Pachycrepoides vindimiae*. - *Ent. exp. & appl.*, 33: 121-122.
- VINSON S.B., 1976. - Host selection by insect parasitoids. - *Ann. Rev. Entomol.*, 21: 109-133.
- VINSON S.B., IWANTSCH G.F., 1980. - Host regulation by insect parasitoids. - *Q. Rev. Biol.*, 55: 143-165.
- WU Z.X., QIN J., 1982. - Ovipositional response of *Trichogramma dendrolimi* to the chemical contents of artificial eggs. - *Acta Entomol. Sin.*, 25: 363-372 (in chinese).
- WU Z.X., QIN J., LI T.X., CHANG Z.P., LIU T.M., 1982. - Culturing *Trichogramma dendrolimi* in vitro with artificial media devoid of insect materials. - *Acta Entomol. Sin.*, 25: 128-134 (in chinese).
- XIE Z.N., NETTLES W.C., MORRISON R.K., IRIE K., VINSON S.B., 1986a. - Three methods for the in vitro culture of *Trichogramma pretiosum* Riley. - *J. Entomol. sci.*, 21: 133-138.
- XIE Z.N., NETTLES W.C., MORRISON R.K., IRIE K., VINSON S.B., 1986b. - Effect of ovipositional stimulants and diets on the growth and development of *Trichogramma pretiosum* in vitro. - *Ent. exp. & appl.*, 42: 119-124.
- YAZGAN S., 1972. - A chemically defined synthetic diet and larval nutritional requirements of the endoparasitoid *Itopectis conquisitor* (Hymenoptera). - *J. Insect Physiol.*, 18: 2123-2141.
- YAZGAN S., 1981. - A meridic diet and quantitative effects of Tween 80, fatty acid mixtures and inorganic salts on development and survival of the endoparasitoid *Pimpla turionellae* L. - *Zeit. ang. Ent.*, 91: 431-441.
- ZISER S.W., NETTLES W.C., 1978. - The larval development of *Eucelatoria* sp. in the host, *Heliothis virescens*. - *Ann. Ent. Soc. Am.*, 71: 383-388.