

ALESSANDRO BRATTI*, MIRIA MONTI**

* Istituto di Entomologia «Guido Grandi» della Università degli Studi di Bologna

** Borsista della Cassa di Risparmio di Ferrara

Allevamento «in vitro» delle larve di *Pseudogonia rufifrons* Wied. (Dipt. Tachinidae) su omogeneizzato di crisalidi di *Galleria mellonella* L. (Lep. Galleriidae)⁽⁰⁾

INTRODUZIONE

Lo sviluppo degli insetti parassitoidi su diete artificiali può facilitare lo studio della loro biologia e fisiologia e, di conseguenza, migliorare la nostra conoscenza sulle complesse interazioni esistenti tra ospite e parassita.

Parallelamente l'allevamento «in vitro» può costituire un'importante tecnica per la produzione in massa di entomofagi da utilizzare a scopo di lotta biologica (Mellini, 1975 a; Grenier, 1986).

A tutt'oggi sono state allevate su diete artificiali, fino allo stadio adulto, circa una ventina di specie tra Imenotteri e Ditteri⁽¹⁾; fra questi ultimi, solo due appartengono alla famiglia dei Tachinidi: *Lixophaga diatrae* Towns. (Grenier *et alii*, 1978), *Eucelatoria bryani* Sab. (Nettles *et alii*, 1980). Altri tentativi sono stati effettuati su substrati sub-naturali⁽²⁾ con lo scopo di verificare la capacità dei parassitoidi di svilupparsi fuori dall'ambiente vivente. Infatti, come indicato da Mellini (1975a), questa rappresenta la prima difficoltà di ordine teorico da superare.

Riguardo ai Ditteri Tachinidi risultati soddisfacenti sono stati ottenuti allevando *Palexorista laxa* Curran su diete a base di emolinfa di *Manduca sexta* L. (Bratti e Nettles, 1988).

⁽⁰⁾ Lavoro effettuato nell'ambito del P.F. - M.A.F. «Lotta biologica e integrata per la difesa delle piante agrarie e forestali».

⁽¹⁾ Per una rassegna esauriente sull'argomento vedi Campadelli e Dindo, 1988.

⁽²⁾ Per substrati sub naturali si intendono substrati che contengono essenzialmente materiali grezzi o poco modificati, sovente di origine simile a quello consumato naturalmente. Esempi: emolinfa diluita e non, omogeneizzato di insetto, etc. (Grenier, 1986).

La presente indagine ha interessato il parassitoide larva-pupale obbligato *Pseudogonia rufifrons* Wied.⁽³⁾. La larva di I età vive all'interno di un muscolo somatico che si trasforma in una sacca ipertrofica piena di liquido; solo in prossimità della muta pupale dell'ospite, ne fuoriesce per distruggerne quasi completamente i visceri.

Questo comportamento trofico stadio-differenziato, unito al fatto che «in vivo» la larva di I età presenta una forte dipendenza dagli ormoni dell'ospite (Mellini, 1975b; Baronio e Sehnal, 1980), potrebbe, almeno teoricamente, sembrare un ostacolo insormontabile per l'allevamento «in vitro» di questa specie. A questo proposito, Baronio e Sehnal (1980) hanno effettuato alcuni tentativi allevando sia L1 che L2 su omogeneizzato di crisalide di *Galleria mellonella* L. modificato con aggiunta di destrano e feniltiourea. Dal lavoro emerge che alcune L2 sono in grado di svilupparsi fino allo stadio adulto, mentre le L1 muoiono dopo pochi giorni. Questo, secondo gli Autori, indicherebbe la spiccata zoonecrofagia delle L2 nonché un'indipendenza del loro sviluppo dagli ormoni dell'ospite.

Con la presente sperimentazione abbiamo cercato di verificare se l'omogeneizzato di pupe, trattato con tecniche diverse da quelle impiegate dai suddetti autori, è in grado di permettere lo sviluppo sia delle L1 che delle L2. L'obiettivo, infatti, era quello di stabilire se era possibile utilizzare un unico substrato trofico per stadi con esigenze trofiche differenti oltreché di verificare la possibilità di allevare le larve di prima età, a comportamento molto specializzato, su un substrato non vivente.

Infine, poiché le larve e le crisalidi di *G. mellonella* sono infarcite di colonie batteriche, appartenenti soprattutto alla specie *Streptococcus faecalis* Andrewes (Stephens, 1962; Bucher, 1963; Bucher e Williams, 1966; Dudziak, 1975), abbiamo tentato di determinare la dose ottimale di antibiotico da aggiungere agli omogeneizzati al fine di controllare la proliferazione dei suddetti microorganismi nella dieta. Infatti, come riportato dal lavoro di Verenini (1983), molti parassitoidi si dimostrano particolarmente sensibili nei confronti sia dei batteri che dei loro metaboliti presenti nell'ospite.

MATERIALI E METODI

a) Materiale biologico.

Le larve di prima età di *P. rufifrons* utilizzate nella sperimentazione sono state ottenute da larve dell'ospite di sostituzione *G. mellonella*. Queste sono state superparassitizzate, all'inizio della settima età, mediante zimbelli di cera carichi di uova microtipiche e quindi, dopo circa 96-120 ore, prelevate dai con-

⁽³⁾ Il ciclo di sviluppo di *P. rufifrons* è stato ampiamente descritto da Baronio e Campadelli, 1978.

tenitori di allevamento e immerse in una soluzione di etanolo al 70%, poi lavate in acqua sterile ed infine dissezionate. Il numero dei parassiti presenti all'interno di un singolo ospite è variato da 1 a 50. Le L1, estratte per mezzo di aghi manicati opportunamente modellati, sono state poste sopra un vetrino concavo e lavate con una soluzione fisiologica⁽⁴⁾ sterilizzata mediante filtri Millex 0,45 m (Millipore S.A.). L'ultima operazione è stata eseguita per rimuovere i residui di corpo adiposo dell'ospite che, ossidando, avrebbero potuto nuocere al parassitoide. Successivamente le giovani larvette sono state trasferite, tramite pipette Pasteur, nei singoli pozzetti di scatole sterili MicroWell 96 F (Nunclon) contenenti la dieta previamente versata.

In alcuni test biologici abbiamo utilizzato L1 provenienti direttamente da uova microtipiche fatte schiudere mediante centrifugazione in acqua distillata (Mellini e Campadelli, 1988). In questo caso le uova, estratte da una singola femmina, sono state disinfettate con etanolo al 70% e poi risciacquate in acqua sterile.

Le larve di seconda età, estratte da eopupe previamente superparassitizzate come larve mature, sono state prelevate con pinze rigide e, dopo il solito lavaggio, messe sul pabulum.

b) Preparazione del substrato trofico.

Il substrato trofico utilizzato nel corso dell'intera sperimentazione è stato ottenuto con crisalidi di *G. mellonella* di età non superiore alle 48 ore. Nell'insieme, in questo periodo, si riscontra un alto contenuto di ecdisteroidi (Sehnal *et alii*, 1981) che, come precedentemente dimostrato (Mellini 1975b; Baronio e Sehnal, 1980), sono indispensabili per la prima muta delle larve del parassitoide.

Le crisalidi, una volta sbozzolate, sono state «scottate» mediante immersione in acqua distillata a 60°C per 10-15', al fine di disattivare gli enzimi responsabili dell'imbrunimento dell'emolinfa e dei tessuti in genere. Le pupae, così trattate, sono state disinfettate in etanolo 70% e quindi, seguendo le indicazioni di Awuitor *et alii* (1984), poste in gruppi di 4-5 individui in una siringa sterile monouso da 10 ml dove sono state schiacciate. Il materiale così ottenuto, spogliato dai residui tegumentali, è stato raccolto in piccoli beakers da 10 ml, pesato, agarizzato (concentrazione finale di agar pari all'1%) e distribuito con una siringa sterile da 1 ml in ragione di circa 100-150 mg per pozzetto in piastre sterili Microwell Nunclon 96 F. In alcune tesi una soluzione di solfato di gentamicina (Sigma) è stata addizionata prima della distribuzione dell'omogeneizzato nelle varie cellette. La dieta così preparata è rimasta a «riposare» per 24 ore a temperatura di 23-24°C ed U.R. ambiente. Per impedire il disseccamento del pabulum

⁽⁴⁾ Abbiamo provato 3 soluzioni fisiologiche: Ephrussi-Beadle, Neisenheimer, NaCl 0.8%. Non si sono notate differenze riguardo la mortalità per il parassitoide.

e per garantire un U.R. prossima al 100% abbiamo versato nei pozzetti di bordo acqua distillata sterile.

Le piastre sono state racchiuse in contenitori di plastica ermetici e mantenuti ad una temperatura di 24-25°C.

Tutte le operazioni relative ai punti sopraesposti sono state eseguite sotto cappa a flusso laminare per consentire il massimo di asepsi. Il materiale impiegato (vetrini, forbici, pinze rigide, agar, etc.) è stato autoclavato per 15' a 125°C e 1.8 bar.

c) Impostazione della sperimentazione.

Il lavoro comprende due serie di prove. Nella prima, utilizzando larve di prima e seconda età, sono stati messi a confronto due substrati: uno costituito da omogeneizzato agarizzato e l'altro dal medesimo pabulum addizionato di solfato di gentamicina in ragione dello 0.006%. La scelta del menzionato antibiotico deriva dal fatto che esso possiede un ampio spettro di azione sia nei confronti di batteri Gram + che Gram -. La concentrazione della sostanza germicida è stata scelta in base alle indicazioni fornite dalla casa produttrice per l'uso nelle colture dei tessuti «in vitro».

Per ognuna delle 2 tesi sono state eseguite 4 ripetizioni di 25-30 individui per le L1, e 3 ripetizioni con il medesimo numero di larve per le L2.

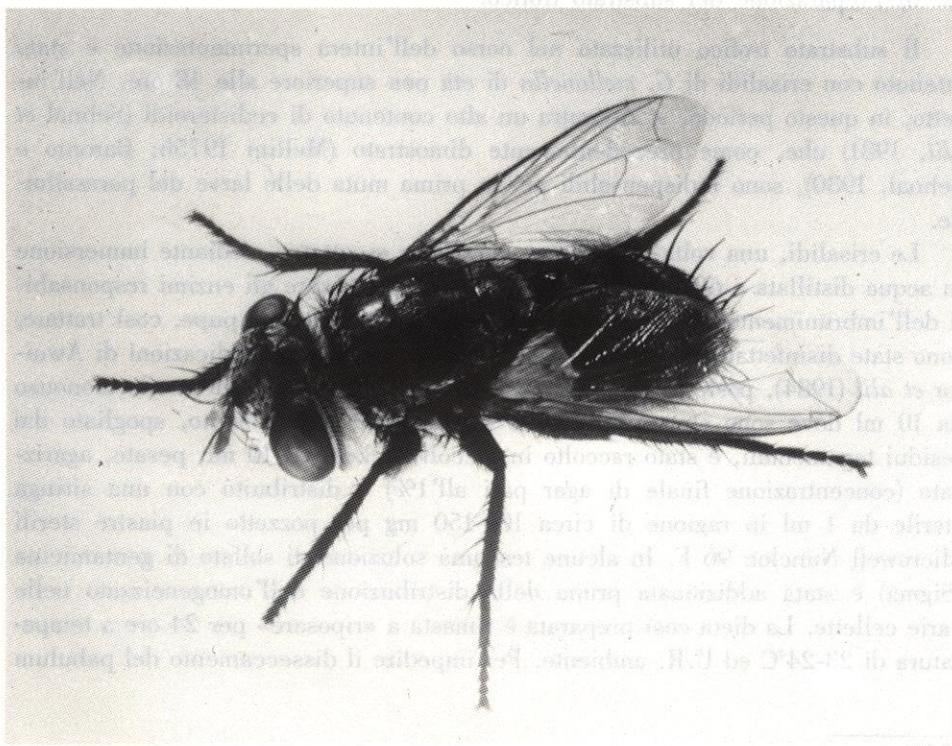


Fig. 1 - Adulto femmina di *Pseudogonia rufifrons* Wied. ottenuto allevando le larve fin dalla I età su omogeneizzato di pupae di *Galleria mellonella* L. contenente solfato di gentamicina.

Nella seconda serie di prove effettuate con le L1, visti i buoni risultati conseguiti aggiungendo il solfato di gentamicina, ne abbiamo saggiato 5 concentrazioni differenti nell'omogeneizzato: 0.0015, 0.003, 0.006, 0.01, 0.1%. Ogni tesi è stata ripetuta 3 volte con un numero di 20-25 individui per ogni replica.

Da ultimo sono state messe in allevamento circa una trentina di L1, provenienti da uova fatte schiudere mediante centrifugazione, su omogeneizzato con agar allo 0.75% e con lo 0.01% di antibiotico.

I parametri biologici considerati sono stati, per ambedue le prove, le percentuali di individui che hanno mutato nello stadio successivo e i tempi di sviluppo relativi ad ogni stadio. Abbiamo anche calcolato il periodo medio di sopravvivenza per quei parassitoidi che non compiono la muta.

Per quanto riguarda l'elaborazione statistica dei dati, è stata eseguita l'analisi della varianza ad una via (AOV) solo per le L1, e per i seguenti parametri: % di L1 mutate in seconda età e tempo di sviluppo dal momento in cui le larve sono state poste in allevamento fino al raggiungimento della seconda età.

RISULTATI

I PROVA

1. Allevamento di larve di I età.

La tabella 1 mostra che nel substrato addizionato con solfato di gentamicina circa l'80% delle L1 ha raggiunto la seconda età. Di contro, solo il 20% di

Tab. 1 - Allevamento di larve di I età di *Pseudogonia rufifrons* Wied. su omogeneizzati di pupae di *Galleria mellonella* L. con e senza solfato di gentamicina.
(25-30 individui per ripetizione, 4 ripetizioni) (Media \pm ES).
Medie seguite dalla stessa lettera non differiscono significativamente ($P < 0.05$).
Le percentuali sono calcolate sul numero iniziale delle L1.

Parametri biologici	Substrato naturale	Substrato con 0.006% di solfato di gent.
% di L2	20.33 \pm 12.12 a	80.97 \pm 9.01 b
Tempo impiegato da L1 a L2* (gg)	2.30 \pm 0.13 a	2.18 \pm 0.1 a
% di L3	0.00	5.80 \pm 4.8
Tempo impiegato da L2 a L3 (gg)		4.64 \pm 0.64
% di Pupa	0.00	3.30 \pm 3.3
Tempo impiegato da L3 a Pupa (gg)		4.25°
% di Adulti	0.00	2.5 \pm 2.5
Tempo impiegato da Pupa ad Adulto (gg)		12.66°

* Si intende il tempo calcolato dal momento in cui le L1 sono state poste in allevamento.

° Dati ottenuti da una singola ripetizione.

quelle poste nella dieta priva dell'antibiotico sono riuscite a mutare. Addirittura, su quest'ultima, in ben due ripetizioni la percentuale di L2 è stata nulla. Questo è il motivo di un ES così elevato (20 ± 12.12).

Il tempo medio, dal momento in cui le larve sono state poste in allevamento al raggiungimento della seconda età, non varia significativamente nelle due tesi a confronto: 2.3 e 2.18 giorni. Gli individui rimanenti, che non sono mutati, nella stragrande maggioranza dei casi sono morti dopo circa 3 giorni dall'inizio della sperimentazione.

Inoltre sul pabulum privo di antibiotico, le L2 neoformate non sono cresciute e, dopo circa 24 ore, non hanno più dato segno di vita. Diverso, anche se limitato a pochi individui, è quello che è accaduto sull'altra dieta, dove alcune larvette sono riuscite a raggiungere lo stadio adulto (2.5%). Le immagini, sfarfallate da pupae di peso variabile da 45 a 80 mg, sono sopravvissute per circa una decina di giorni. Il tempo impiegato da L1 allo sfarfallamento è stato mediamente di 24-25 gg. Il resto delle L2, pur accrescendosi, nel giro di 4 giorni sono morte. Numerose di queste presentavano una sintomatologia caratteristica, data dall'imbrunimento dei tubi malpighiani, inoltre esse apparivano circondate da un alone biancastro nel pabulum, probabilmente dovuto allo sviluppo di colonie batteriche.

Gli stessi sintomi sono stati riscontrati per le L1 provenienti dalla sospensione acquosa ottenuta dalla centrifugazione delle uova microtipiche. Una decina di queste larvette sono cresciute, raggiungendo un volume pari a 20-30 volte quello iniziale, ma, pur sopravvivendo per più di 12 giorni, non sono state in grado di mutare.

2. Allevamento di larve di II età.

Come si può rilevare dalla tabella 2, nella tesi priva di solfato di gentamicina nessuna L2 (0/75) è riuscita a mutare. Mediamente dopo circa 3 giorni tutti gli individui sono morti senza essere cresciuti in modo sensibile; ciò è dovuto, per quanto possiamo giudicare, a notevoli problemi nell'attaccare il pabulum. Molte L2, appena poste sulla dieta, sono scappate migrando in altri pozzetti o sulla superficie interna del coperchio dei contenitori dove sono morte disidratate.

Nella tesi con solfato di gentamicina circa il 23% delle larve ha raggiunto la terza età impiegando un tempo medio di 7.9 giorni. Di queste L3 circa la metà si sono impupate ma solo un individuo ha terminato lo sviluppo formando un adulto vitale. Le restanti L2 sono rimaste in vita per oltre 8 giorni, ma sono cresciute stentatamente rimanendo spesso ai margini dei pozzetti in una sorta di quiescenza.



Fig. 2 - Larva di II età prossima alla muta, con caratteristica colorazione nerastra dei tubi malpighiani, allevata su omogeneizzato di pupae di *Galleria mellonella* L. contenente solfato di gentamicina.

Tab. 2 - Allevamento di larve di II età di *Pseudogonia rufifrons* Wied. su omogeneizzati di pupae di *Galleria mellonella* L. con e senza solfato di gentamicina. (25 individui per ripetizione, 3 ripetizioni) (Media \pm ES).
Le percentuali sono calcolate sul numero iniziale delle L2.

Parametri biologici	Substrato naturale	Substrato con 0.006% di solfato di gent.
% di L3	0.00	22.7 \pm 11.6
Tempo impiegato da L2 a L3 (gg)*		7.98 \pm 2.2
% di Pupa	0.00	10.1 \pm 5.5
Tempo impiegato da L3 a Pupa (gg)		5.1 \pm 0.1
% di Adulti	0.00	1.3 \pm 1.3
Tempo impiegato da Pupa ad Adulto (gg)		11°

* Si intende il tempo calcolato dal momento in cui le L2 sono state poste in allevamento.

° Dati ottenuti da una singola ripetizione.

II PROVA

Effetti del solfato di gentamicina sullo sviluppo delle L1.

Le 5 concentrazioni saggiate nell'omogeneizzato hanno dato percentuali di L2 differenti: dal 58% per lo 0.0015%, all'84.7% per lo 0.01% fino al 91.9 per lo 0.1% (Tab. 3). Il tempo impiegato per raggiungere la seconda età non differisce statisticamente nelle 5 tesi variando da 2.2 giorni per la concentrazione minore a 3.1 giorni per quella maggiore.

Per quanto riguarda le L3, in generale, abbiamo avuto pochi individui, e per di più limitatamente a tre tesi (0.003, 0.01, 0.1%). Ancor minore è stato il numero di esemplari che hanno raggiunto lo stadio pupale (1.4% nella tesi con lo 0.01%), mentre nessuna L1 è stata in grado di svilupparsi fino a raggiungere lo stadio adulto. Nelle due tesi caratterizzate dalle concentrazioni più elevate, le L2 neoformate sono cresciute in volume rimanendo in vita mediamente dai 4 agli 8 giorni. Come già notato nella prima prova, esse presentavano i tubi malpighiani infarciti di inclusioni nerastre.

DISCUSSIONE DEI RISULTATI

Il risultato più importante dell'intera sperimentazione riguarda le larve di prima età di *P. rufifrons*. Esse infatti sono in grado di crescere e mutare su un substrato inerte. Molto probabilmente l'omogeneizzato di crisalidi contiene tutti i fattori nutrizionali e non (alto contenuto di ecdisteroidi), che permettono al Tachinide di completare la prima fase di sviluppo. I dati ottenuti differiscono da

Tab. 3 - Effetti di diverse concentrazioni di solfato di gentamicina in omogeneizzato di pupe di *G. mellonella* sullo sviluppo di larve di I età di *Pseudogonia rufifrons* Wied.

(25 individui per ripetizione, 3 ripetizioni) (Media \pm ES).

Medie seguite dalle stesse lettere non differiscono significativamente ($P < 0.05$).

Le percentuali sono calcolate sul numero iniziale delle L1.

Concentrazioni in %	0.0015	0.003	0.006	0.01	0.1
% di L2	58.9 \pm 6.4a	54.7 \pm 14.4ab	65.5 \pm 14.4ab	84.73 \pm 4.5bc	91.9 \pm 2.5c
Tempo impiegato da L1 a L2 * (gg)	2.2 \pm 0.1a	2.3 \pm 0.05a	2.7 \pm 0.2a	2.6 \pm 0.3a	3.1 \pm 0.3a
% di L3	0.00	2.7 \pm 2.7	0.00	4.3 \pm 4.3	7.7 \pm 7.7
Tempo impiegato da L2 a L3 (gg)		5.5°		4.0°	9.7°
% Pupe	0.00	0.00	0.00	1.4 \pm 1.4	0.00
Tempo da L3 a Pupe (gg)				7.0°	

* Si intende il tempo calcolato dal momento in cui le L1 sono state poste in allevamento.

° Dati ottenuti da una singola ripetizione.

quelli rilevati da Baronio e Sehnal (1980) che, allevando larve di prima età sopra un pabulum a base di pupe di *G. mellonella*, non hanno mai conseguito il passaggio all'età successiva. La non corrispondenza dei risultati va ricercata, a nostro avviso, nelle tecniche che i succitati Autori hanno adottato nella preparazione dell'omogeneizzato. Essi, infatti, per impedire la melanizzazione dell'emolinfa e dei tessuti hanno utilizzato feniltiourea che, come dimostrato per *Cotesia marginiventris* (Cresson) (Greany, 1986) e per *E. bryani* (Nettles, comunicazione personale), può essere nociva e quindi aver interferito negativamente anche sullo sviluppo delle L1 di *P. rufifrons*. Le elevate percentuali di L1 che hanno effettuato la muta, riscontrate nelle tesi con le concentrazioni più alte di antibiotico, indicano un effetto positivo di tale prodotto che pare essere in grado di contenere la proliferazione delle colonie batteriche. Tra l'altro alle dosi provate sembra che non vi sia, almeno per le L1, un effetto negativo. Per la verità, come dimostrato da alcuni Autori per altri Ditteri parassitoidi allevati «in vitro» (Grenier, 1977; Singh e House, 1970a; Singh e House 1970b), l'azione esercitata dalle sostanze antimicrobiche a determinate concentrazioni può manifestarsi non solo con la morte immediata, ma anche provocando l'allungamento dei tempi nonché la formazione di individui sottodimensionati, fino a causare la morte in fasi successive del ciclo di sviluppo. In effetti, dalle due tesi con concentrazioni pari allo 0.01 e 0.1% abbiamo ottenuto pochissime L3 e nessun adulto.

D'altronde, l'uso di queste sostanze è spesso indispensabile, soprattutto come nel nostro caso, quando si dispone di un materiale biologico di partenza già inquinato da microorganismi⁽⁵⁾.

La presenza di batteri nell'omogeneizzato ha largamente condizionato l'intera sperimentazione. Dimostrativo è il fatto che nella prima serie di prove, nelle tesi non addizionate con il solfato di gentamicina, solo poche L1 e nessuna L2 sono mutate. Diventa pertanto molto importante, qualora si utilizzino substrati di origine animale, cercare, quando non si possa effettuare una sterilizzazione completa⁽⁶⁾, di avere del materiale in buone condizioni sanitarie.

Un dato che emerge, confrontando i risultati, è che le L2 direttamente poste in allevamento sembrano avere più problemi di crescita e di sviluppo rispetto alle L1.

Questo è difficilmente spiegabile se si pensa che «in vivo» le L2 si sviluppano completamente a spese delle pupe dell'ospite. Per motivare il fenomeno si potrebbe presupporre che le larve di seconda età siano più sensibili all'azione dei batteri rispetto alle L1; ne sarebbe dimostrazione il fatto che, nella tesi senza antibiotico, le prime muoiono già dopo sole 48 ore dal momento in cui sono state depositate sulla dieta.

⁽⁵⁾ Le crisalidi utilizzate per ottenere l'omogeneizzato provengono da un allevamento in cui periodicamente si hanno morie diffuse dovute, molto probabilmente, alla presenza massiccia di alcune specie batteriche.

⁽⁶⁾ Abbiamo provato a sterilizzare in autoclave il substrato, ma data la temperatura elevata a cui era sottoposto, cambiava completamente la sua struttura fisica e forse in parte la composizione chimica risultando non appetito dal parassitoide.

Le larve di I età, provenienti direttamente da uova fatte schiudere tramite stimolazione meccanica, si sono comportate diversamente rispetto a quelle prelevate dall'ospite dissezionato. Le prime infatti, pur aumentando in dimensioni, non hanno compiuto la muta. I dati non sono sufficienti per effettuare un confronto, ma dai risultati conseguiti sembrerebbe che la permanenza nell'ospite, anche per pochi giorni soltanto, sia quasi una condizione fondamentale per il proseguimento dello sviluppo. D'altronde un fenomeno simile è stato evidenziato da Nettles *et alii* (1980) anche per le larve di *E. bryani* Sab. Esse, infatti, se vengono tolte dall'ospite dopo solo 6-8 ore e messe su substrato artificiale, presentano una forte mortalità che invece non si riscontra se sono estratte dopo 24 ore di permanenza.

In conclusione si può affermare che, anche per i Tachinidi a sviluppo larva-pupale obbligato, caratterizzati «in vivo» da complessi rapporti fisiologici con il loro ospite, è possibile la crescita e lo sviluppo su substrati artificiali. La dieta da noi messa a punto non è certamente ottimale per le larve di *P. rufifrons* in quanto non consente di ottenere elevate percentuali di adulti ma, in termini applicativi, permette di poter disporre di un'ulteriore tecnica per lo studio dell'etologia e fisiologia delle larve del parassitoide.

RINGRAZIAMENTI

Gli autori ringraziano il Dott. Paolo Fanti per la stretta collaborazione e i preziosi suggerimenti.

RIASSUNTO

Nel lavoro vengono riportati i risultati dell'allevamento delle larve di prima e seconda età di *Pseudogonia rufifrons* Wied. su omogeneizzati di pupe di *Galleria mellonella* L. Sono state effettuate due serie di prove. Nella prima sono stati messi a confronto omogeneizzati senza e con solfato di gentamicina (0.006%). Nella seconda, al fine di controllare lo sviluppo di colonie batteriche nel substrato, visti i buoni risultati raggiunti con l'antibiotico, abbiamo ricercato la dose che permettesse alle larve di prima età di raggiungere, in alta percentuale, il secondo stadio.

I risultati ottenuti indicano che l'omogeneizzato di crisalidi di *G. mellonella* è un buon substrato per la crescita e lo sviluppo delle larve di prima età (90% di L1 che mutano in L2 alla concentrazione dello 0.1%, 80% di L1 che mutano in L2 e il 2.5% che raggiungono lo stadio adulto alla concentrazione dello 0.006%), oltretutto un valido strumento tecnico per lo studio della fisiologia ed etologia degli stadi preimmaginali del Dittero Tachinide *P. rufifrons*.

In Vitro Rearing of *Pseudogonia rufifrons* Wied. (Dipt. Tachinidae) on Pupal Homogenate of *Galleria mellonella* L. (Lep. Galleriidae)

SUMMARY

First and second instars of *Pseudogonia rufifrons* Wied. were reared on pupal homogenate of *Galleria mellonella* L. and the results are reported. In the first experiment homogenates with and

without gentamycin sulphate (0.006%) were compared. The resulting data were then employed to determine the dosage of antibiotic needed to assure the control of bacterial colony development in the medium and, consequently, determine the highest yield percentage of adults.

The overall results suggest that *G. mellonella* pupal homogenate is a good medium for the growth and development of first instars — up to 80% of them moult to second instar but only 2.5% reach the adult stage in the diet containing 0.006% of antibiotic — and a viable tool in physiological and ethological studies of *P. rufifrons* larval instars.

BIBLIOGRAFIA CITATA

- AWUITOR K., MASSELOT M., TERSAC J., 1984. - In vitro rearing of *Pimpla instigator* (Hym.: Ichneumonidae) 2. Completion of development in semiartificial conditions. - *Entomophaga*, 29 (3): 331-339.
- BARONIO P., CAMPADELLI G., 1978 - Ciclo biologico di *Gonia cinerascens* Rond. (Dipt. Tachinidae) allevata in ambiente condizionato sull'ospite di sostituzione *Galleria mellonella* L. (Lep. Galleriidae). - *Boll. Ist. Ent. Univ. Bologna*, 34: 35-54.
- BARONIO P., SEHNAL F., 1980. - Dependence of the parasitoid *Gonia cinerascens* on the hormones of its Lepidopterous host. - *J. Insect Physiol.*, 26: 619-626.
- BRATTI A., NETTLES W.C., 1988. - In vitro rearing of *Palexorista laxa* (Curran) (Diptera: Tachinidae) on haemolymph-based diets. - *Boll. Ist. Ent. «G. Grandi» Univ. Bologna*, 43: 24-30.
- BUCHER G.E., 1963. - Survival of populations of *Streptococcus faecalis* Andrewes and Horder in the gut of *Galleria mellonella* (Linnaeus) during metamorphosis, and transmissions of the bacteria to the filial generation of the host. - *J. Insect Pathol.*, 5: 336-343.
- BUCHER G.E., WILLIAMS R., 1967. - The microbial flora of laboratory cultures of the greater wax moth and its effect on rearing parasites. - *J. Invertebrate Pathol.*, 9: 467-473.
- CAMPADELLI G., DINDO M.L., 1987. - Recenti progressi nello studio delle diete artificiali per l'allevamento di insetti entomofagi parassiti. - *Boll. Ist. Ent. «G. Grandi» Univ. Bologna*, 42: 101-118.
- DUDZIAK B., 1975. - Microflora of *Galleria mellonella* L. - *Ann. Univ. Mariae Curie-Sklodowska sectio C*, 30: 1-14.
- 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* 22,2: 223-236.
- GRENIER S., BONNOT G., DELOBEL B., LAVIOLETTE P., 1978. - Développement en milieu artificiel du parasitoïde *Lixophaga diatraeae* (Townsend) (Diptera Tachinidae). Obtention de l'imago à partir de l'oeuf. - *C.R. Acad. Sci. Paris, Ser. D*. 387: 535-538.
- GRENIER S., 1986. - Biologie et physiologie des relations hotesparasitoïdes chez 3 tachinaires (Diptera Tachinidae) d'intérêt agronomique. Développement en milieux artificiels. Lutte biologique. - *These Doctorat, Lyon*.
- MELLINI E., 1975a. - Possibilità di allevamento di Insetti entomofagi parassiti su diete artificiali. - *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 parassiti. - *Boll. Ist. Ent. Univ. Bologna*, 31: 165-203.
- MELLINI E., CAMPADELLI G., 1988 - Prove di incubazione extrauterina e di schiusa delle uova microtipiche di *Pseudogonia rufifrons* Wied. - *Boll. Ist. Ent. «Guido Grandi» Univ. Bologna*, 43: 105-114.
- 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. Entomol. Soc. Am.*, 73: 180-184.
- SEHNAL F., MARÒY P., MALA J., 1980. - Regulation and significance of ecdysteroid titre fluctuations in Lepidopterous larvae and pupae. - *J. Insect Physiol.*, 27: 535-544.

- SINGH P., HOUSE H.L., 1970a. - Effects of streptomycin and potassium sorbate levels in relation to nutrient levels on the larvae of *Agria affinis*. - *J. Econ. Entomol.*, 63: 449-454.
- SINGH P., HOUSE H.L., 1970b. - Antimicrobial agents: their detrimental effects on size of an insect, *Agria affinis*. - *Can. Ent.*, 102: 1340-1344.
- STEPHENS J.M., 1962. - A strain of *Streptococcus faecalis* Andrewes and Horder producing mortality in larvae of *Galleria mellonella* (Linnaeus). - *J. Insect Pathol.*, 4: 267-275.
- VERENINI M., 1983. - Sviluppo dei parassitoidi in ospiti colpiti da malattie infettive. - *Boll. Ist. Ent. Univ. Bologna*, 37: 225-265.