

ALESSANDRO BRATTI

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

Allevamento *in vitro* di *Pseudogonia rufifrons* Wied. in estratti di omogeneizzato di crisalidi di *Galleria mellonella* L. e su diete meridiche⁽¹⁾

INTRODUZIONE

I liquidi nutritizi a base di emolinfa sono stati utilizzati con successo per l'allevamento *in vitro* di molti Imenotteri endoparassitoidi (Bouletreau, 1968, 1972; Hoffman *et al.*, 1973, 1975; Guan *et al.*, 1978; Lu e Lang, 1981; Xie *et al.*, 1986), risultando sovente più idonei rispetto a ricche diete prive di componenti e derivati dell'ospite (Hoffman e Ignoffo, 1974; Wu *et al.*, 1980, 1982).

Per quanto riguarda i Ditteri Tachinidi esiste solo una ricerca al riguardo effettuata sulla specie *Palexorista laxa* (Curran) (Bratti e Nettles, 1988). Anche se l'uso dell'emolinfa (o dei suoi derivati) è improponibile per allevamenti su larga scala, la sua validità nutrizionale e la conoscenza della sua composizione chimica possono costituire un'importante punto di partenza da cui sviluppare diete olidiche e meridiche.

A tutt'oggi l'unico substrato che ha permesso di allevare una specie di questa famiglia, consentendo rese elevate di adulti, è stato quello formulato da Nettles (1986) per *Eucelatoria bryani* Sab. La dieta era priva di sostanze derivate dall'ospite, tuttavia quando queste sono state addizionate si è assistito ad incrementi produttivi significativi (Nettles, com. personale)⁽²⁾.

La sperimentazione, che ha interessato il parassitoide larva-pupale *Pseudogonia rufifrons* Wied., è stata suddivisa in due parti.

La prima è stata condotta su diete a base di emolinfa ottenuta dalle crisalidi

⁽¹⁾ Lavoro effettuato nell'ambito del P.F. - M.A.F. «Lotta biologica e integrata per la difesa delle piante agrarie e forestali».

⁽²⁾ Nettles (1989) sostiene che i risultati positivi ottenuti addizionando nelle diete componenti dell'ospite, come ad esempio l'emolinfa, sono un chiaro indice che almeno alcune specie di parassitoidi dipendono da sostanze chimiche peculiari presenti nell'ospite.

dell'ospite di sostituzione *Galleria mellonella* L. Lo scopo era quello di verificare l'idoneità di questi substrati per la crescita e lo sviluppo delle larve di prima età; inoltre, data la presenza in questi allevamenti di numerose specie batteriche (appartenenti soprattutto ai generi *Streptococcus* e *Bacillus*), sono stati eseguiti trattamenti fisici e chimici sia all'emolinfa, che al materiale biologico per prevenire il diffondersi di pericolose epizozie.

Nella seconda parte, impiegando larve del parassitoide di prima e seconda età, si sono sperimentate diete meridiche, basate come composizione chimica su quella di Nettles (1986), aumentando però il contenuto proteico con l'aggiunta di sostanze quali caseina, gelatine ed estratto di carne. In alcune di queste si è sostituito l'agar con cotone, come supporto fisico, al fine di evitare la presenza di materiale indigeribile nella dieta.

MATERIALI E METODI

a) Materiale biologico

Le larve di I età di *P. rufifrons* sono state prelevate da larve di VII età di *G. mellonella*, dopo 72 ore dalla parassitizzazione. L'ospite, prima di essere dissezionato, è stato disinfettato in etanolo al 70% e quindi risciacquato in soluzione fisiologica sterile. Le larvette, di dimensione variabile, sono state raccolte mediante aghi manicati e trasferite sopra un vetrino concavo, dove sono state sottoposte ad un accurato lavaggio.

In seguito, nelle prove in cui sono stati utilizzati i liquidi emolinfatici, dopo aver tolto la soluzione salina usando piccoli pezzi di carta assorbente, si è provveduto a dispensare la dieta in modo da immergervi completamente le larve del parassita. Queste sono state poste individualmente, o in piccoli gruppi, nelle cellette di contenitori MicroWell 96 F (Nunc) (100-150 µl di dieta per cella).

Dove invece i substrati erano rappresentati dalle varie diete meridiche, le larve di prima età sono state semplicemente trasferite, dopo un lavaggio, mediante pipette contenenti la medesima soluzione fisiologica (Bratti e Monti, 1988).

In una parte del lavoro si sono usate larvette neosgusciate provenienti da uova microtipiche di una femmina morta nelle 24 ore. Come riportato da Mellini e Campadelli (1988), le percentuali di schiusa sono in genere molto variabili nelle femmine morte per cui, in questo caso, sono state eseguite numerose dissezioni prima di trovare una femmina idonea. Quest'ultima, prima di venire privata dell'utero ricco di uova embrionate, è stata disinfettata con etanolo al 70%. Le larvette, fuoriuscite dalle uova immerse in soluzione fisiologica, sono state trasferite con pipette in gruppi da 2 a 15 nei pozzetti con l'emolinfa.

Le larve di seconda età di *Pseudogonia* sono state ottenute da eoupe superparassitizzate e quindi, dopo il solito lavaggio, distribuite individualmente nelle cellette piene a metà di dieta. Il trasferimento delle L₂ è stato eseguito con aghi manicati, al posto delle pipette, evitando così di aggiungere liquidi che, se non

assorbiti dal pabulum, avrebbero potuto provocare la morte dell'entomofago per asfissia.

b) Preparazione dei substrati trofici

Per ottenere il liquido nutritizio a base di emolinfa, si è sottoposto l'omogeneizzato di pupe di *Galleria* (formate nelle 48 ore e trattate con calore per disattivare le fenolossidasi), collezionato all'interno di piccoli tubi da centrifuga Eppendorf (2 ml di volume), ad una centrifugazione di 10.000 giri/min per 12 minuti. Il liquido, privato dei suoi componenti più grossolani, è stato estratto mediante una siringa per poi essere sterilizzato con filtri Millex da 0.45 μ . Ad una parte di esso si è addizionato solfato di gentamicina (concentrazione nel medium dello 0.01%).

Le diete meridiche sperimentate erano costituite da una base olidica simile (Tab. 1), a cui sono state addizionate diverse sostanze.

La parte olidica è stata definita da Nettles (1986) per il Tachinide *E. bryani* e nella sua preparazione sono state seguite le indicazioni dello stesso Autore. Le diete sono state poi completate addizionando, prima della sterilizzazione in autoclave, i diversi prodotti con l'eccezione degli omogeneizzati, i quali sono stati mescolati al resto dei componenti successivamente quando la temperatura scendeva a circa 50-60°C. La scelta di sostanze quali farina di soia, caseina, gelatina ed estratto di carne è stata fatta, oltre che per l'apporto proteico, anche in base al loro basso costo. In alcune diete, come supporto fisico, si è usato del cotone idrofilo modellato in forma sferica e autoclavato per circa 15' a 121°C.

Le palline di cotone sono state in seguito collocate all'interno di contenitori a microcelle Multidish 24 Nunclon per poi essere imbibite di dieta, mentre i substrati agarizzati sono stati versati, prima della solidificazione, all'interno dei pozzetti di contenitori MicroWell 96 Nunclon.

Prima di porvi le larvette le diete sono rimaste per circa 24 ore ad una temperatura di 23-24°C ed U.R. ambiente.

Durante l'arco dell'intera sperimentazione è stata mantenuta una temperatura di 24-25°C ed un'U.R. prossima al 100%, ottenuta ponendo le piastre in recipienti ermetici contenenti piccoli beakers ripieni di acqua sterile.

Tutte le operazioni sono state eseguite sotto cappa a flusso laminare ed il materiale impiegato (vetreria, forbici, pinze, etc.) è stato autoclavato per 15' a 121°C.

c) Impostazione della sperimentazione

1) Substrato a base di emolinfa

È stato applicato uno schema fattoriale 2x2. Sono stati posti a confronto due substrati, di cui uno addizionato con solfato di gentamicina (0.01%), su cui sono state poste le larve del parassitoide (estratte 72 ore dopo la parassitizzazione

Tab. 1 - Composizione della dieta olidica (Nettles, 1986).

Ingredienti	mg/100 ml	Ingredienti	mg/100 ml
Acido malico	30	Tirosina	70
Acido alfa-chetoglutarico	45	Fenilalanina	100
Acido fumarico	50	Beta alanina	10
Acido citrico	25	Lisina	150
Acetato di K	83	Istidina	100
Succinato di Ca	67	Arginina	125
Acido piruvico	30	Triptofano	40
		Leucina	130
NaCl	261	Gamma-acido aminobutirrico	5
KCl	59	Fosfoetanolamina	5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	123	Fosforilcolina di Ca	129
MgCl ₂ ·6H ₂ O	319		
KH ₂ PO ₄	40	Tiamina	0.1
K ₂ HPO ₄	51	Riboflavina	1.0
KI	0.02	Piridossina	0.1
Co (Ac.) ₂ ·4H ₂ O	0.02	Biotina	0.05
Mn (Ac.) ₂ ·4H ₂ O	5.5	Niacinamide	2.0
Cu (Ac.)·H ₂ O	0.02	Acido pantotenico	4.0
Fe (NO ₃) ₃ ·H ₂ O	8.9	Acido ascorbico	5.0
Zn (Ac.) ₂ ·2H ₂ O	2.0	Acido folico	1.0
		Cianocobalamina	0.0035
Trealoso	1000	Mioinositolo	5.0
Glucoso	50		
		Cannamicina	5.0
Adenina	6.0	Penicillina	10.0
Timina	6.0		
Guanina	6.0	Distearilfosfatidilcolina	0.1
Citosina	3.0	Dimiristoilfosfatidilcolina	0.1
Uracile	6.0	Tween 80	150
		Colesterolo	10
ATP	20	Acetato di retinolo	0.5
Glutazione rid.	10	Alfa tocoferolo	0.5
Isoleucina	80	Trioleina	50
Cisteina	8	KOH, 6 N (a pH 6.75)	
Metionina	40		
Asparagina	200		
Treonina	70		
Serina	100		
Glutammina	225		
Prolina	75		
Glicina	80		
Alanina	125		
Valina	100		

artificiale), metà delle quali trattate con un bagno di formalina allo 0.4% per circa 1'. La ragione per cui è stato effettuato il trattamento era di verificare se fosse possibile eliminare la carica batterica veicolata dall'entomofago, (che proviene dall'interno delle larve di *Galleria* che sono variamente colonizzate da microrganismi) evitando di aggiungere antimicrobici nella dieta che, come dimostrato da Singh e House (1970) per *Agria affinis*, potrebbero nuocere al parassitoide.

L'emolinfina usata per l'allevamento delle larvette neosgusciate è stata addizionata con solfato di gentamicina (0.01%).

Per ogni tesi sono state eseguite 3 ripetizioni con 35-40 individui ciascuna. Le L₁ (in tutto 306) provenienti dalla schiusa delle uova microtipiche sono state poste nei pozzetti dei contenitori in numero variabile da 2 a 15.

2) Substrati meridici

La sperimentazione è stata suddivisa in due parti. In ambedue sono state impiegate sia larve di prima che di seconda età.

Nella prima parte, utilizzando come substrato quello formulato da Nettles (1986) addizionato con 1.6% di tuorlo d'uovo e 2.6% di farina di soia, si sono messi a confronto, come supporto fisico, cotone ed agar (1.5%)⁽³⁾. Le due tesi sono state ripetute 4 volte con un numero di 15 individui per ciascuna ripetizione.

Nella seconda, sono stati effettuati dei saggi biologici su nove diete impiegando circa 15-20 larve di prima e seconda età per ognuna.

I parametri biologici rilevati sono stati le % di individui che hanno mutato nello stadio successivo e il relativo tempo impiegato.

Il riconoscimento dei vari stadi larvali è stato effettuato in base alla morfologia dell'apparato boccale e degli stigmi posteriori. È stata eseguita, dov'era possibile, l'analisi della varianza, trasformando i dati delle percentuali nell'arcoseno della radice quadrata, mentre per il confronto fra le medie si è adottato il test della minima differenza significativa.

RISULTATI E DISCUSSIONE

1) Substrati a base di emolinfina

In generale si può dire che il liquido nutritizio sperimentato rappresenta un ottimo substrato per le larve di prima età di *P. rufifrons*. Al pari di alcuni

⁽³⁾ L'agar, essendo una sostanza inerte non digeribile, potrebbe causare nel parassitoide, che non defeca se non al termine dello sviluppo larvale, ingrossamenti abnormi del mesentero provocandone la morte (Mellini, 1975; Yazlowetsky, 1989).

Imenotteri Terebranti, quali *Trichogramma pretiosum* Ril. e *Pteromalus puparum* L. (Hoffman *et al.*, 1975, Hoffman e Ignoffo, 1974), anche le larvette di questo Tachinide si nutrono *in vitro* di emolinfa che, pur essendo della stessa specie ospite, proviene da un diverso stadio ontogenetico rispetto a quello attaccato *in vivo*⁽⁴⁾.

Come si nota dalla tabella 2 l'aggiunta nella dieta dell'antibiotico è indispensabile anche se si dispone di un substrato completamente sterile. Infatti la percentuale di L₂, in presenza di solfato di gentamicina, si aggira sul 90% contro il 40%, mentre i tempi di sviluppo, calcolati dal momento in cui le L₁ vengono poste nella dieta, non differiscono statisticamente fra le due tesi. Considerando separatamente le L₁ che hanno subito il trattamento in formalina e quelle che non sono state trattate, il risultato si ripete (Tab. 3 e 4).

Il bagno in formalina non provoca un aumento significativo delle percentuali di L₂, 71.1% contro il 59.4% del testimone (Tab. 5), mettendo in evidenza che questa sostanza, rivelatasi efficace in altri casi (House, 1954; Nettles *et al.*, 1980), non è, con ogni probabilità, in grado di contenere adeguatamente la proliferazione batterica e quindi di ridurre la mortalità. L'unica soluzione possibile, qualora si utilizzino substrati derivati dall'ospite, rimane pertanto quella che prevede l'impiego di antibiotici da aggiungere nella dieta. D'altronde, come dimostrato per gli omogeneizzati di pupa di *G. mellonella* (Bratti e Monti, 1988), le concentrazioni saggiate pare non presentino alcun effetto negativo diretto sull'entomofago.

Le percentuali di L₃ non hanno superato in nessuna tesi il 5%. Il motivo di questo risultato decisamente modesto deriva dal fatto che le L₂ neomutate, avvertiti gli stigmi posteriori funzionanti, non riuscendo a respirare, in quanto sommerse nel liquido, nel giro di alcuni giorni morivano. Infatti, come dimostrato da Ziser e Nettles (1979) per *Eucelatoria bryani*, alcuni Tachinidi presentano un tasso respiratorio molto elevato e di solito, dopo il primo stadio, necessitano di

Tab. 2 - Effetto del solfato di gentamicina (s.d.g.), addizionato in emolinfa di crisalide di *G. mellonella*, sullo sviluppo delle larve di I età di *P. rufifrons*. (Media; P < 0.05).

Tesi	% L2	Tempo di svil. (gg.)	% L3*	Tempo di svil. (gg.)
Senza s.d.g.	40.3 a	3.2 ± 0.6 a	3.0	6.00
Con s.d.g.	90.3 b	3.1 ± 0.2 a	1.1	8.00

* Dati ottenuti da una singola ripetizione.

⁽⁴⁾ Il parassitoide, infatti, come larva di I età attacca le larve dell'ospite, nelle quali la composizione chimico-fisica dell'emolinfa è assai differente rispetto alla crisalide, soprattutto per quanto riguarda la quantità di proteine ed aminoacidi (Florkin e Jeuniaux, 1974).

Tab. 3 - Effetto del solfato di gentamicina (s.d.g.), addizionato in emolinfa di crisalide di *G. mellonella*, sullo sviluppo delle larve di I età di *P. rufifrons*, trattate con formalina. (Media; P < 0.05).

Tesi	% L2	Tempo di svil. (gg.)	% L3*	Tempo di svil. (gg.)
Senza s.d.g.	47.9 a	2.9 ± 0.3 a	3.7	6.00
Con s.d.g.	94.3 b	3.2 ± 0.3 a	1.4	6.00

* Dati ottenuti da una singola ripetizione.

Tab. 4 - Effetto del solfato di gentamicina (s.d.g.), addizionato in emolinfa di crisalide di *G. mellonella*, sullo sviluppo delle larve di I età di *P. rufifrons*, non trattate con formalina. (Media; P < 0.05).

Tesi	% L2	Tempo di svil. (gg.)	% L3*	Tempo di svil. (gg.)
Senza s.d.g.	32.7 a	3.6 ± 1.3 a	2.4	6.00
Con s.d.g.	86.2 b	2.8 ± 0.4 a	0.7	10.00

* Dati ottenuti da una singola ripetizione.

ossigeno direttamente dall'atmosfera che ottengono o inducendo la formazione di imbuti respiratori o esibendo una connessione diretta con l'apparato tracheale dell'ospite (Mellini, 1964; Keilin, 1944).

All'interno dei singoli pozzetti, in alcuni casi, sono state poste più di una larvetta; orbene non si è mai assistito a fenomeni di cannibalismo che invece si sono manifestati sporadicamente dopo la prima muta. Questo fenomeno rispecchia sostanzialmente il comportamento che il parassitoide presenta *in vivo*⁽⁵⁾, per

Tab. 5 - Effetto del trattamento in formalina sullo sviluppo delle larve di I età di *P. rufifrons* in emolinfa di crisalide di *G. mellonella*. (Media; P < 0.05).

Tesi	% L2	Tempo di svil. (gg.)	% L3*	Tempo di svil. (gg.)
Senza Tratt.	59.4 a	3.3 ± 0.6 a	1.6	6.00
Con Tratt.	71.1 a	3.0 ± 0.3 a	2.5	8.00

* Dati ottenuti da una singola ripetizione.

(5) In alcuni casi le L₂ neomutate all'interno della crisalide ospite si combattono a colpi di uncino boccale fino alla sopravvivenza di un unico individuo che poi completerà lo sviluppo.

cui in una prospettiva di allevamento massale risulta essere indispensabile isolare il materiale biologico adottando appositi contenitori.

Delle 306 L₁ provenienti direttamente dalla schiusa delle uova microtipiche, 94 sono cresciute però soltanto 51 sono arrivate in prossimità della muta e solo 5 sono mutate impiegando circa 10-11 giorni.

Lo scarso numero di L₂ ottenute potrebbe essere la conseguenza di due fenomeni che avrebbero potuto agire anche contemporaneamente:

a) la proliferazione di colonie batteriche che, in alcuni pozzetti, si è manifestata con la comparsa di macchie lattescenti provocando effetti negativi sulla crescita dell'entomofago;

b) la necessità per le L₁ di alimentarsi, anche per un periodo breve, all'interno dell'ospite vivo.

Quest'ultimo fenomeno era già stato messo in evidenza sia da Bratti e Monti (1988) per *P. rufifrons* che da Nettles *et al.* (1980) per *E. bryani*.

2) Substrati meridici

Dai risultati emerge chiaramente che la dieta di Nettles (1986) è insoddisfacente per la crescita e lo sviluppo di *P. rufifrons*. Le L₁ messe in coltura, pur sopravvivendo per alcuni giorni e aumentando di dimensioni, non sono, se non in pochissimi casi, in grado di mutare nello stadio successivo. Il fenomeno si è manifestato anche in quei substrati in cui è stato addizionato l'omogeneizzato dell'ospite (al 5 e 10%). D'altro canto Fanti (1990) aveva dimostrato che senza la somministrazione di ecdisone nelle diete di questo tipo, le L₁ di *P. rufifrons* non mutavano.

Per quanto riguarda le L₂ si nota dalla tabella 6 che non esistono differenze significative fra l'utilizzo di agar o cotone come supporto fisico. Nessun adulto è sfarfallato e solo in un caso si è riscontrata la formazione dell'immagine all'interno di un pupario. Percentuali così basse di L₃ e di pupe indicano chiaramente l'inadeguatezza della dieta dal punto di vista nutrizionale, che si manifesta, tra l'altro, anche nei tempi di sviluppo che sono molto più lunghi rispetto a quelli degli individui allevati su *Galleria* (da L₂ a L₃, 10-11 giorni contro 4-5).

L'aggiunta di sostanze ad alto contenuto proteico, alla base olidica precedente, non ha migliorato sostanzialmente i risultati (Tab. 7) a differenza di quanto riscontrato per un altro Tachinide, *Lixophaga diatreae*, per il quale soia,

Tab. 6 - Confronto fra agar e cotone per le L₂ di *P. rufifrons* su dieta olidica di Nettles (1986) addizionata con soia (2.6%) e tuorlo d'uovo (1.6%). (Media; P < 0.05).

Tesi	% L ₃	Tempo di svil. (gg.)	% Pupe	Tempo di svil. (gg.)
Agar (1.5%)	32.6 a	11.1 ± 2.1 a	7.85 a	5.35 ± 0.4 a
Cotone	24.15 a	10.1 ± 0.3 a	13.7 a	9.0 ± 3.0 a

Tab. 7 - Diete meridiche sperimentate per le L₂ di *P. rufifrons*.

Descrizione delle diete	Risultati			
	L3	Tempo di sviluppo (gg.)	Pupe	Tempo di sviluppo (gg.)
Dieta olidica di Nettles (1986), con cotone	0/20 0.0%	/	/	/
Dieta olidica di Nettles (1986), tuorlo d'uovo (1.6%), 5% omogeneizzato di crisalide e 2.6% di soia, con cotone	2/10 20.0%	13	/	/
Dieta olidica di Nettles (1986), tuorlo d'uovo (1.6%), 5% omogeneizzato di crisalide e 2.6% soia, con agar (1.5%)	3/10 30.0%	7.3	/	/
Dieta olidica di Nettles (1986), tuorlo d'uovo (1.6%), 10% omogeneizzato di crisalide e 2.6% soia, con cotone	2/10 20.0%	8	/	/
Dieta olidica di Nettles (1986), tuorlo d'uovo (1.6%), 10%, omogeneizzato di crisalide e 2.6% di soia, con cotone	1/10 10.0%	14	/	/
Dieta olidica di Nettles (1986), tuorlo d'uovo (1.6%), 2.6% soia, con agar (0.75%)	2/20 10.0%	10	/	/
Dieta olidica di Nettles (1986), tuorlo d'uovo (1.0%), caseina (0.3%), estr. di carne (1%), con agar (1%)	1/17 5.9%	18	/	/
Dieta olidica di Nettles (1986), soia (0.6%), caseina (0.3%), gelatina di pollo (1%), con agar (1%)	6/16 37.5%	17	1/16 5.8%	8
Dieta olidica di Nettles (1986), soia (1,3%), caseina (0.08%), gelatina (1%), estr. di carne (2%), con agar (1%)	0/20	/	/	/

idrolizzato di albumina e caseina si sono rivelati indispensabili per il suo sviluppo (Grenier *et al.*, 1978).

È comunque importante far notare che la dieta di Nettles (1986) ha manifestato la sua validità solo ed esclusivamente per Tachinidi che si sviluppano in

larve, i quali di solito presentano un ritmo di accrescimento molto più veloce e quindi un metabolismo diverso rispetto ai parassiti larva-pupali.

L'adozione di omogeneizzato di pupe di *G. mellonella*, stadio su cui nell'allevamento *in vivo* l'entomofago si nutre, come elemento nutrizionale integrativo non ha apportato alcun beneficio alla crescita e allo sviluppo delle L₂.

In conclusione si può affermare che l'emolinfa di crisalide di *G. mellonella* può costituire un ottimo substrato per le larvette di prima età di *P. rufifrons*. Il vantaggio di utilizzare questo liquido al posto dell'omogeneizzato completo è soprattutto di ordine pratico, in quanto il primo, oltre ad essere sterilizzabile, consente, grazie alla sua trasparenza, un'osservazione diretta del comportamento dell'entomofago. Esso inoltre, somministrato a bassissime dosi (20-30 µl larva), è in grado di sopportare lo sviluppo completo delle L₁.

Per quanto riguarda le diete meridiche, dalle indicazioni della sperimentazione emerge l'esigenza di studiare in modo più approfondito le richieste nutrizionali del parassitoide dalla seconda età in poi. Risulta quindi importante lo studio della composizione chimica dell'ospite su cui l'entomofago si sviluppa *in vivo*, oltre che quella del parassitoide stesso, ponendo particolare attenzione alla componente proteica e aminoacidica, per poter allestire nuove diete con caratteristiche più consone alle esigenze di questo Tachinide.

RIASSUNTO

La presente ricerca ha interessato l'allevamento degli stadi larvali di *Pseudogonia rufifrons* Wied. (Diptera: Tachinidae) su diete artificiali a base di emolinfa e meridiche.

Nella prima parte, oltre a verificare se l'estratto dell'omogeneizzato delle pupe di *Galleria mellonella* L. era idoneo per lo sviluppo delle larve di prima età, sono state eseguite alcune prove per limitare la contaminazione batterica nei substrati. L'unico trattamento che ha dato risultati soddisfacenti è stato l'aggiunta di solfato di gentamicina al liquido emolinfatico (0.01%), mentre né la sola filtro-sterilizzazione della dieta né il trattamento con formalina del materiale biologico hanno sortito risultati positivi.

Sempre su tale dieta sono state poste direttamente delle larvette neogusciate da uova microtiche dissezionate da una femmina del Dittero: solo una piccolissima parte (5/306) sono mutate nello stadio successivo. I motivi di percentuali così basse vanno probabilmente ricercati nella forte contaminazione microbica che deriva dalla presenza nel liquido nutritivo di uova rimaste dalle operazioni di trasferimento, che veicolano numerosi batteri.

Nella seconda parte del lavoro sono state sperimentate per larve di prima e di seconda età nove substrati meridici basati, come composizione chimica, sulla dieta formulata da Nettles (1986) per *Eucelatoria bryani* Sab. Pur aggiungendo materiale proteico sottoforma di farina di soia, gelatina, caseina ed estratto di carne i risultati si sono limitati alla formazione di alcune pupe, derivate dalla crescita e dallo sviluppo delle L₂.

In conclusione si può affermare che l'emolinfa di crisalide di *Galleria mellonella* costituisce un ottimo substrato per le larve di prima età di *Pseudogonia rufifrons*. Invece, per quanto riguarda le diete meridiche, dalla sperimentazione emerge l'esigenza di studiare in modo più approfondito le richieste nutrizionali del parassitoide dalla seconda età in poi. Infatti la dieta di Nettles, pur essendosi dimostrata valida per alcune specie di Ditteri Tachinidi a sviluppo larvale, non pare costituire un substrato adeguato per questo parassitoide larva-pupale obbligato.

In Vitro Rearing of *Pseudogonia rufifrons* Wied. (Diptera: Tachinidae) on Pupal Haemolymph of *Galleria mellonella* L. and on Meridic Diets.

SUMMARY

Haemolymph-based and meridic artificial diets were tested in the rearing *in vitro* of *Pseudogonia rufifrons* maggots.

The first part of the study assessed the suitability of the haemolymph of *Galleria mellonella* pupae for first-instar maggot development. We have also treated the maggots by a formalin solution and/or added gentamycin sulphate to the diet to prevent bacterial contamination of the media. The only treatment to perform satisfactorily was the addition of gentamycin sulphate to the haemolymph-liquid (0.01%). Neither filtersterilisation of the medium nor formalin treatment of the maggots proved effective. This diet was also tested on maggots newly hatched from microtype eggs of a dissected female parasitoid. Only a small fraction (5 of 306) moulted to the next stage. In all likelihood the explanation for this low performance rate is to be sought in the marked bacterial contamination caused by the eggs, remained from transfer operation, in the nutrient liquid.

The second part tested new meridic diets, based on Nettles's medium (1986), for first and second instar maggots. Despite the addition of protein in the form of soy flour, gelatin, casein and meat extract, only a few pupae from second instar maggots developed.

Haemolymph from *G. mellonella* pupae proved to be a good medium for first-instar maggots of *P. rufifrons*. The results registered by the meridic diets used in this trial indicate that further study of the parasitoid nutritional demands from second instar on is needed. Nettles's diet, despite its proving satisfactory in the larval development of several Diptera Tachinidae, appears to be inadequate for this larval-pupal parasitoid of the same family.

BIBLIOGRAFIA CITATA

- BOULETREAU M., 1968. - Premiers résultats de l'élevage des larves d'un Hyménoptère Chalcidien (*Pteromalus puparum* L.) sur hémolymph de Lépidoptère. - *Entomophaga*, 13: 217-222.
- BOULETREAU M., 1972. - Développement et croissance larvaires en conditions semi-artificielle et artificielles chez un Hyménoptère entomophage: *Pteromalus puparum* L. (Chalc.). - *Entomophaga*, 17: 265-273.
- BRATTI A., MONTI M., 1988. - Allevamento *in vitro* delle larve di *Pseudogonia rufifrons* Wied. (Dipt. Tachinidae) su omogeneizzato di crisalidi di *Galleria mellonella* L. (Lep. Galleridae). - *Boll. Ist. Entom. «Guido Grandi» Univ. Bologna*, 43: 115-126.
- BRATTI A., NETTLES W.C., 1988 - *In vitro* rearing of *Palexorista laxa* (Curran) (Diptera: Tachinidae) on haemolymph-based diets. *Boll. Ist. Entom. «Guido Grandi» Univ. Bologna*, 43: 25-30.
- FANTI P., 1990. - Fattori inducenti la prima muta larvale del parassitoide *Pseudogonia cinerascens* Wied. *in vitro*. - *Boll. Ist. Entom. «Guido Grandi» Univ. Bologna*, 45: (In corso di stampa).
- FLOKIN M., JEUNIAUX C., 1974. - Hemolymph: composition. - In: Rockstein M. - The physiology of insecta. Vol. 5, 2 ed., 255-307.
- GRENIER S., BONNOT G., DELOBEL B., LAVIOLETTE P., 1978. - Développement en milieu artificiel du parasitoide *Lixophaga diatreae* (Townsend) (Diptera, Tachinidae). Obtention de l'imago a partir de l'oeuf. - *C. R. Acad. Sc. Paris*, ser. D, 287: 535-538.
- GUAN X.-C., WU Z.-X., WU T.-N., FENG H., 1978. - Studies on rearing *Trichogramma dendroli-mi* Matsumura *in vitro*. - *Acta Ent. Sin.*, 21: 122.
- HOFFMAN J. D., IGNOFFO C.M., LONG S.H., 1973. - *In vitro* cultivation of an endoparasitic wasp, *Pteromalus puparum*. - *Ann. Ent. Soc. Am.*, 66: 633-634.
- HOFFMAN J.D., IGNOFFO C.M., 1974. - Growth of *Pteromalus puparum* in a semisynthetic medium. - *Ann. Ent. Soc. Am.*, 67: 524-525.

- HOFFMAN J.D., IGNOFFO C.M., DICKERSON W.A., 1975. - *In vitro* rearing of the endoparasitic wasp, *Trichogramma pretiosum*. - *Ann. Ent. Soc. Am.*, 68: 335-336.
- HOUSE H.L., 1954. - Nutritional studies with *Pseudosarcophaga affinis* (Fall.), a dipterous parasite of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Clem.). I. A chemically defined medium and aseptic culture technique. - *Can. J. Zool.*, 32: 331-341.
- KEILIN D., 1944. - Respiratory systems and respiratory adaptations in larvae and pupae of Diptera. - *Parasitology*, 36: 1-66.
- LU W.-G., LANG S., 1981. - *In vitro* rearing of *Dibrachys cavus* Walker. - *Nat. Enem. Insect*, 3: 23-25.
- MELLINI E., 1964. - L'imbuto respiratorio negli ospiti dei Ditteri Larvevoridi. - *Atti Acc. Naz. Ital. Entomol., Rendiconti*, 12: 47-62.
- MELLINI E., 1975. - Possibilità di allevamento di Insetti entomofagi parassiti su diete artificiali. - *Boll. Ist. Ent. Univ. Bologna*, 32: 257-290.
- MELLINI E., CAMPADELLI G., 1988. - Prove di incubazione extrauterina e di schiusa delle uova microtipiche di *Pseudogonia rufifrons* Wied. - *Boll. Ist. Ent. «G. Grandi» Univ. Bologna*, 43: 105-113.
- NETTLES W. C. JR., 1986. - Effects of soy flour, bovine serum albumin, and three amino acid mixtures on growth and development of *Eucelatoria bryani* (Diptera: Tachinidae) reared on artificial diets. - *Environ. Entomol.*, 15: 1111-1115.
- NETTLES W. C. JR., 1989. - *In vitro* rearing of parasitoids: role of host factors in nutrition. - *Arch. Insect Biochem. Physiol.* (in corso di stampa).
- NETTLES W. C. JR., 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.
- WU Z. X., QIN J., 1982. - Ovipositional response of *Trichogramma dendrolimi* to the chemical contents of artificial eggs. - *Acta Ent. Sin.*, 25: 363-372.
- SINGH P., HOUSE H. L., 1970. - Antimicrobial agents: their detrimental effects on size of an insect, *Agria affinis*. - *Can. Ent.*, 102: 1340-1344.
- 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 Ent. Sin.*, 22: 122-126.
- XIE Z. N., NETTLES W. C. JR., MORRISON R. K., IRIE K., VINSON S. B., 1986. - Effect of ovipositional stimulants and diets on the growth and development of *Trichogramma pretiosum in vitro*. - *Entomol. exp. appl.*, 42: 119-124.
- YAZLOVETSKY I. G., 1989 - Studies on the nutrition and digestion of entomophagous insects leading to the development of artificial diets. - (In corso di stampa).
- ZISER S. W., NETTLES W. C. JR., 1979. - The rate of oxygen consumption by *Eucelatoria* sp. in relation to larval development and temperature. - *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 72: 540-543.