

ALESSANDRO BRATTI

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

## Tecniche di allevamento *in vitro* per gli stadi larvali di insetti entomofagi parassitoidi<sup>(1)</sup>

### INDICE

1) INTRODUZIONE	pag.	170
2) STATO ATTUALE DELLE RICERCHE E RISULTATI FINORA CONSEGUITI NELL'ALLEVAMENTO «IN VITRO» DEGLI STADI LARVALI DI INSETTI ENTOMOFAGI PARASSITOIDI	»	171
2.1 Ditteri	»	172
2.2 Imenotteri	»	177
3) CLASSIFICAZIONE DELLE DIETE	»	180
4) LA DIETA E I PRINCIPALI MATERIALI NUTRIZIONALI	»	181
4.1 Costituenti azotati	»	183
4.2 Idrati di carbonio	»	187
4.3 Lipidi	»	188
4.4 Vitamine e altri fattori di crescita	»	191
4.5 Minerali	»	191
4.6 Altre sostanze	»	192
5) IL MATERIALE BIOLOGICO	»	196
5.1 Dissezione delle femmine prolificanti	»	196
5.2 Dissezione dell'ospite parassitizzato	»	197
5.3 Raccolta da ospite parassitizzato	»	199
5.4 Raccolta da «ospiti artificiali» non utilizzati per il successivo sviluppo dell'entomofago	»	199
5.5 Femmine prolificanti che depongono direttamente nella dieta	»	200
6) CONSISTENZA FISICA, PRESSIONE OSMOTICA, pH	»	201
6.1 Consistenza fisica	»	201
6.2 Pressione osmotica	»	202
6.3 pH	»	203
7) METODOLOGIE DI STERILIZZAZIONE DELLE DIETE E DISINFEZIONE DEL MATERIALE BIOLOGICO	»	204
8) TECNICHE DI PREPARAZIONE DELLE DIETE	»	208

---

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

8.1 Diete sub-naturali	»	208
8.2 Diete olidiche e meridiche	»	208
8.3 Diete oligidiche	»	209
9) SISTEMI DI ALLEVAMENTO	»	211
9.1 Ditteri	»	211
9.2 Imenotteri	»	212
10) RIASSUNTO	»	213
11) SUMMARY	»	214
12) BIBLIOGRAFIA CITATA	»	214

## 1. INTRODUZIONE

Il concetto di «Integrated Pest Management» è stato sviluppato in risposta alle necessità di ridurre l'uso dei pesticidi, utilizzando altre metodologie di lotta (Council on Environmental Quality, 1972; Djerassi *et al.*, 1974).

Uno dei più importanti metodi alternativi è senza dubbio costituito dall'impiego degli insetti entomofagi parassitoidi (De Bach, 1974; Huffaker, 1969).

Il loro uso, nelle tecniche di lotta biologica classica ed in programmi di lotta integrata, basato sull'introduzione di specie esotiche e sulla loro conservazione nell'ambiente, non sempre si è risolto in un adeguato controllo delle popolazioni dei fitofagi dannosi. Di conseguenza, negli ultimi anni, si sono ricercate nuove strategie imperniate sul rilascio periodico degli entomofagi e sulla «manipolazione» ambientale (Greany *et al.*, 1984; Nordlund *et al.*, 1981; Nordlund, 1984; Ridgway e Vinson, 1977).

Come già evidenziato da Mellini (1975a), la possibilità di utilizzare grandi masse di ausiliari, da distribuire in campo, è legata al loro costo di produzione. Infatti, accanto al parassitoide o al predatore, è indispensabile allevare il suo ospite naturale (ovvero di sostituzione) o sulla pianta nutrice o su dieta artificiale. Questo comporta numerose difficoltà di ordine tecnico che si traducono in costi elevati e non competitivi con quelli relativi alla lotta chimica.

Una soluzione promettente per superare i problemi associati alla produzione *in vivo* è, almeno teoricamente, quella di allevare direttamente gli entomofagi su diete artificiali (Mellini, 1975a; Campadelli e Dindo, 1987; Nettles, 1989).

Le tecniche di coltura *in vitro*, una volta perfezionate, offrono un'alternativa semplificata per i programmi di produzione massale. Inoltre, come indicato da Thompson (1986b), esse permettono di utilizzare l'insetto per studi fondamentali sulla nutrizione e biochimica generale. Greany *et al.* (1984) hanno sottolineato alcuni dei benefici di queste tecniche, che costituirebbero uno strumento per lo studio dell'influenza della dieta e del patrimonio ereditario su diverse caratteristiche biologiche, quali il vigore del parassitoide, la sua fecondità, la sua selettività nonché l'efficienza di ricerca dell'ospite. Di importanza critica, per l'utilizzo ed il perfezionamento dell'allevamento *in vitro*, è la conoscenza dei rapporti fisiologici intercorrenti fra ospite e parassita volta in particolare ad accertare le esigenze fisiologiche di quest'ultimo (Grenier, 1986). Sia Mellini (1975b; 1983) che Lawrence (1986) hanno messo in evidenza il ruolo fondamentale svolto dal

sistema endocrino dell'ospite per la crescita e lo sviluppo del suo simbiote, mentre Greany (1986) ha sottolineato l'importanza dell'«integrazione fisiologica», con particolare riguardo agli Imenotteri endoparassiti.

In ogni caso, almeno in via teorica, non è detto che gli entomofagi che presentano complicati rapporti fisiologici con l'ospite siano più difficili di altri da allevare su dieta artificiale. Infatti tali rapporti spesso non soddisfano particolari esigenze di natura trofica, ma rappresentano soltanto un adattamento all'ambiente vivente dettato dall'ospite stesso (Mellini, 1975a).

Per quanto riguarda le esigenze nutrizionali sia House (1966a) che Thompson (1981a) sostengono che le richieste dei parassitoidi non differiscono qualitativamente da quelle degli altri Esapodi aventi vari regimi dietetici. Tuttavia, la scarsa crescita di numerose specie su ricche diete, contenenti la maggior parte delle sostanze chimiche essenziali per gli insetti, suggerisce l'esistenza di particolari metaboliti, definiti «host factors», presenti nell'ospite ma non nel substrato, che sarebbero responsabili della crescita e dello sviluppo dell'entomofago<sup>(2)</sup>.

Yazlovetsky (1989), sottolineando le peculiarità di alcune caratteristiche biologiche degli entomofagi che li rendono particolarmente ostici per l'allevamento su substrati di sintesi, pone l'attenzione sul fatto che tutti gli endoparassitoidi presentano gli stadi larvali non defecanti durante l'accrescimento. Questo significa che essi devono ottenere il massimo, riguardo alla forma disponibile e alla concentrazione, da tutti gli elementi nutrizionali necessari per lo sviluppo, con il minimo quantitativo di materiali non digeribili. Di conseguenza, la ricerca di nutrienti a buon mercato e lo studio della loro composizione chimica, per capire quanto le diverse specie riescano a digerirli, è fondamentale.

Il lavoro consta di due parti: la prima comprende una revisione bibliografica sullo stato attuale delle ricerche e sui risultati finora conseguiti per Ditteri ed Imenotteri parassitoidi, mentre la seconda riguarda le tecniche di allevamento *in vitro* che sono state adottate dai vari Autori.

## 2. STATO ATTUALE DELLE RICERCHE E RISULTATI FINORA CONSEGUITI NELL'ALLEVAMENTO *IN VITRO* DEGLI STADI LARVALI DI INSETTI ENTOMOFAGI PARASSITOIDI

Anche se la conoscenza sulla fisiologia e biochimica dei parassitoidi è ancora molto limitata importanti successi sono stati conseguiti in questo settore. Al-

---

(<sup>2</sup>) Queste sostanze non appartengono ad un gruppo chimico ben definito, ma rappresentano un prodotto metabolico dell'ospite indispensabile per lo sviluppo del parassitoide. Gli aminoacidi liberi, ed in particolare l'asparagina, fanno parte di questa categoria per le larve di *Eucelatoria bryani* Sab., in quanto la loro assenza nella dieta provoca la morte e/o la crescita stentata anche in presenza di abbondante materiale proteico (Nettles *et al.*, 1980; Nettles, 1986ab). Irie *et al.* (1987) indicano per *Trichogramma pretiosum* Ril. un metabolita, presente nell'emolinfa di *Manduca sexta* L., di peso molecolare inferiore a 1000, responsabile dell'impupamento. Gli stessi ormoni possono rientrare in questa definizione poichè, come dimostrato da Fanti (1990), opportunamente addizionati ad una dieta meridica sono in grado di provocare la prima muta delle larve di *Pseudogonia rufifrons* Wied.

meno 37 specie, appartenenti a due ordini (Ditteri ed Imenotteri), sono state allevate su diete diverse e con vario grado di successo, di cui ben 25 fino allo stadio adulto (Tabella 1).

## 2.1 Ditteri

I primi studi, riguardo l'allevamento di questi parassitoidi, sono stati eseguiti su substrati estremamente grezzi costituiti da farina di pesce e fegato di maiale. Un esempio è dato dal Sarcofagide *Agria affinis* (Fallén) parassitoide di *Choristoneura fumiferana* (Clem.) che, per molte generazioni, è stato mantenuto su un substrato di questo tipo (House e Traer, 1948). Smith (1958) ha allevato *Sarcophaga kellyi* Ald. per 40 generazioni su una dieta composta da una miscela di latte in polvere, polvere d'uovo e lievito, il tutto umidificato per formare una poltiglia.

La prima vera dieta chimicamente definita è stata quella formulata da House (1954a) per *A. affinis*. Essa era composta da 19 aminoacidi, acido ribonucleico, destroso, sali inorganici, vitamine del complesso B, colina ed inositolo. A queste sostanze è stato addizionato agar per solidificare la dieta e consentire così alle larve un'adeguata respirazione. In questo modo l'Autore ha ottenuto una resa in adulti del 32%. Egli, in seguito, ha approfondito notevolmente lo studio delle esigenze nutrizionali del Sarcofagide puntualizzando l'importanza del rapporto quantitativo fra i diversi elementi (1966b; 1969; 1972a).

A differenza dei Sarcofagidi, altri Ditteri parassitoidi hanno mostrato maggiori difficoltà a crescere e svilupparsi fuori dall'ambiente vivente. Molte di queste specie, appartenenti alla famiglia dei Tachinidi, presentano specializzati adattamenti anatomici e fisiologici quali, per citarne alcuni, la localizzazione delle larvette in organi particolari, la costruzione di imbuti respiratori, la dipendenza dagli ormoni dell'ospite. Ad esempio, alcune specie manifestano un tasso respiratorio molto elevato (Ziser e Nettles, 1979) e già dai primi stadi larvali tendono a stabilire una diretta connessione con l'apparato tracheale dell'ospite (Fisher, 1971; Keilin, 1944; Mellini, 1964). Queste considerazioni sul sistema respiratorio sono state di estrema importanza per lo sviluppo *in vitro* delle larve di *E. bryani* (Nettles *et al.*, 1980). Infatti, inizialmente, le larve di I età, provenienti dalla dissezione dell'ospite *Heliothis virescens* (F.), sono state poste su dieta liquida per poi, dopo 24 ore, essere trasferite sul medesimo pabulum agarizzato, permettendo così alle larve di II età una diretta esposizione all'ossigeno atmosferico. In seguito, per avviare alle operazioni di trasferimento, la dieta, una volta versata negli appositi contenitori, è stata preconditionata per 24 ore ad un U.R. del 50%. Poi collocatevi le larvette, mediante un liquido nutritizio di trasporto, la dieta (nei relativi recipienti) è stata posta in un ambiente ad U.R. del 90%. Impiegando questa tecnica la parte liquida veniva gradatamente assorbita, consentendo alle LII neomutate di respirare. Il substrato, di tipo meridico, era composto da una miscela di acidi organici, aminoacidi, basi azotate, vitamina E e del gruppo B, fosfolipidi e derivati oltre che ATP, idrolizzato di albumina del latte, albumina, bactopectone, lievito, colesterolo, trioleina, glucosio e trealosio.

Tab. 1 - Parassitoidi allevati sopra diete artificiali

TAXA	STADIO ATTACCATO	TIPO DI DIETA	PROVENIENZA UOVA O LARVE	SVILUPPO	AUTORE
DIPTERA					
Sarcophagidae					
<i>Agria affinis</i> (Fallen)	Lep. pupe	Oligidico	Dissezione da femmine del parass.	Molte generazioni	House e Traer, 1948
<i>Agria affinis</i> (Fallen)	Lep. pupe	Meridico	Dissezione da femmine del parass.	Da LI ad adulto fecondo	House, 1954
<i>Sarcophaga</i> <i>cimbicis</i> (Ins.)	Im. pupe	Oligidico	-	Da LI ad adulto	Shannon, 1923
<i>Sarcophaga kellyi</i> (Ald.)	Ort. ninfe ed adulti	Oligidico	-	40 generazioni	Smith, 1958
<i>Sarcophaga</i> <i>aldrichi</i> (Park.)	Lep. pupe	Oligidico	Larvideposizione su dieta	Molte generazioni	Arthur e Coppel, 1953
<i>Sarcophaga</i> <i>sarracenioides</i> (Ald.)	Im. pupe	Oligidico	-	Da LI ad adulto	Shannon, 1923
TACHINIDAE					
<i>Pseudogonia</i> <i>rufifrons</i> Wied.	Lep. larve	Sub-naturale	Dissezione da <i>G.</i> <i>mellonella</i>	Da LI ad adulto	Bratti e Monti, 1988
<i>Pseudogonia</i> <i>rufifrons</i> Wied.	Lep. larve	Sub-naturale	Dissezione da <i>G.</i> <i>mellonella</i>	Da LII ad adulto	Baronio e Schnal, 1980
<i>Pseudogonia</i> <i>rufifrons</i> Wied.	Lep. larve	Meridico	Dissezione da <i>G.</i> <i>mellonella</i>	Da LII a pupa	Bratti, 1989
<i>Parasetigena agilis</i> (Rob. - Desv.)	Lep. larve e pupe	Meridico Oligidico	-	Leggera crescita delle LI	Prell, 1915
<i>Palexorista lava</i> (Curran)	Lep. larve	Subnaturale Oligidico	Dissezione da <i>H. zea</i>	Da LI a pupa ed adulto	Bratti e Nettles, 1988
<i>Palexorista lava</i> (Curran)	Lep. larve	Meridico	Dissezione da <i>H. zea</i>	Da LI ad adulto	Nettles (N.P)
<i>Pseudoperichaeta</i> <i>nigrolineata</i> (Walker)	Lep. larve	Meridico	Dissezione da femmine parass.	Da LI a LIII	Bonnot <i>et al.</i> , 1984
<i>Lixophaga diatreae</i> (Town.)	Lep. larve	Meridico	Dissezione da femmine parass.	Da embrione e LI ad adulto	Grenier <i>et</i> <i>al.</i> , 1978 Grenier, 1979
<i>Phryxe caudata</i> (Rond.)	Lep. larve	Meridico	Dissezione da femmine parass.	Da embrione e LI a LIII	Grenier <i>et</i> <i>al.</i> , 1974, 1975 Grenier, 1979

segue Tab. 1 - Parassitoidi allevati sopra diete artificiali

TAXA	STADIO ATTACCATO	TIPO DI DIETA	PROVENIENZA UOVA O LARVE	SVILUPPO	AUTORE
<i>Eucelatoria bryani</i> Sab.	Lep. larve	Meridico	Dissezione da <i>H. virescens</i>	Da LI ad adulto fecondo	Nettles <i>et al.</i> , 1980 Nettles, 1986
<i>Lydella thompsoni</i> Hert.	Lep. larve	Meridico	Dissezione da <i>O. nubilalis</i>	Da LII ad adulto	Bratti, 1989
<i>Archytas marmoratus</i> (Town.)	Lep. larve	Meridico	Dissezione da <i>H. zea</i>	Da LII a pupa	Bratti, (N.P)
HYMENOPTERA					
Ichneumonidae					
<i>Campoletis distincta</i>	Lep. larve	Oligidico	—	Da uovo a pupa	Vanderzant (cfr. Thompson, 1981)
<i>Exeristes roborator</i> (Fabr.)	Lep. larve	Meridico Oligidico	Uova raccolte su <i>Pectinophora gossypiella</i>	Da uovo ad adulto fecondo	Thompson, 1975, 1976
<i>Itoplectis conquisitor</i> (Say)	Lep. pupe	Meridico	Dissezione da <i>G. mellonella</i>	Da uovo ad adulto	Yazgan e House, 1970
<i>Itoplectis conquisitor</i> (Say)	Lep. pupe	Meridico Oligidico	Dissezione da <i>G. mellonella</i>	Da uovo ad adulto	Yazgan, 1972
<i>Itoplectis conquisitor</i> (Say)	Lep. pupe	Meridico	Ovideposizione diretta nella dieta	Da uovo ad adulto	House, 1978
<i>Pimpla turionellae</i> (L.)	Lep. pupe	Oligidico	Dissezione da <i>G. mellonella</i>	Da uovo ad adulto	Bronskill. e House, 1957
<i>Pimpla turionellae</i> (L.)	Lep. pupe	Meridico	Dissezione da <i>G. mellonella</i>	Da uovo ad adulto	Yazgan, 1981
<i>Pimpla instigator</i> F.	Lep. pupe	Subnaturale	Ovideposizione in capsule artificiali	Da uovo ad adulto	Awuitor <i>et al.</i> , 1984
Braconidae					
<i>Cotesia marginiventris</i> (Cress.)	Lep. larve	Oligidico Meridico	Dissezione da <i>H. zea</i>	Da uovo a LI	Greany, 1980, 1981, 1986
<i>Lysiphlebus fabarum</i> (Marshall)	Af. adulti	Oligidico Meridico	Dissezione da <i>Aphis fabae</i>	Da LI ad adulto	Rotundo <i>et al.</i> , 1988
<i>Microplitis croceipes</i> (Cress.)	Lep. larve	Oligidico Meridico	Dissezione da <i>H. zea</i>	Da uovo a LI matura	Greany, 1986

segue Tab. 1 - Parassitoidi allevati sopra diete artificiali

TAXA	STADIO ATTACCATO	TIPO DI DIETA	PROVENIENZA UOVA O LARVE	SVILUPPO	AUTORE
<i>Bracon hebetor</i> (Say)	Lep. larve	Oligidico	Uova raccolte su <i>G. mellonella</i>	Da uovo ad adulto	Xie <i>et al.</i> , 1988
<i>Dibrachys cavus</i> Walk.	Lep. larve	Subnaturale Oligidico	Dissezione da <i>P. gossypiella</i>	Da uovo ad adulto	Lu e Lang, 1981
Calcidae					
<i>Brachymeria</i> <i>intermedia</i> (Nees)	Lep. pupe	Meridico	Dissezione da <i>G. mellonella</i>	Da uovo a larva di ultima età	Thompson, 1980
<i>B. lasus</i> (Walk.)	Lep. pupe	Meridico	Dissezione da <i>G. mellonella</i>	Da uovo ad adulto	Thompson, 1981, 1983
<i>B. ovata</i> (Say)	Lep. pupe	Meridico	Dissezione da <i>G. mellonella</i>	Da uovo a larva di ultima età	Thompson, 1981
Encirtidae					
<i>Ageniaspis</i> <i>fuscicollis</i> Dalm.	Lep. uova e larve	Meridico	Dissezione da <i>Hyponomeuta</i> spp.	Da uovo a LIII	Nenon, 1972
Pteromalidae					
<i>Pachycrepoides</i> <i>vindemiae</i> Rond.	Dit. pupe	Meridico	—	Da uovo ad adulto	Thompson <i>et</i> <i>al.</i> , 1983
<i>Pteromalus</i> <i>puparum</i> L.	Lep. pupe	Subnaturale	Dissezione da <i>Pieris brassicae</i>	Da uovo a pupa	Bouletrau, 1968
<i>Pteromalus</i> <i>puparum</i> L.	Lep. pupe	Subnaturale	Dissezione da <i>Pieris brassicae</i>	Da uovo ad adulto	Bouletrau, 1972
<i>Pteromalus</i> <i>puparum</i> L.	Lep. pupe	Subnaturale	Dissezione da <i>Pieris rapae</i>	Da uovo ad adulto fecondo	Hoffman <i>et</i> <i>al.</i> , 1973
<i>Pteromalus</i> <i>puparum</i> L.	Lep. pupe	Oligidico	Dissezione da <i>Pieris rapae</i>	Da uovo ad adulto fecondo	Hoffman e Ignoffo, 1974
Scelionidae					
<i>Telemomus</i> <i>helioidis</i> Ashm.	Lep. uova	Oligidico	Dissezione da <i>H. virescens</i>	Da uovo ad adulto	Strand <i>et al.</i> , 1988
Tetrastichidae					
<i>Tetrastichus</i> <i>schoenobii</i> Ferr.	Lep. uova	Oligidico	Dissezione da femmine del parassitoide	Da uovo ad adulto fecondo	Ding <i>et al.</i> , 1980
Trichogrammatidae					
<i>Trichogramma</i> <i>californicum</i> Nagar e Nagar	Lep. uova	Oligidico	Ovideposizione in uova artificiali	Da uovo a LIII	Rajendram, 1978

segue Tab. 1 - Parassitoidi allevati sopra diete artificiali

TAXA	STADIO ATTACCATO	TIPO DI DIETA	PROVENIENZA UOVA O LARVE	SVILUPPO	AUTORE
<i>T. confusum</i> Viggiani	Lep. uova	Oligidico	Ovideposizione in uova artificiali	Da uovo ad adulto	Liu e Wu, 1982
<i>T. dendrolimi</i> Matsumara	Lep. uova	Oligidico	Ovideposizione in uova artificiali	Da uovo a prepupa	Quan <i>et al.</i> , 1978
<i>T. dendrolimi</i> Matsumara	Lep. uova	Oligidico	Ovideposizione in uova artificiali	Da uovo ad adulto	Liu <i>et al.</i> , 1979
<i>T. dendrolimi</i> Matsumara	Lep. uova	Oligidico	Ovideposizione in uova artificiali	Da uovo ad adulto	Coop. Res Group of Hub. Prov. China, 1979
<i>T. dendrolimi</i> Matsumara	Lep. uova	Oligidico	Ovideposizione in uova artificiali	Da uovo ad adulto	Wu <i>et al.</i> , 1979
<i>T. dendrolimi</i> Matsumara	Lep. uova	Oligidico	Ovideposizione in uova artificiali	35 generazioni	Gao <i>et al.</i> , 1979
<i>T. pretiosum</i> Ril.	Lep. uova	Subnaturale	Dissezione da <i>Trichoplusia ni</i>	Da uovo ad adulto fecondo	Hoffman <i>et</i> <i>al.</i> , 1975
<i>T. pretiosum</i> Ril.	Lep. uova	Oligidico	Ovideposizione in uova artificiali	Da uova ad adulto	Liu e Wu, 1982
<i>T. pretiosum</i> Ril.	Lep. uova	Oligidico	Dissezione da <i>H.</i> <i>virescens</i>	Da uova ad adulto fecondo	Strand e Vinson, 1985

Con le tecniche adottate sopra descritte, la resa in adulti è stata attorno al 13% con una sex ratio (femmina/maschio) 2:1, mentre il tempo di sviluppo risultava uguale a quello impiegato nell'ospite. Gli adulti, seppur fecondi, avevano dimensioni di circa 1/3 rispetto a quelli allevati *in vivo*.

Successivamente la dieta è stata migliorata aggiungendo farina di soia (Nettles, 1986b) e tuorlo d'uovo (Nettles, comunicazione personale) elevando la produzione di adulti attorno al 50%. Adottando una dieta molto simile lo stesso Autore ha conseguito rese in adulti attorno al 30% per *Palexorista laxa* (Curran). Per la medesima specie Bratti e Nettles, 1988 hanno ottenuto lo sviluppo da L1 ad adulto sopra un substrato composto dal residuo della lavorazione della soia ed emolinfa di larve di *Manduca sexta* L.

Altri Tachinidi sono stati allevati con un certo grado di successo. Lo sviluppo larvale di *Phryxe caudata* Rond. è stato raggiunto fino alla terza età su substrato liquido (Grenier *et al.*, 1974) e l'impiego dell'agar, come gelificante, non ha migliorato i risultati (Grenier *et al.*, 1975). Grenier *et al.* (1978)

hanno descritto e perfezionato le tecniche di allevamento *in vitro* che hanno permesso di ottenere lo sviluppo da larve di I età fino allo stadio adulto di *Lixophaga diatreae* (Town.).

La composizione della dieta meridica comprendeva acidi organici, aminoacidi, vitamine liposolubili (A, E) e vitamine del gruppo B, gelatina, idrolizzato di albumina di uovo, albumina del latte, proteine della soia e caseina, ATP, lecitine e colesterolo.

Gli adulti fecondi hanno fornito una progenie in grado di svilupparsi normalmente nell'ospite di sostituzione *Galleria mellonella* L. Sempre Grenier (1979), utilizzando come base lo stesso substrato, ha effettuato alcune importanti sperimentazioni riguardo allo sviluppo embrionale sia di *P. caudata* che *L. diatreae*. Gli uteri, previamente disinfettati, sono stati prelevati da femmine feconde e posti sul pabulum agarizzato. La resa in larve è stata pari a quella che si è manifestata *in vivo* e molto più elevata di quella ottenuta dalla dieta liquida. Questo indicherebbe, secondo l'Autore, che le condizioni respiratorie sono critiche per il successo *in vitro* dell'embriogenesi di questi Tachinidi.

Bratti e Monti (1988) hanno allevato per la prima volta da  $L_1$  ad adulto il parassitoide larva-pupale obbligato *Pseudogonia rufifrons*. Il substrato era composto da un omogeneizzato di pupe dell'ospite di sostituzione *Galleria mellonella* addizionato con agar (1.0%) e solfato di gentamicina (0.006%). La resa in adulti è stata attorno al 3% mentre la percentuale di  $L_2$  ottenute si è aggirata attorno al 90%. Questo ultimo dato riconfermato da Bratti (1989), utilizzando come dieta un estratto liquido dell'omogeneizzato, indica come, anche per stadi larvali (quali la larva di prima età di *Pseudogonia*) a comportamento molto specializzato, sia possibile l'allevamento su diete artificiali.

## 2.2 Imenotteri

I primi tentativi per allevare un Imenottero parassitoide sono stati quelli di Simmonds (1944). Tre Ictoneumonidi ectoparassiti sono stati mantenuti su un substrato a base di carne cruda di bue e gelatina, ove sono cresciuti leggermente, senza però svilupparsi. Successivamente Bronskill e House (1957) sono riusciti ad allevare con successo *Pimpla turionellae* (L.) su un impasto costituito da fegato di maiale addizionato ad una soluzione salina allo 0.8%. Sulla dieta, previamente autoclavata e posta in provette sterili, sono state collocate le uova ottenute per dissezione dalle pupe dell'ospite. Il 7% delle uova si è sviluppato fino allo stadio adulto, contro il 50% circa ottenuto dall'ospite *G. mellonella*. La prima dieta olidica è stata quella descritta da Yazgan (1972) per *Itopectis conquisitor* (Say). La composizione è data da una miscela di aminoacidi, acidi grassi, vitamine del gruppo B, vitamine liposolubili e fattori di crescita lipogenetici oltre che glucosio ed Rna e ha consentito lo sviluppo da uovo ad adulto. Dal punto di vista fisico tutti gli ingredienti sono stati miscelati costituendo, insieme all'agar, una viscosa poltiglia. Approssimativamente il 75% delle larve è stato in grado di svilupparsi fino a dare gli adulti, in un tempo doppio rispetto a quello

impiegato nell'ospite. Thompson (1975) è riuscito ad allevare *Exeristes roborator* (Fabr.) su una dieta simile alla precedente ma non gelificata. Egli, al fine di garantire un sufficiente rifornimento di ossigeno, ha usato un supporto fisico costituito da Sephadex LH-20. Le dimensioni, la mortalità e il tempo di sviluppo sono risultate simili a quelle del parassitoide allevato su *Pectinophora gossypiella* Saund. Con la messa a punto di queste diete, Yazgan (1972) e Thompson (1976) hanno determinato molte delle esigenze nutrizionali di questi due parassitoidi.

Diete chimicamente definite sono state descritte da Thompson (1980; 1981b) per alcuni Calcidoidei appartenenti al genere *Brachymeria*. Il completo sviluppo di *Brachymeria lasus* (Walk.) è stato ottenuto su un substrato contenente albumina denaturata con procedimento fisico, aminoacidi, glucosio, vitamine del gruppo B, sali inorganici, fattori di crescita lipogenetici ed una emulsione (Intralipid) a base di olio di soia. Le larve, allevate individualmente, hanno impiegato circa un tempo doppio, rispetto a quelle sviluppatesi nell'ospite, per raggiungere lo stadio immaginale. La pressione osmotica si è rivelata un fattore critico. Infatti sia gli aminoacidi che i carboidrati hanno contribuito ad elevare la osmolalità. I valori riscontrati nella dieta erano compresi tra 550 e 750 mOs, di molto superiori a quelli nell'emolinfa e nei tessuti dell'ospite. Di conseguenza, l'intervallo osservato non rappresentava i valori ottimali di osmolalità, ma piuttosto il punto nel quale iniziavano gli effetti negativi della pressione osmotica, che superavano quelli positivi dovuti agli incrementi nutrizionali (Thompson, 1983).

Sopra una dieta simile a quella usata per *Brachymeria*, ma sostituendo gli aminoacidi con una miscela di corrispondenti poliaminoacidi (e quindi riducendo l'osmolalità), Thompson *et al.* 1983 hanno allevato da uovo ad adulto l'Imenottero *Pachycrepoideus vindemiae* Rond.

Bouletrau (1968; 1972) è riuscito ad allevare lo Pteromalide *Pteromalus puparum* L. in gocce sospese di emolinfa. Risultati simili sono stati riportati da Hoffman *et al.* (1973) e Hoffman e Ignoffo (1974), che hanno ottenuto parziale successo usando una dieta composta da idrolizzato di lievito, siero di feto bovino e soluzione nutritizia di Grace. Sempre su emolinfa Lu e Lang (1981) hanno allevato da uovo ad adulto *Dibrachys cavus* Walker, parassitoide di *P. gossipyella*.

Un'altro Braconide, l'ectoparassitoide *Habrobracon hebetor* (Say), è stato allevato con successo su una «larva artificiale», costituita da emolinfa di pupe di *Galleria mellonella*, tuorlo d'uovo e una sospensione di latte in polvere in varie percentuali, il tutto avvolto da una membrana di parafilm. La resa in adulti è stata attorno al 24% (Xie *et al.*, 1989).

Greany (1980; 1981) ha studiato lo sviluppo embrionale del Braconide endoparassita *Cotesia marginiventris* (Cress.) sopra un substrato costituito dal liquido di Grace, siero di feto bovino, albumina di siero bovino e uovo ultrafiltrato. Gli insetti sono stati allevati dalla fase di stria germinativa fino al completamento della prima muta larvale, ma solo in presenza di tessuto adiposo. Lo stesso Autore ha osservato che, la presenza di teratociti provocava *in vitro* la dissociazione del corpo adiposo. Queste cellule, secondo Vinson e Iwantsch (1980),

derivano dalla membrana embrionale del parassitoide e sono rilasciate all'interno dell'ospite quando l'uovo schiude. Risultati simili sono stati raggiunti per *Microplitis croceipes* (Cress.) (Greany, 1986). Il ruolo dei teratociti, per il successo dell'allevamento *in vitro*, è stato direttamente dimostrato da Strand *et al.* (1988) per *Telenomus heliothidis* Ashm. Lo sviluppo embrionale dell'oofago è stato raggiunto nel liquido di Hink TNH-FH addizionato con il 30% di emolinfa di *M. sexta*. Gli embrioni maturi sono stati poi trasferiti sopra una dieta contenente il 40% di emolinfa di *M. sexta* più tuorlo d'uovo, latte e trealoso. Delle larve in coltura il 42% si è sviluppato ad adulto. La presenza di teratociti non ha influenzato lo sviluppo fino al terzo stadio larvale, mentre la loro assenza ha condizionato notevolmente la resa in pupe riducendola considerevolmente. Di conseguenza, gli Autori hanno concluso che i teratociti possono avere una funzione ausiliaria per la nutrizione delle larve, disperdendo le particelle nel pabulum e rendendo così più solubili i materiali nutritivi. L'importanza di queste cellule, nelle relazioni fra ospite e parassita, è stata ribadita anche da Rotundo *et al.* (1988) per il Braconide endoparassitoide *Lysiphlebus fabarum* (Marshall), anche se gli adulti ottenuti *in vitro* si sono formati su substrati in cui i teratociti non erano presenti.

Ding *et al.* (1980) hanno conseguito buoni risultati allevando il Tetrastichidae oofago *Tetrastichus schoenobii* Ferr. sopra una dieta composta dal liquido nutritivo di Gardiner addizionato con tuorlo d'uovo, latte e emolinfa di *Antheraea pernyi* Suer. e *Attacus cynthia* Dru. Circa il 60% dei parassitoidi ha completato il proprio sviluppo dando adulti privi di difetti morfologici e fecondi.

L'allevamento *in vitro* di una specie di Trichogramma, il *T. pretiosum* Ril., è stato per la prima volta effettuato da Hoffman *et al.* (1975) seguendo gli sfortunati tentativi eseguiti da Rajendram (1978) con *T. californicum* Nagar. e Nagar. su liquido nutritivo di Grace incapsulato in gocce di paraffina. Lo sviluppo completo di *T. pretiosum* è stato raggiunto utilizzando pezzetti di carta da filtro imbevuti in emolinfa di *Heliothis zea* (Boddie). Tuttavia la maggior parte degli adulti non è riuscita ad espandere completamente le ali pur essendo in grado di accoppiarsi e deporre uova senza difficoltà. Più recentemente Strand e Vinson (1985) hanno ottenuto lo sviluppo completo di *T. pretiosum* su una dieta simile a quella usata da Thompson (1981b) per *B. lasus*, ma addizionando il 40% di emolinfa di *M. sexta*, indispensabile per l'impupamento. Xie *et al.* (1986a) hanno dimostrato che la presenza di emolinfa è necessaria per la formazione delle pupe ed inoltre essi hanno notato come «growth factors», presenti nel «succo» di uova di *M. sexta*, siano fondamentali per l'emergenza degli adulti. Successivamente Irie *et al.* (1987) hanno estratto queste sostanze dall'emolinfa mediante una soluzione di etanolo al 76%. Ulteriori purificazioni, utilizzando i tradizionali metodi cromatografici, hanno individuato la presenza di molecole con peso inferiore a 1000 responsabili dell'impupamento del parassitoide.

Guan *et al.* (1978) hanno allevato con successo la specie *T. dendrolimi* in gocce pendenti di emolinfa di *A. pernyi*. Sempre con lo stesso metodo ma con un substrato composto da emolinfa di *A. pernyi* e *A. cynthia* più tuorlo d'uovo, latte

bovino, acidi organici e siero porcino, Liu *et al.* (1979) hanno ottenuto buone percentuali di adulti. Successivamente, sempre per la stessa specie, Wu *et al.* (1980; 1982) e Wu e Qin (1982) hanno conseguito i primi adulti su un medium privo di componente emolinfatica e contenente tuorlo d'uovo, latte bovino, peptoni e una miscela di aminoacidi. Solo il 16% delle uova hanno completato lo sviluppo dando adulti poco vitali.

Liu e Wu (1982) hanno utilizzato una dieta composta da idrolizzato di lievito, siero di feto bovino, liquido di Grace, estratto di embrione di pollo, latte bovino e tuorlo d'uovo per *Trichogramma confusum* Vig., *T. pretiosum* e *T. dendrolimi* Mats. Gao *et al.*, (1982) hanno allevato continuamente 35 generazioni di quest'ultima specie con la tecnica della goccia sospesa.

Per finire è importante ricordare che numerosi studi sono stati effettuati per determinare gli effetti dell'aggiunta di sostanze ormonali sullo sviluppo dei parassitoidi *in vitro*. Tuttavia i risultati sono stati generalmente negativi ad esclusione per alcune specie.

Il Tachinide *Pseudogonia rufifrons*, il cui sviluppo *in vivo* è dominato dal sistema endocrino dell'ospite, muta dalla prima alla seconda età in percentuali molto elevate solo quando al substrato (composto dalla dieta di Nettles modificata) si aggiunge ecdisone (Fanti, 1990). Lo stesso ormone non ha manifestato alcun effetto per lo sviluppo di *Brachymeria intermedia* (Nees) (Thompson, 1980). Greany (1980; 1981) ha rilevato che il beta-ecdisona inibisce la schiusa delle uova di *Cotesia marginiventris* ma che l'alfa-ecdisona, beta-ecdisona e ormone giovanile non hanno nessun effetto sulla crescita larvale e lo sviluppo. Nenon (1972), invece, ha dimostrato che gli ormoni hanno una notevole importanza per la crescita *in vitro* del parassitoide Encirtide *Ageniaspis fuscicollis* Dalm. Le larve sono state mantenute su una dieta a base di estratto di embrione di pollo, siero equino e peptoni. L'ecdisona e l'ormone giovanile, inclusi nel medium separatamente, hanno effetti modesti, ma quando vengono utilizzati contemporaneamente danno risultati ottimi (100% larve di prima età che mutano nello stadio successivo).

### 3. CLASSIFICAZIONE DELLE DIETE

Numerosi termini sono stati usati per descrivere le diete per insetti, come ad esempio artificiale, sintetica, semi-sintetica, pura, definita, chimicamente definita etc. In generale, il termine artificiale si riferisce ad ogni tipo di dieta che non sia il cibo naturale per l'insetto su di essa allevato. Più precisamente, con il termine dieta artificiale, si intende un alimento non familiare che è stato formulato, sintetizzato, trattato e/o preparato dall'uomo, sul quale un insetto in cattività può svilupparsi più o meno completamente (Singh, 1977).

Dougherty (1959) ha proposto una terminologia basata sulla composizione e purezza degli ingredienti. Così ha denominato olidica quella dieta formata da materiali organici ed inorganici purificati, che presentano una struttura chimica completamente conosciuta prima della loro miscelazione; meridica, una dieta formata da

una base olidica con l'addizione di una o più sostanze di struttura o purezza incerta; oligidica, un substrato composto nella stragrande maggioranza da materiali grezzi di struttura chimica poco conosciuta.

La terminologia adottata da Dougherty è senza dubbio valida per gli insetti menanti vita libera ma, come riportato da Grenier (1986), pare troppo schematica qualora ci si riferisca a diete relative all'allevamento di entomofagi parassitoidi. Egli ha quindi proposto una nuova classificazione:

dieta sub-naturale — dieta costituita da preparati messi in opera in laboratorio, contenente essenzialmente materiale grezzo e poco modificato, sovente di origine simile a quello consumato naturalmente. Es. emolinfa diluita, omogeneizzati, etc.

dieta grezza con estratto di insetto — dieta che comporta almeno un componente di natura complessa e non chimicamente definita, con l'addizione di parti o estratti di insetto;

dieta grezza senza estratti di insetto — dieta composta da elementi di natura complessa e non chimicamente definiti addizionata sovente con sostanze di origine animale;

dieta definita — dieta costituita da una o più sostanze di composizione chimica conosciuta addizionata ad elementi di struttura e/o purezza incerta;

dieta definita chimicamente — dieta composta da elementi di cui è nota la loro struttura chimica.

In questa ricerca verrà adottata la classificazione di Dougherty, aggiungendo però una categoria, indicata anche da Grenier, denominata sub-naturale. Il motivo sta nel fatto che, mentre per i fitofagi questi substrati non rivestono alcuna importanza pratica, per gli entomofagi parassiti consentono di verificare la capacità che presentano le varie specie di crescere e svilupparsi fuori dall'ambiente vivente. In tabella 2 si riporta uno schema esemplificativo sugli scopi delle diete sopraesposte.

Una classificazione che sovente viene eseguita è quella basata sulla presenza o meno di microorganismi. Così si parla di condizioni axeniche, quando la specie allevata è l'unico organismo vivente del sistema; sinexenica quando due o più specie sono allevate insieme e xenica qualora, oltre la specie allevata, vi siano uno o più organismi non identificati.

Le parole axenico e asettico sono usate spesso come sinonimi ma, non necessariamente, implicano che si tratti di una dieta olidica. Tra l'altro il termine asettico, più propriamente, dovrebbe essere riservato alla condizione delle tecniche e significherebbe l'esclusione di microorganismi contaminanti dal campo di operazione.

#### 4. LE DIETE E I PRINCIPALI MATERIALI NUTRIZIONALI

Innanzitutto, è opportuno eseguire una distinzione tra «nutrizione» e «dieta». Secondo Singh (1977), nutrizione è lo studio delle necessità trofiche degli organismi (in questo caso insetti), mentre dietetica è lo studio della nutrizione

Tab. 2 - Classificazione e scopo delle diete artificiali per entomofagi parassitoidi

Tipo di dieta	Obiettivi
Subnaturale	a) Verifica delle capacità dei parassitoidi di crescere e svilupparsi fuori dall'ambiente vivente.
	b) Studi sul comportamento e sulla fisiologia dei parassitoidi.
Olidico	a) Studi sul comportamento e sulla fisiologia dei parassitoidi.
	b) Studi sulla nutrizione dei parassitoidi.
Meridico	a) Studi sul comportamento e sulla fisiologia dei parassitoidi.
	b) Studi sulla nutrizione dei parassitoidi.
	c) Allevamento massale dei parassitoidi.
Oligidico	a) Studi sul comportamento e sulla fisiologia dei parassitoidi.
	b) Allevamento massale dei parassitoidi

applicata. Le due materie sono strettamente correlate e, dove l'analisi permette di definire chimicamente il pabulum naturale, informazioni nutrizionali possono essere raccolte costituendo le basi per la formulazione di diete olidiche e meridiche. La conoscenza della nutrizione è importante, ma non necessaria, per lo sviluppo di pratiche diete artificiali.<sup>(3)</sup>

Le esigenze nutrizionali dei parassitoidi, dal punto di vista qualitativo, non differiscono da quelle degli insetti menanti vita libera. Sia House (1966a; 1969) che Thompson (1974; 1981a; 1986b) hanno formulato questo concetto sottolineando, tra l'altro, l'importanza fondamentale degli aspetti quantitativi e della proporzionalità fra i vari ingredienti.<sup>(4)</sup>

La composizione nutrizionale della dieta può essere formulata nei suoi ingredienti seguendo diversi approcci:

<sup>(3)</sup> In questa parte del lavoro si tratterà soprattutto di dietetica rimandando ai lavori di Dadd (1985), Friend (1968), House (1966a; 1972a; 1974) per gli aspetti nutrizionali in generale e a quelli di Grenier *et al.*, 1986), House (1977) e Thompson (1981a; 1986) per la nutrizione dei parassitoidi.

<sup>(4)</sup> House (1977) sostiene che uno sbilanciamento degli ingredienti nella dieta si traduce in una vera e propria deficienza nutrizionale. In effetti le ricerche eseguite su *A. affinis*, *I. conquisitor* ed *E. roborator* hanno mostrato che il grado di sviluppo dipende soprattutto dalla proporzionalità fra i vari nutrienti (House, 1966b; Thompson, 1976; Yazgan, 1972).

A) Metodo empirico basato su indagini bibliografiche.

B) Analisi chimica del cibo costituito dall'ospite o da parti di esso (ad es. analisi dello spettro degli aminoacidi o degli acidi grassi dell'emolinfa) in differenti regimi alimentari nonchè in periodi diversi della sua ontogenesi.

C) Analisi della composizione chimica del parassita e studio della variazione di essa in funzione del substrato.

D) Analisi dei meccanismi della digestione, quali lo studio delle peculiarità del canale alimentare, la conoscenza degli enzimi digestivi e l'analisi chimica degli eventuali secreti emessi dalla femmina prolificante (per Imenotteri Terebranti).

Le metodologie sopra indicate non si escludono l'un l'altra, anzi, spesso vengono adottate insieme come, ad esempio, per la dieta di *Phryxe caudata* e *Lixophaga diatreae* (Grenier *et al.*, 1974; 1975; 1978) e per quella di *Eucelatoria bryani* (Nettles *et al.*, 1980; Nettles, 1986b).

Le indagini eseguite da Yazlovetsky (1989) per *Trichogramma* spp. rappresentano uno degli approcci metodologici (D) più moderni. Dapprima, egli ha valutato le richieste in aminoacidi, polipeptidi, proteine e grassi effettuando uno studio sulla presenza quantitativa e qualitativa di questi composti nelle uova di alcune specie di Lepidotteri. Poi ha individuato, mediante uno studio elettroforetico, la presenza nel secreto delle femmine ovideponenti di enzimi idrolitici in grado di stimolare la produzione di molecole a basso peso molecolare da proteine, polisaccaridi etc. Infine, mediante lo studio degli enzimi proteolitici, ha determinato che nei primi due stadi larvali il parassitoide acquisisce una grande quantità di aminoacidi, peptidi e proteine che digerisce ed assimila solo durante il terzo stadio. Di conseguenza, il meccanismo della nutrizione larvale sarebbe il seguente. Le femmine prolificanti iniettano, assieme alle uova, una secrezione che provoca la morte dell'embrione dell'ospite e la lisi dei tessuti. Il *Trichogramma*, allo stato embrionale, inizia a consumare questi nutrienti a basso peso molecolare per gradiente osmotico per poi, nel corso del primo e secondo stadio larvale, cominciare a nutrirsi per mezzo delle mandibole. Infine quando il parassitoide si trova nell'ultima età, trovandosi tutto il contenuto dell'uovo dell'ospite nel canale alimentare, inizia il processo di digestione ed assimilazione.

#### 4.1 Costituenti azotati.

**Aminoacidi** — Generalmente le richieste in aminoacidi sono le stesse sia per gli insetti che per i vertebrati ed entrambi i gruppi non possono sintetizzare i 10 aminoacidi che sono indispensabili per il ratto (Dadd, 1985; Thompson, 1976).<sup>(5)</sup> La maggior parte degli studi sono stati indirizzati per determinare il

---

<sup>(5)</sup> Per un'ampia revisione sull'importanza degli aminoacidi per la nutrizione degli insetti vedasi Dadd (1985).

fabbisogno di queste sostanze su specie fitofaghe e poco si conosce circa le richieste dei parassitoidi. Le ricerche fino ad ora eseguite hanno interessato 4 Imenotteri: *Exeristes roborator*, *Brachymeria lasus*, *Brachymeria ovata* (Say) e *Pachycrepoideus vindemiae* (Thompson, 1974; 1976; 1981c); un Sarcofagide: *Agria affinis* (House, 1954c); due Tachinidi: *Eucelatoria bryani* (Nettles, 1986a; 1987) e *P. caudata* (Bonnot *et al.*, 1976).

Dai risultati delle ricerche è emerso che gli aminoacidi liberi (e non solo i 10 essenziali) sono spesso indispensabili per lo sviluppo e non sostituibili con proteine e/o polipeptidi. È il caso di *E. bryani* che sembra non essere in grado di utilizzare le proteine sufficientemente bene per soddisfare le esigenze di rapida crescita delle larve (Nettles, 1986a). Anche Bonnot *et al.* (1984) e Grenier *et al.* (1986), pur riconoscendo l'importanza delle proteine e/o polipeptidi per la crescita di *Phryxe caudata*, rilevano che le larve presentano una scarsa attività endopeptidasica. Lo stesso Thompson (1983; 1986b) per *B. lasus* ed *E. roborator* riporta che, aggiungendo alle diete aminoacidi liberi, si assiste ad una miglior crescita e sviluppo delle larve.

La concentrazione e le singole quantità di aminoacidi nelle diete variano con le specie e, come scritto in precedenza, devono essere bilanciate oltre che fra di loro anche con gli altri ingredienti. È importante ricordare, qualora si vogliano dosare questi prodotti, che aumentandone la concentrazione, la pressione osmotica del medium può risultare fatale all'entomofago allevato.

Nella tabella 3 si riportano le quantità relative ad alcune diete olidiche e meridiche, indicando anche la presenza o meno di altre sostanze azotate.

**Caseina** — È una fosfo-proteina che normalmente si ottiene dal latte bovino. Si trova disponibile come libera da grassi e/o vitamine e contiene circa 15 aminoacidi (e un contenuto in N secco minimo del 14.5%), ma può essere carente in cistina, glicina e acido glutammico. La caseina si può trovare sia in polvere che in forma granulare; allo stato grezzo è scarsamente idrosolubile anche se, in commercio, se ne può reperire con una solubilità elevata.

Per *A. affinis*, House (1954a) ha utilizzato una concentrazione del 5% di idrolizzato di caseina ed ha osservato che, innalzandola al 10%, le rese in adulti rimanevano elevate. Egli in seguito ne ha impiegato il 7.14% (in combinazione con gelatina) per *Itopectis conquisitor* (1978). Grenier *et al.* (1978) hanno provato per la dieta di *Lixophaga diatreae* degli idrolizzati proteici, tra cui caseina al 5% e allo 0.08% (in questo caso insieme con soia, albumina del latte e dell'uovo) conseguendo buoni risultati. Bratti (1989) ha utilizzato caseina tecnica allo 0.3%, addizionata con la base olidica di Nettles (1986b) e con altri elementi di natura proteica, in due delle diete meridiche per l'allevamento delle L<sub>2</sub> di *P. rufifrons* ottenendo una crescita modesta del parassitoide. Guan *et al.* (1978) hanno usato lo stesso prodotto per la dieta di *Trichogramma dendrolimi* e Lu e Lang (1981) hanno riportato una moderata crescita larvale per *Dibrachys cavus*, sopra un substrato contenente il 50% di idrolizzato di lievito e acidi nucleici.

**Albumine** — Sono un gruppo di proteine caratterizzate da una forte coagulazione quando sottoposte ad alte temperature e da una buona solubilità in

Tab. 3 - Quantità di aminoacidi liberi per alcune diete olidiche e meridiche.

Aminoacidi	Grace (1962) (cfr. Hink, 1972)	House (1954a)	Grenier et al.* (1978)	Thompson (1974)	Thompson (1981b)	Yazgan (1981)	Nettles (1986b)*	
	(mg/100 ml di dieta)							
				1	2*			
Alanina	22.5	129	169	300	211	50	312.5	125
Alanina (beta)	20	—	—	—	—	—	—	10
Arginina	70	53	176	240	169	40	381.25	125
Asparagina	35	—	201	—	—	—	—	200
Acido Aspart.	35	153	—	600	—	100	400	—
Cisteina	—	—	10	60	—	10	—	—
Cistina	2.5	18	—	—	—	—	81.25	8
Fenilalanina	15	140	62	240	169	40	418.75	100
Acido Glut.	60	274	186	600	—	100	656.25	—
Glutammina	60	—	—	—	—	—	—	225
Glicina	65	35	91	300	211	50	487.50	80
Istidina	250	35	260	480	338	80	150.00	100
Idrossiprolina	—	24	—	240	—	40	106.25	—
Isoleucina	5	153	77	240	169	40	325	80
Leucina	7.5	140	29	420	296	70	481.25	130
Lisina	62.5	88	175	420	296	70	362.5	150
Metionina	5	94	10	120	85	20	187.5	40
Prolina	35	100	109	240	—	40	468.75	75
Serina	110	176	57	240	169	40	418.75	100
Treonina	17.5	94	78	240	169	40	337.5	70
Triptofano	10	47	40	60	41	10	87.5	40
Tirosina	5	82	89	240	169	—	218.75	70
Valina	10	165	104	720	508	120	368.75	100

\* - Addizione di materiale proteico.

soluzioni saline. Le più caratteristiche sono: albumina dell'uovo, albumina del latte e la albumine di soia e grano.

L'albumina di siero è un gruppo di proteine che costituisce circa il 60% del contenuto proteico nel plasma dei vertebrati. Soprattutto quest' ultima è stata utilizzata in numerose diete.

Thompson, per *Brachymeria lasus*, riporta una percentuale attorno al 15% di albumina insieme all'1% di aa. liberi (1981b); lo stesso Autore ne ha usato una concentrazione del 3% nei substrati per *B. intermedia* (1980) ed *E. roborator* (1975), mettendo in risalto come la prima specie non si sia sviluppata in assenza di aa. liberi. Strand e Vinson (1985) hanno indicato una concentrazione di albumina serica pari al 20% in combinazione con lo 0.81% di aminoacidi per la dieta di *T. pretiosum* e Greany (1986) ne ha riportato un effetto positivo per le larve di I età di *Cotesia marginiventris*. Nelle diete per il Tachinide *L. diatreae*,

Grenier *et al.* (1978; 1986) hanno impiegato una quantità di idrolizzato di albumina del latte e dell'uovo del 5% e, rispettivamente del 3.3 e 0.5%, in combinazione con altri elementi proteici. Nettles (1986b) ha utilizzato per *E. bryani* una miscela di idrolizzati proteici, tra cui l'1% di albumina serica e lo 0.9% di albumina del latte, conseguendo un innalzamento notevole della resa in adulti.

**Lieviti** — I lieviti e i loro derivati (estratti, idrolizzati, etc.) sono usati da molto tempo nella preparazione delle diete per gli insetti. I due tipi più comuni sono quello di birra (da *Saccaromyces cerevisiae*) e di torula (da *Candida utilis* o *Torulopsis*). Il lievito di birra, oltre ad una quantità minima di proteine attorno al 40%, contiene numerose vitamine.

Hoffman e Ignoffo (1974) hanno usato questo prodotto, nella forma idrolizzata al 10%, in combinazione con siero bovino per l'allevamento di *Pteromalus puparum*. Liu e Wu (1982) hanno conseguito buoni risultati, sia per l'ovideposizione che per la crescita di *Trichogramma* spp., addizionando il lievito di birra ed altre sostanze nutritizie al liquido di Grace. Nettles (1986b) ha usato Yestolate (Difco) nella dieta meridica per *E. bryani* in una quantità pari a 200 mg/100 ml.

**Farina di soia** — È un prodotto largamente usato per le diete dei fitofagi. Nella forma grezza e in alcuni prodotti derivati contiene delle sostanze tossiche che pare inibiscano la crescita degli organismi. Per altro i preparati in commercio, impiegati per l'alimentazione animale, sono appositamente trattati e quindi liberi da questi inibitori.

I tipi di farina che più facilmente sono reperibili sul mercato sono quattro e presentano un diverso contenuto in proteine:

**Farina di estrazione della soia:** è costituita dal 43-45% in proteine e contiene una quantità di fibra pari al 7% circa oltre a sali minerali e vitamine.

**Concentrato di proteine della soia:** le proteine costituiscono il 64-65% ed inoltre contiene circa il 7% di lisina.

**Proteine della soia:** la farina è composta dal 90% in proteine e presenta il vantaggio di avere una bassissima percentuale di fibra (0.2%).

**Residuo della lavorazione della soia:** ha notevoli capacità assorbenti dovute all'elevato contenuto in fibra (37.5% insolubili e 17.5% solubili); presenta un contenuto di proteine attorno al 40%.

I derivati della soia sono stati usati con un certo successo nelle diete per Ditteri Tachinidi. Grenier *et al.* (1978) hanno riportato degli effetti positivi sullo sviluppo di *L. diatreae* addizionando idrolizzato di proteine della soia (5% e 1.2%); Nettles (1986b), aggiungendo ad una dieta meridica il 2.6% di farina di estrazione, ha triplicato la resa in adulti per *E. bryani*. Bratti e Nettles (1988) hanno utilizzato il residuo di lavorazione della soia, sia come elemento nutrizionale che come supporto fisico, per le larve di *Palearistorista laxa*. La dieta completa composta dal 20-25% di r.d.s e dal 75-80% di emolinfa di *Manduca sexta* ha consentito lo sviluppo da L<sub>1</sub> ad adulto.

**Gelatina** — È una miscela eterogenea di proteine idrosolubili ottenuta dalla bollitura della pelle, tendini, legamenti, etc. di provenienza bovina e suina in acqua. Essa, pur essendo considerata una proteina nutrizionalmente incom-

pleta in quanto carente di triptofano, contiene circa una ventina di aminoacidi. La gelatina è solubile in acqua calda e in soluzione sotto i 35-40 °C manifesta proprietà gelificanti. Il grado di gelificazione è misurato con un'unità di misura chiamata Bloom. In commercio se ne possono trovare da 60 a 300 Bloom (più alto è il numero maggiori sono le proprietà gelificanti).

L'idrolizzato di gelatina, derivato dalla digestione pancreatica dell'albumina del latte, è stato utilizzato con successo da Grenier *et al.* (1978) per *L. diatreae* in ragione di 610 mg per 100 ml dieta e da Thompson (1980) che, con una concentrazione variabile dal 6 al 12%, ha osservato un beneficio nella crescita di *B. intermedia*. Baronio e Sehnal (1980) hanno predisposto una dieta sub-naturale per *Pseudogonia rufifrons*, impiegando come gelificante gelatina all'8%.

Altre sostanze proteiche — Oltre alle sostanze elencate ve ne sono altre, come foetina e transferrina (presenti nel siero dei vertebrati) che hanno dato buoni risultati per l'accrescimento del primo stadio larvale di *C. marginiventris* (Greany, 1986) e gli idrolizzati proteici che sono stati utilizzati positivamente sia per *E. bryani* (Nettles *et al.*, 1980) che per *T. pretiosum* (Nettles *et al.*, 1985). Questi ultimi preparati constano di prodotti idrosolubili ottenuti, per mezzo della digestione con acidi forti o enzimi proteolitici (tripsina, pepsina, etc.), da carne, cuore, muscoli, caseina, farina di soia, etc.

#### 4.2 Idrati di carbonio

La richiesta in carboidrati può essere soddisfatta aggiungendo nelle diete polisaccaridi (es.: amido, glicogeno), oligosaccaridi (es.: melezitoso, trealoso, saccarosio, etc.) o monosaccaridi (es.: glucosio, fruttosio, mannosio, etc.). La scelta di un gruppo rispetto ad un altro è fondamentalmente dovuta alla presenza o meno negli insetti di enzimi in grado di degradare le molecole più complesse, oltre che all'aumento di pressione osmotica che essi determinano nel substrato.<sup>(6)</sup>

Per quanto riguarda le diete dei parassitoidi i più usati sono glucosio e trealoso.

Trealoso — È un disaccaride presente in alte percentuali nell'emolinfa di molti insetti e di conseguenza numerosi ricercatori lo includono molto spesso nelle diete per parassitoidi.

House (1978) ha usato una quantità di trealoso pari a 350 mg/100 ml di dieta per *I. conquisitor*. Nettles *et al.* (1980) ne hanno riportato una concentrazione dell'1%, associato a glucosio, per *E. bryani*. Thompson (1980) ha indicato una concentrazione del 2% in uno dei tanti substrati saggiati per *B. intermedia*.

---

<sup>(6)</sup> L'unico studio comparativo fra zuccheri (glucosio, trealoso, saccarosio, fruttosio), per la dieta di un parassitoide, è stato quello eseguito da Thompson (1979) per *E. roborator*. Egli non nota differenze sulla mortalità larvale ma sottolinea come il saccarosio sia la sostanza che consente il raggiungimento dei pesi più elevati.

Strand e Vinson (1985), per *Trichogramma pretiosum*, ne hanno usato una concentrazione al 4% che è stata abbassata all'1.5% per il substrato di un altro oofago, il *Telenomus heliothidis* (Strand *et al.*, 1988).

**Glucoso o destroso** — È un monosaccaride utilizzato frequentemente sia nelle diete per fitofagi che per entomofagi, in virtù anche del fatto che possiede una certa attività fagostimolante.<sup>(7)</sup>

House (1954a) ha messo in evidenza la necessità di glucoso per le larve di *A. affinis*, sottolineando come l'assenza di questo zucchero causasse un decremento nella resa in L<sub>3</sub> e quindi una forte mortalità nei primi stadi larvali. Egli poi, formulando la dieta per *Itopectis conquisitor*, lo ha impiegato allo 0.37% (House, 1978). Thompson (1979), aggiungendo alla dieta di *Exeristes roborator* dal 2 al 8% di destroso, ha notato un incremento nella sopravvivenza delle larve, rilevando una certa relazione fra questa sostanza e la produzione di lipidi nel parassitoide. Sempre lo stesso Autore ha riportato che, aumentando la percentuale di glucoso dallo 0 al 2% nel substrato di *B. lasus*, si assisteva a maggiori incrementi ponderali. Grenier *et al.* (1975) hanno utilizzato tre zuccheri, tra cui il glucoso allo 0.1%, nella dieta che ha consentito il raggiungimento del terzo stadio larvale per *P. caudata*. Sempre in combinazione con altri idrati di carbonio, il destroso è stato addizionato allo 0.15% nel substrato che ha consentito lo sviluppo di *T. pretiosum* (Strand e Vinson, 1985).

**Altri idrati di carbonio** — Una sostanza complessa di un certo interesse è il glicogeno. Pur considerando che la stragrande maggioranza dei Ditteri non è in grado di digerirlo (Dadd, 1977), Grenier *et al.*, (1978) ne hanno impiegato una quantità pari al 3% nella dieta per *L. diatreae*. House (1978) ne ha adoperato lo 0.75% in combinazione con altri due zuccheri per *I. conquisitor*.

Maltoso, levuloso e fruttosio sono stati sporadicamente impiegati in combinazione fra loro o ad altri idrati di carbonio (Grenier *et al.*, 1975; Strand e Vinson, 1985).

#### 4.3 Lipidi

Anche se gli insetti possono usare un'ampia gamma di lipidi come fonte di energia alternativamente ai carboidrati, solo una classe, costituita dagli steroli, si è dimostrata indispensabile per la loro crescita e sviluppo. Lo studio degli steroli è uno degli aspetti della nutrizione degli insetti più indagati, ed è ormai ben chiaro che gli esapodi non sono in grado di sintetizzare il nucleo di questi lipidi.<sup>(8)</sup>I lipidi possono essere divisi in due grandi gruppi.

---

<sup>(7)</sup> House (1967) ha cercato di determinare quanto il glucoso potesse essere fagostimolante per le larve di *A. affinis*, ma egli ha concluso che, più che dalla presenza di questo zucchero, l'attività trofica era stimolata dalla proporzionalità degli elementi nutrizionali nella dieta.

<sup>(8)</sup> Per maggiori approfondimenti sull'argomento si rimanda ai lavori di Thompson M. *et al.*, (1972), Svoboda *et al.*, (1975; 1978) e Dadd (1985).

a) Lipidi complessi: comprendono gli acidi grassi (saturi e insaturi), gliceridi (esteri degli acidi grassi e glicerolo), fosfogliceridi e sfingolipidi.

b) Lipidi semplici: non contengono acidi grassi e sono costituiti da steroidi e terpeni.

In generale gli acidi grassi possono essere addizionati nelle diete sia in forma libera che sotto forma di trigliceridi;<sup>(9)</sup> in entrambi i casi è indispensabile usare degli agenti emulsionanti (lecitine, tween 20, tween 80 o lauril solfato) per garantire un'efficace dispersione nel substrato.<sup>(10)</sup>

#### Lipidi complessi

**Acidi grassi saturi** — Gli acidi di questo gruppo che si ritrovano in alcune diete sono due: l'acido palmitico e stearico. Il primo è utilizzato, in combinazione con altri lipidi, sia da Yazgan (1972; 1981) nella diete per *I. conquisitor* e *Pimpla turionellae*, che da Thompson (1975; 1980) per quelle di *E. roborator* e *B. intermedia*. Il secondo, allo stato puro, si trova sia in una delle tante diete provate per *B. intermedia* (Thompson, 1980) che in quella formulata da Yazgan (1981) per *P. turionellae*.

**Acidi grassi insaturi** — Nelle diete per insetti entomofagi, essi sono rappresentati soprattutto da acido oleico, acido linoleico e acido palmitoleico, venendo impiegati spesso insieme e costituendo la maggior parte dei lipidi che si trovano nei vari pabulum (Yazgan, 1972, 1981; Thompson, 1974, 1980).

**Altri lipidi complessi** — Nella dieta per *E. bryani*, Nettles *et al.* (1980) utilizzano una miscela lipidica costituita da trioleina (trigliceride composto da acidi grassi insaturi) e da lecitine sottoforma di dimiristoilfosfatidilcolina e disteaorilfosfatidilcolina (stesso tipo di lecitina presente nel tuorlo d'uovo). Le lecitine, usate anche da House (1978) per la dieta di *I. conquisitor* (allo 0.8%) e da Grenier *et al.* (1978) per *L. diatreae* (allo 0.5%), sono formate da un'insieme di digliceridi composti in gran parte da acido stearico, palmitico ed oleico legati all'estere colinico dell'acido fosforico. Il prodotto commerciale deriva soprattutto dalla lavorazione della soia.

Thompson (1981b) per *B. lasus*, Thompson *et al.* (1983) per *Pachycrepoides vindemiae* e Strand e Vinson (1985) per *T. pretiosum* hanno utilizzato un'emulsione al 10% (Intralipid) composta da olio di soia, glicerolo e fosfolipidi del tuorlo

---

<sup>(9)</sup> Thompson (1977) ha notato per *E. roborator* che, aggiungendo acidi grassi liberi, la dieta risultava tossica, mentre non lo era se a questi si sostituivano i corrispondenti trigliceridi.

<sup>(10)</sup> Grenier *et al.* (1974) hanno riportato un certo grado di tossicità nei confronti di *P. caudata*, qualora si usi tween 80 insieme ad acidi grassi. Thompson (1977), invece, nota una certa tossicità per *E. roborator*, solo quando si utilizza laurilsolfato. Grenier (1986) ha ipotizzato che queste manifestazioni tossiche potrebbero essere dovute all'interazione tra lipidi, agenti emulsionanti e processi respiratori, nel senso che si formerebbe, sulla dieta e sul tegumento larvale, una sorta di film che impedirebbe lo scambio gassoso. Yazgan (1981) ha dimostrato che, aumentando la concentrazione nella dieta, di Tween 80 dallo 0.20 allo 0.22%, le larve di *P. turionellae* presentavano una certa mortalità.

d'uovo. Più precisamente essa contiene l'1.2% di fosfolipidi di tuorlo d'uovo, il 2.25% di glicerolo con una presenza di acido linoleico (54%), acido oleico (26%), acido palmitico (9%) e acido linolenico (8%).

#### Lipidi semplici

**Colesterolo** — Questa sostanza, precursore degli ecdisteroidi, è, come scritto in precedenza, un elemento indispensabile per la crescita e lo sviluppo degli insetti.<sup>(1)</sup> Di conseguenza lo si ritrova pressochè in tutte le diete, quasi sempre in forma chimicamente pura o, come nel caso dei substrati per molti oofagi, contenuto nel tuorlo d'uovo. Il colesterolo è stato usato in concentrazioni variabili comprese dallo 0.01%, nella dieta per *B. lasus* (1981b), fino allo 0.1%, in quelle per *A. affinis* (House, 1954a) e per *T. pretiosum* (Strand e Vinson, 1985).

**Vitamine liposolubili** — Le uniche due vitamine liposolubili impiegate nelle diete per i parassitoidi sono la vitamina A (retinolo) e la vitamina E (tocoferolo). House (1966c) riporta che la vit. E è molto importante per la riproduzione di *A. affinis*, mentre Yazgan (1972) ha dimostrato che, entrambe le due sostanze, non sono essenziali per lo sviluppo di *I. conquisitor*. Nettles *et al.* (1980), pur non riconoscendone l'essenzialità, le hanno addizionate in concentrazioni molto basse (0.5 mg/100 ml) nella dieta per *E. bryani*.

#### Tuorlo d'uovo

È uno degli ingredienti utilizzati con maggior successo nelle diete per Imenotteri oofagi. Questo nutriente, pur essendo elencato nei materiali contenenti lipidi, è composto da numerose altre sostanze che svolgono un ruolo importante nella nutrizione degli insetti. Esso approssimativamente contiene il 48.7% di acqua, il 16.4% di proteine, lo 0.21% di carboidrati e il 33% di lipidi, tra cui una quantità di colesterolo pari a 1.6 mg/100 g.

Nelle diete oligidiche per *Trichogramma pretiosum*, Xie *et al.* (1986a) ne hanno addizionato il 25% in combinazione con emolinfa e latte in polvere. Per *T. confusum* e *T. dendrolimi*, la dieta artificiale, che ha permesso di allevare con discreto successo queste due specie, ne conteneva il 14% mescolato ad omogeneizzato di pupa e latte in polvere (Coop. Prov. Res. Hubei, 1985).

Liu e Wu (1982) hanno formulato, per la prima volta, una dieta oligidica priva di componenti entomatiche, per *T. confusum*, *T. pretiosum* e *T. dendrolimi*, contenente una percentuale variabile dal 10 al 20% di tuorlo d'uovo, riportando però rese in adulti molto basse.

Ding *et al.* (1980), con una dieta in cui il tuorlo d'uovo era presente al 20%, hanno allevato con buoni risultati il Tetrastichide *Tetrastichus schoenobii*. Strand *et al.* (1985) hanno ottenuto l'adulto di *Telenomus heliothidis* sopra un pabulum

---

<sup>(1)</sup> Thompson (1981a) ha dimostrato che per i parassitoidi *B. lasus* e *P. vindemiae* il colesterolo è un elemento essenziale per il loro sviluppo.

di costituzione molto simile al precedente, ma con un quantitativo di tuorlo d'uovo pari al 35%.

Oltre che per gli oofagi, questo materiale si è dimostrato benefico anche per il Braconide *Habrobracon hebetor*, allevato su una dieta simile a quella per *Trichogramma* spp. (Xie *et al.*, 1989) oltre che per il Tachinide *E. bryani*. Esso, infatti, addizionato alla dieta meridica in ragione dell'1.6%, ha incrementato notevolmente la resa in adulti (Nettles, comunicazione personale).

#### 4.4 Vitamine e altri fattori di crescita

Le vitamine sono sostanze organiche che all'interno dell'organismo svolgono la loro azione in piccolissime concentrazioni. In generale, gli insetti necessitano delle seguenti vitamine del gruppo B: tiamina, riboflavina, niacina, acido pantotenico, piridossina, acido folico e biotina (House, 1974; Dadd, 1977) mentre, riguardo alla cianocobalamina, non è ancora stata dimostrata la sua essenzialità. Comunque, come riportato da Grenier *et al.* (1986), risulta estremamente difficile uno studio sulla richiesta da parte delle varie specie di queste sostanze, in quanto esse sono presenti in tracce sia nelle uova che in numerosi ingredienti che compongono la dieta ed inoltre, non bisogna dimenticare, che possono essere prodotte da eventuali microorganismi simbiotici.

L'acido ascorbico è ritenuto essere essenziale per lo sviluppo di molti fitofagi mentre, anche se addizionato a numerose diete, non se ne conosce il valore per i parassitoidi. In tutti i casi se non dovesse essere indispensabile aggiungerlo al substrato, significa che l'insetto è in grado di sintetizzarlo partendo da glucosio o da altri precursori semplici.

House (1954b) ha dimostrato che tiamina, acido pantotenico, acido nicotinico, riboflavina e biotina sono fondamentali per lo sviluppo di *A. affinis*, mentre non lo sono piridossina, acido folico e vit. B<sub>12</sub>.

Yazgan (1972), per *I. conquisitor*, ha riportato che le larve che si nutrivano di una dieta priva di riboflavina, acido pantotenico e acido nicotinico morivano nella seconda o terza età mentre, in assenza di tiamina e piridossina, pur raggiungendo l'ultima età, impiegavano molto più tempo rispetto a quelle che si accrescevano sopra un substrato completo. Inoltre l'Autore ha notato che senza biotina e/o acido folico gli adulti, pur emergendo, mostravano scarsa vitalità.

In Tab. 4 si riporta la concentrazione di vitamine per alcune diete olidiche e meridiche.

Oltre alle vitamine idrosolubili, esistono altre sostanze che si trovano però solo nelle diete di poche specie. Si ricordano il polialcol ciclico mioinositolo che è presente nei tessuti animali come inositolo fosfogliceride, la colina e la carnitina. Soprattutto la colina si riscontra in quasi tutte le diete olidiche e meridiche mentre quelle oligidiche possono contenerne un'adeguata quantità grazie ai materiali grezzi utilizzati.

#### 4.5 Minerali

Come riportato da House (1972a), determinare la richiesta in minerali da parte degli insetti è un lavoro estremamente complesso, soprattutto per il fatto

che queste sostanze intervengono nel metabolismo a bassissime concentrazioni e che, al pari delle vitamine, qualora nelle diete siano presenti materiali grezzi, possono esservi contenute in varie percentuali.

Nei primi lavori House (1954a) aveva adottato una miscela salina messa a punto per le esigenze nutrizionali dei mammiferi, che in seguito è stata modificata da House e Barlow (1965). Un grammo di questa nuova soluzione era costituito da 0.0287 g di  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0.6 g di  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0.0838 g di  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ; 0.21 g di  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0.0077 di  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0.0488 di  $\text{CaCl}_2$ ; 0.009 g di  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  e 0.0114 g di  $\text{ZnCl}_2$ .

In seguito numerosi Autori hanno utilizzato come base questa combinazione di sali per diete chimicamente definite. In Tab. 5 si riportano alcune di queste miscele.

#### 4.6 Altre sostanze

Latte — Il latte, pure essendo un alimento altamente nutritivo, non può essere considerato nutrizionalmente completo poichè è carente in vitamine e sali minerali. Questa sostanza, quasi sempre sotto forma di polvere, ha trovato un largo impiego nelle diete oligidiche per Imenotteri oofagi.

Approssimativamente 100 g di polvere contengono 15.5 g di proteine, 21 g

Tab. 4 - Quantità di vitamine in alcune diete olidiche e meridiche.

Aminoacidi idrosolubili	Grace (1962) (cfr. Hink, 1972)	House (1954a)	Grenier <i>et al.</i> (1978)	Thompson (1974)	Yazgan (1981)	Nettles (1986b)
	(mg/100 ml di dieta)					
Acido amino benzoico	0.002	1.5	—	—	—	—
Acido ascorbico	—	—	4.1	—	9.3947	5.0
Biotina	0.001	0.0025	0.01	0.06	0.0336	0.05
Colina	0.02	10	20	200	218.0921	129
Acido folico	0.002	0.5	0.027	0.1	0.1007	1.0
Acido nicotinico	—	1.5	2.2	—	5.0329	—
Niacianammide	0.002	—	—	5.0	—	2.0
Calcio pantotenato	0.002	1.5	1.1	2.0	2.4829	4.0
Piridossina	0.002	1.5	0.15	0.3	0.2516	0.1
Cianocobalamina	—	—	0.0035	0.002	—	0.0035
Riboflavina	0.002	1.5	0.5	1.0	1.1743	1.0
Inositolo	0.002	10	6.5	15	15.0987	—
Mioinositolo	—	—	—	—	—	5.0
Tiamina	0.002	0.5	0.037	0.2	0.1342	0.1

Tab. 5 - Quantità di sali minerali in alcune diete olidiche e meridiche.

Sali minerali	Grace (1962) (cfr. Hink, 1972)	House (1954a)	Grenier <i>et al.</i> (1978)	Thompson (1974)	Yazgan (1981)	Nettles (1986b)
	(mg/100 ml di dieta)					
CaCl <sub>2</sub>	0.4	6.1	180	30	19.08	—
Co(Ac.) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	—	—	0.02	—	—	—
Co(Ac.) <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	—	—	—	—	—	0.02
CoCl <sub>2</sub>	—	0.962	—	5	3.01	—
Cu(Ac.) <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	—	—	0.2	—	—	0.02
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	—	1.125	—	5	3.5	—
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	—	—	8.9	—	—	8.9
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	—	3.5875	—	20	11.22	—
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	—	75	—	370	234.07	51
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	—	—	—	—	—	40
KI	—	—	0.02	—	—	0.02
KCl	1.1	—	100	—	—	59
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1.14	—	—	—	—	319
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.4	26.25	417	120	82.08	123
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	—	0.075	—	1	0.25	—
Mn(Ac.) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	—	—	5.5	—	—	5.5
NaCl	3.0	—	78	—	—	—
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	—	10.475	—	—	32.34	—
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	—	—	—	50	—	—
NaHCO <sub>3</sub>	0.35	—	—	—	—	—
Zn(Ac.) <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	—	—	—	—	—	2.0
ZnCl <sub>2</sub>	—	1.425	—	5	4.45	—
Zn(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	—	—	2.3	—	—	—
MoCl <sub>3</sub>	—	—	0.0028	—	—	—
SeO <sub>2</sub>	—	—	0.0007	—	—	—
VaCl <sub>3</sub>	—	—	0.0018	—	—	—
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	—	—	17	—	—	—

di lipidi (di cui 4.5% di acido linoleico), 56.9 g di carboidrati (44.9 g di latte-so), 3.1 g fra vitamine e minerali ed un'umidità non superiore ai 3.5 g.

Wu *et al.* (1982) hanno formulato una dieta per *T. dendrolimi* in cui il latte rappresenta uno dei componenti principali; il 15% di questa sostanza, insieme a tuorlo d'uovo ed embrione di pollo, ha permesso a Liu e Wu (1982) di allevare tre specie di *Trichogramma* con discreto successo.

Ding *et al.* (1980) hanno predisposto una dieta per le larve di *Tetrastichus schoenobii*, contenente il 20% di latte in polvere. Xie *et al.* (1986a) hanno sviluppato una dieta per *T. pretiosum* composta da tuorlo d'uovo, emolinfa e dal 25% di una sospensione lattiginosa (15 g di latte in polvere per 100 ml di acqua). Con il medesimo substrato, Xie *et al.* (1989) e Strand *et al.* (1988) hanno allevato fino allo stadio adulto il Braconide *H. hebetor* e lo Scelionide *T. heliothidis*.

Substrati commercialmente disponibili — Sono substrati messi a punto per la coltura *in vitro* dei tessuti e, come tali, spesso non presentano gli elementi in concentrazioni sufficienti per garantire lo sviluppo di un organismo. Di conseguenza, essi sono frequentemente usati in combinazione con altre sostanze oppure come liquidi «transfer» nelle operazioni di dissezione e trasferimento di uova e/o larvette.

Il medium di Grace (Hink, 1972) è stato sicuramente il più adottato. Hoffman *et al.* (1973) lo hanno utilizzato per allevare le larve di *Pteromalus puparum*. Il successo è stato parziale poichè le larve, pur accrescendosi, morivano circa dopo 96 ore. Sempre per questo Pteromalide, Hoffman e Ignoffo (1974) hanno messo a punto una dieta, basata sul liquido di Grace addizionato con siero di feto bovino e idrolizzato di lievito, che ha permesso di raggiungere lo stadio adulto. Baronio e Sehnal (1980) hanno messo in allevamento le larve di I età di *Pseudogonia rufifrons* nel liquido di Grace contenente idrossicidione, senza però notare nessun sviluppo. Liu e Wu (1982), per la prima volta, hanno ottenuto lo sviluppo da uovo ad adulto di *T. confusum* e *T. dendrolimi* su una dieta priva di emolinfa dell'ospite e composta in buona parte dal liquido di Grace addizionato con idrolizzato di lievito, siero di feto di vitello, estratto di embrione di pollo, latte e uovo.

Il liquido nutritivo di Gardiner e Stockdale (1975) avente sigla BML-TC 10, formulato per la coltura *in vitro* delle cellule di *Saperda frugiperda* e dell'omologo NPV è stato usato, privo del siero di feto di vitello, in combinazione con emolinfa e tuorlo d'uovo, per l'allevamento di *Tetrastichus schoenobii* (Ding *et al.* 1980).

I substrati di Goodwin e Adams (1980), IPL-52 B e IPL-41, sono stati utilizzati rispettivamente da Greany (1986), aggiungendo albumina del siero bovino, per l'allevamento di *Microplitis croceipes* e *Cotesia marginiventris* e da Strand e Vinson (1985), modificato con miscela di vitamine, lipidi, albumina di siero e trealoso, per *T. pretiosum*.

Strand *et al.* (1985) hanno impiegato, per il lavaggio delle uova di *Telenomus heliothidis*, il liquido di Hink TN-HFH e Rotundo *et al.* (1988) hanno adoperato, per il Braconide *L. fabarum*, quelli di Shields e Sang (1977) e Mitsushashi e Maramorosch (1964).

Emolinfa e omogeneizzati — Dato che la stragrande maggioranza dei parassitoidi durante le prime fasi della vita preimmaginale presenta una stretta ematofagia, la conoscenza della composizione chimica dell'emolinfa dell'ospite è molto importante per l'allestimento di diete che abbiano un certo grado di affinità con il cibo naturale di cui essi si nutrono *in vivo*. Inoltre, non bisogna dimenticare che il primo requisito fondamentale, per l'allevamento *in vitro*, è dato dalla capacità del parassitoide a crescere e svilupparsi fuori dall'ambiente vivente; a questo proposito l'uso di substrati sub-naturali, a base di emolinfa e omogeneizzati dell'ospite, rappresenta un ottimo test.

a) Emolinfa — Le proprietà chimiche e fisiche di questo fluido sono estremamente variabili e dipendono oltre che dalla specie, dallo stadio fisiologico in cui si trova l'insetto nonchè da fattori esogeni quali temperatura, dieta etc.

Si può dire che, in generale<sup>(12)</sup>, l'emolinfa presenta un pH che varia da 6.4 a 6.8 e una pressione osmotica che va da 215 a 593 mOsm. Dal punto di vista chimico, per quanto concerne i soluti inorganici, si riscontrano nei Lepidotteri, Coleotteri e Imenotteri concentrazioni basse di  $\text{Na}^+$  e alte di  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{K}^+$  rispetto agli altri insetti, mentre per quelli organici, fra i carboidrati, la sostanza presente in maggior concentrazione è il trealoso (dallo 0.5 al 8.1%) (Wyatt G., 1967). Una classe importante che si trova nell'emolinfa è quella dei costituenti azotati, fra cui gli aminoacidi liberi, che sono presenti in quantità molto elevate rispetto al siero dei mammiferi. La determinazione di queste sostanze è strettamente legata al tipo di tecniche che si utilizzano e quindi è spesso possibile trovare dati contrastanti in letteratura.<sup>(13)</sup>

Oltre agli aminoacidi, si riscontrano anche ammine, peptidi e proteine. Queste ultime, generalmente, aumentano in concentrazione col progredire della vita larvale subendo un brusco calo durante le mute (Wyatt e Pan, 1978).

I lipidi, tra cui il colesterolo, si trovano in concentrazioni variabili tra l'1.5% e il 5.5%, mentre gli acidi organici sono rappresentati da acido citrico, acido alfa-chetoglutarico, acido succinico, acido fumarico, acido malico e acido ossalico (Jeunieux, 1971).

Bouletrau (1968; 1972) ha utilizzato gocce pendenti di emolinfa, estratta da crisalidi di *Pieris brassicae*, per allevare *P. puparum*.

Sempre per questo Imenottero, Hoffman *et al.* (1973) hanno impiegato emolinfa, appositamente trattata, da larve mature di *Heliothis zea*.

Hoffman *et al.* (1975) hanno ottenuto, per la prima volta, lo sviluppo completo di *T. pretiosum* su una dieta composta da emolinfa di larve di ultima età di *H. zea*, sia imbevuta in carta da filtro che contenuta in gusci artificiali.

Sempre su substrati composti dal 100% di emolinfa di pupe di *A. pernyi*, Lu e Lang (1981) hanno allevato, fino allo stadio adulto, l'Imenottero *D. cavus*.

Xie *et al.* (1986a) hanno formulato una dieta per *T. pretiosum*, composta dal 50% di emolinfa proveniente da larve e crisalidi di *Manduca sexta*; per lo stesso oofago Strand e Vinson (1985) hanno adottato un pabulum più complesso, contenente una percentuale di emolinfa di *Manduca* oscillante dal 10 al 40%. Con substrati molto simili Xie *et al.* (1989) e Strand *et al.* (1988) hanno conseguito buoni risultati rispettivamente per l'allevamento di *B. hebetor* e *T. heliothidis*.

Bratti e Nettles (1988) hanno allevato con discreto successo le larve del Tachinide *P.laxa* su substrati composti in gran parte da emolinfa di *Manduca*.

b) Omogeneizzati — Gli omogeneizzati impiegati, come diete subnaturali, sono esclusivamente costituiti da una poltiglia derivante, nella stragrande maggioranza dei casi, da pupe di Lepidotteri e la cui composizione chimica è difficilmente determinabile.

---

<sup>(12)</sup> Per un'ulteriore approfondimento sulle proprietà fisico-chimiche dell'emolinfa si consulti Mullins (1985) e Florkin e Jeunieux (1974).

<sup>(13)</sup> Un lavoro importante riguardo allo studio dello spettro aminoacidico dell'emolinfa nei Lepidotteri, è quello di Mitsuashi (1978).

Un buon successo è stato raggiunto dalla Coop. Res. Group. Hubei (1985) per *T. confusum* e *T. dendrolimi* utilizzando diete contenenti il 30% di omogeneizzato di pupe.

Baronio e Sehnal (1980) per la prima volta hanno allevato, partendo da larve di seconda età, il Tachinide *Pseudogonia rufifrons* fino allo stadio adulto, impiegando un substrato subnaturale composto da omogeneizzato di pupe di *G. mellonella*, destrano e gelatina. Su una dieta simile, ma disattivando le fenolossidasi con un trattamento fisico invece che con uno chimico, Bratti e Monti (1988) hanno allevato lo stesso parassitoide da larva di prima età fino allo stadio adulto.

Infine buoni risultati sono stati ottenuti da Awuitor *et al.* (1984) per *Pimpla instigator*, su estratto di crisalide di *P. brassicae*.

## 5. IL MATERIALE BIOLOGICO

Il materiale biologico, costituito da uova o larve, da porre in allevamento può essere ottenuto da:

- a) dissezione delle femmine prolificanti;
- b) dissezione dell'ospite parassitizzato;
- c) raccolta su ospite parassitizzato;
- d) ospiti «artificiali» non utilizzati per il successivo sviluppo dell'entomofago;
- e) femmine prolificanti che depongono direttamente nella o sopra la dieta.

Senza dubbio la situazione ottimale, nell'ambito di un allevamento massale, sarebbe quella di ottenere direttamente la deposizione dei germi da parte delle femmine feconde sulle diete. Come vedremo per alcune specie ciò è possibile, ma in generale ancora poco si conosce, riguardo al complesso linguaggio chimico e agli stimoli di ordine fisico che governano le modalità di comportamento che caratterizzano *in vivo* l'ovideposizione (Mellini, 1975a; Thompson, 1986b). Inoltre, per gli endoparassitoidi, una delle difficoltà più frequenti, quando si usano germi che anche per un brevissimo periodo non abbiano soggiornato nell'ospite, è che essi o non riescono a terminare lo sviluppo embrionale (uova) o ad iniziare la loro attività trofica (larve).

Come regola generale, è comunque importante individuare specie le cui uova o larve siano disponibili in gran numero e, dal punto di vista tecnico, facilmente ottenibili. Il motivo è di natura eminentemente pratico poichè, in questo modo, si possono sperimentare molte diete contemporaneamente ottenendo così, in tempi brevi, indicazioni utili per migliorare la qualità dei substrati.

### 5.1 Dissezione delle femmine prolificanti

Questa tecnica presenta un certo vantaggio qualora, mediante dissezione, si possa disporre di un buon numero di germi. È il caso di alcune specie, come ad

esempio quelle di certi Ditteri Tachinidi (che Grenier, 1986, divide in ovolarvipare, con larve di tipo planidio, e microovipare) e Sarcofagidi.

House (1954a), ricordando che *A. affinis* è vivipara, ha dissezionato le femmine gravide per ottenere le larvette da porre sulla dieta. Grenier *et al.* (1978) per il Tachinide *Lixophaga diatreae*, dopo aver estratto l'utero, che conteneva circa i 3/4 di uova embrionate, lo hanno disinfettato e posto in una saliera; da dove, dopo averlo aperto ad arte, ne hanno raccolto i planidi neogusciati e, mediante una micropipetta, li hanno trasferiti sul substrato nutritizio. Lo stesso procedimento è stato seguito anche per *Phryxe caudata* (Grenier *et al.*, 1974) e *Lydella thompsoni* (Bratti, 1989).

Ding *et al.* (1980) hanno prelevato alcune femmine di *Tetrastichus schoenobii* dall'allevamento e, dopo averle disinfettate, le hanno immerse, sopra un vetrino, in una soluzione nutritizia all'interno della quale sono state dissezionate. In seguito, essi hanno rimosso gli ovari e li hanno collocati, a due a due, in «gocce sospese» di dieta.

## 5.2 Dissezione dell'ospite parassitizzato.

È sicuramente la tecnica più adottata e riguarda soprattutto gli Imenotteri endoparassitoidi oltre che alcuni Ditteri Tachinidi, quali *Eucelatoria* spp., che iniettano i loro germi all'interno della larva ospite.

Bronskill e House (1957) hanno estratto gli embrioni del parassitoide *Pimpla turionellae* dalle pupe di *G. mellonella*, previamente parassitizzate e disinfettate, e li hanno trasferiti, mediante un pennello, sulla dieta.

Bouletrau (1968; 1972) ha estratto le uova di *Pteromalus puparum* dalle crisalidi di *Pieris brassicae* e, dopo averle ripetutamente lavate con una soluzione salina, le ha collocate parte in «gocce sospese» di emolinfa e parte sopra un substrato costituito dall'avancorpo di crisalidi morte di *P. rapae*.

Yazgan e House (1970) hanno ottenuto le uova di *I. conquisitor* dissezionando le pupe di *G. mellonella* subito dopo la parassitizzazione. Successivamente essi le hanno poste in una soluzione salina per la schiusa, per poi trasferire le larve neonate nelle provette contenenti la dieta. Per la stessa specie Yazgan (1972) ha effettuato la dissezione delle crisalidi di *Galleria* dopo 24 ore dalla parassitizzazione notando che nel frattempo l'embrione all'interno delle uova era già sviluppato e di conseguenza più resistente alle stimolazioni esogene di natura chimica e meccanica.

Nenon (1972), per lo studio dell'influenza degli ormoni sullo sviluppo di *A. fuscicollis*, ha utilizzato il complesso poliembrionico estraendolo dalla larva di *Hyponomeuta malinellus* Zell., previamente parassitizzata allo stadio di uovo.

Hoffman *et al.* (1973), dopo aver sottoposto a parassitizzazione le crisalidi di *P. rapae*, previa un'accurata disinfezione le hanno dissezionate, dopo circa 7 ore, per ottenere le uova dello Pteromalide *P. puparum*. Sempre Hoffman *et al.* (1975) hanno ottenuto, per la prima volta, lo sviluppo completo di *T. pretiosum* mettendo in coltura uova provenienti dalla dissezione di uova di *H. zea*.

Baronio e Senhal (1980) hanno dissezionato le eopupe di *G. mellonella*, per mettere in allevamento, sopra un substrato subnaturale, le larve di seconda età del Tachinide *Pseudogonia rufifrons*. Per lo stesso parassitoide Bratti e Monti (1988) hanno superparassitizzato le larve ospiti da cui poi hanno estratto, dopo circa 72 ore, circa una cinquantina di L1 per individuo da porre sopra le varie diete.

Nettles *et al.* (1980), come sito di larvideposizione per le femmine di *E. bryani*, hanno utilizzato larve di ultima età di *H. zea* (in numero di 5) ponendole per 4-5 ore a parassitizzare all'interno di una gabbia di allevamento contenente i Ditteri. Dopo 24 ore gli Autori hanno effettuato la dissezione delle larve estraendo, da ciascuna di queste, un numero variabile da 50 a 150 larvette le quali, dopo essere state sottoposte ad un accurato lavaggio in liquido nutritizio, venivano trasferite, mediante pipette Pasteur, sul substrato. Un procedimento simile è stato adottato da Bratti e Nettles (1988) per ottenere i germi di *P. laxa*. Sempre Nettles (com. personale) ha messo a punto recentemente una nuova tecnica per raccogliere le larvette di *E. bryani*. Questa consiste nel sottoporre la larva ospite superparassitizzata, aperta ad arte, ad un lavaggio in acqua sterile provocando, per differenza di pressione osmotica e per stimolazione meccanica, il distacco delle larvette dalle trachee.

Thompson (1980; 1981b), per i due Calcidoidei *Brachymeria intermedia* e *B. lasus*, ha eseguito la dissezione delle pupe dell'ospite subito dopo la parassitizzazione. In seguito, egli ha posto le uova in soluzione salina e quindi, dopo averle disinfettate, le ha trasferite individualmente in contenitori a microcelle provviste di dieta. La stessa tecnica è stata seguita per le uova di *P. vindemiae* (Thompson *et al.*, 1983).

Strand e Vinson (1985), per mettere in coltura le uova di *T. pretiosum*, hanno esposto quelle dell'ospite *H. virescens* ad un gruppo di femmine dell'Imenottero per circa 20 minuti. In questo modo da ogni uovo del Nottuide se ne sono ottenute 15-20 di quelle dell'oofago.

Greany (1986) ha collezionato le uova di *Cotesia marginiventris* e *Microplitis croceipes*, mediante dissezione delle larve ospiti, in gocce di 0.1 ml di dieta.

Strand *et al.* (1988), per allevare *Telenomus heliothidis*, hanno usato una tecnica complessa. Dapprima hanno sottoposto le uova di *H. virescens* a parassitizzazione per circa 15 minuti poi, una volta disinfettate, le hanno dissezionate estraendone i germi dell'oofago che sono stati posti, per ottenere lo sviluppo embrionale, in una dieta costituita in gran parte dal liquido di Hink TNH-FH. Quindi, dopo circa 12 ore, gli Autori hanno trasferito gli embrioni individualmente sopra una dieta oligidica, messa a punto da Xie *et al.* (1986a), che ne ha consentito lo sviluppo fino allo stadio adulto.

Rotundo *et al.* (1988) hanno dissezionato numerosi afidi per ottenere circa 50 larve di seconda età del Braconide *Lisiphlebus fabarum* da porre in allevamento. Una parte di queste è stata allevata in presenza di teratociti per verificarne l'importanza nello sviluppo *in vitro* del parassitoide.

### 5.3 Raccolta da ospite parassitizzato (senza dissezione).

È un metodo usato per gli Imenotteri ectoparassitoidi. Consiste essenzialmente nel raccogliere le uova deposte dal parassitoide sul corpo dell'ospite, per mezzo di aghi manicati opportunamente modellati, e di trasferirle sopra la dieta.

Thompson (1974) ha eseguito questa operazione impiegando, per la ovideposizione dell'Ichneumonide *E. roborator*, larve di *P. gossypiella* uccise mediante un bagno in acqua calda (5' a 52 °C).

Sempre con questo sistema, Xie *et al.* (1989) hanno prelevato le uova di *H. hebetor* da larve di *G. mellonella* e poi le hanno deposte sopra una capsula formata da un involucro di parafilm contenente la dieta.

### 5.4 Raccolta da «ospiti artificiali» non utilizzati per il successivo sviluppo dell'entomofago.

È una tecnica che consente di eliminare l'ospite naturale riducendo considerevolmente gli oneri relativi alla gestione degli allevamenti *in vivo*.

Arthur *et al.* (1972) hanno definito, per *I. conquisitor*, un substrato composto da una soluzione acquosa con pH 7, di serina (0.5 M), leucina (0.065 M), arginina (0.05 M) e cloruro di magnesio (0.025 M) contenuta all'interno di un tubo di parafilm, sul quale le femmine hanno deposto le loro uova.

Per *Pimpla instigator*, Tersac e Guerdox (1981) hanno costruito capsule di paraffina, contenenti un estratto acquoso di crisalide, in cui le femmine di età tra i 7 e 30 giorni hanno ovideposto.

Rajendram e Hagen (1974) hanno ottenuto la ovideposizione, da parte delle femmine di *Trichogramma californicum*, all'interno di uova artificiali contenenti sia soluzioni saline che di aminoacidi. Il procedimento per la costruzione dei gusci artificiali, che verrà in seguito adottato da numerosi Autori, è stato il seguente.

Inizialmente una miscela di paraffina e vaselina (3:1) veniva sciolta all'interno di una provetta, immersa in acqua calda ad una temperatura di 45-50 °C, sopra al substrato di ovideposizione costituendo uno spessore superficiale di 2-3 mm. Poi, mediante un tubo capillare, si prelevava un piccolo quantitativo della miscela e del substrato e, per gravità si deponevano piccole gocce sopra uno strato di parafilm, che veniva infine sottoposto alle operazioni di parassitizzazione. Il diametro delle uova artificiali variava in funzione di quello del tubo capillare oltre che dalla profondità di immersione, mentre lo spessore del guscio poteva essere modificato variando la temperatura.

Mediante le tecniche sopra esposte i due Autori hanno rilevato che, per *T. californicum*, il miglior substrato di ovideposizione era quello costituito dalla soluzione salina di Neisenhemeier (pH = 7.7).

Liu e Wu (1982) hanno usato questa tecnica con un substrato composto da idrolizzato di lievito, siero di feto di vitello e liquido di Grace per l'ovideposizione di *T. dendrolimi* e *T. confusum*.

Nettles *et al.* (1982; 1983), sempre con il metodo delle uova artificiali, hanno eseguito uno studio sull'efficacia di alcuni sali minerali per l'ovideposizione di *T. minutum* e *T. pretiosum*. I risultati hanno indicato che le soluzioni composte da 124.7 mM di KCl più 36.5 mM di MgSO<sub>4</sub> e da 83 mM di KCl più 24.3 mM di MgSO<sub>4</sub> erano quelle che consentivano la raccolta del maggior numero di uova.

Nettles *et al.* (1985) hanno saggiato, adottando la medesima soluzione salina, un intervallo di pH da 6.5 a 9.0, rilevando che i valori ottimali erano attorno a 7. Nello stesso lavoro gli Autori hanno verificato se, come dimostrato da Wu e Qin (1982), per *T. dendrolimi*, alcuni aminoacidi liberi possiedono un'attività stimolante per l'ovideposizione di *T. pretiosum*. Dai dati emersi la risposta è stata negativa per cui se ne conclude che differenti specie di *Trichogramma* possono rispondere a stimoli chimici diversi per l'ovideposizione.

La Coop Research Group Hubei (1985) ha riportato l'efficacia di un substrato oligidico a base di omogeneizzato di pupe per la raccolta dei germi di *T. dendrolimi*.

Xie *et al.* (1986b) hanno adottato tre metodi per allevare *T. pretiosum*, ma per la deposizione delle uova hanno usato sfere artificiali di diametro attorno ai 2.5 mm, in capsule Petri di polistirene, che sono state esposte per 4-5 ore a 30-50 adulti. Le Petri venivano collocate sopra ad un piano rotante (velocità di 1 giro al minuto) per garantire una parassitizzazione omogenea; si sono così collezionate circa 100-200 uova per sfera che sono state poi trasferite, mediante pipette, nelle varie diete. In questo caso il substrato di ovideposizione era formato, oltre che dalla soluzione salina di Nettles *et al.* (1983), da emolinfa di *M. sexta* (50%), tuorlo d'uovo (25%) e latte in polvere (25%).

Sempre gli stessi Autori (1986a) hanno eseguito uno studio comparativo tra diversi substrati comprendenti la solita soluzione salina, una dieta a base di emolinfa di *Manduca* e una composta, oltre che da emolinfa, anche da succo d'uovo del Lepidottero. Dai dati è risultato che la soluzione salina causava una certa mortalità delle uova di *Trichogramma* che però, secondo gli Autori, non giustifica la sua esclusione nell'ambito di una produzione massale *in vitro*.

### 5.5 Femmine prolificanti che depongono direttamente nella dieta.

È sicuramente il metodo più efficace ed auspicabile poichè consente di produrre l'entomofago a ciclo continuo, evitando gli allevamenti degli ospiti ed eliminando le laboriose operazioni di trasferimento.

Hoffman *et al.* (1975), per *T. pretiosum*, hanno sottoposto a parassitizzazione uova artificiali con all'interno emolinfa di *H. zea*, rilevando che quelle con pareti di 76 µ di spessore contenevano una cinquantina di uova del parassitoide, alcune delle quali si sono sviluppate fino allo stadio adulto.

La Coop Research Group Hubei (1985) ha messo a punto un metodo per l'allevamento di *T. confusum* e *T. dendrolimi* basato sull'utilizzo di uova artifi-

ciali del diametro di 2-3 mm, contenenti una dieta oligidica, con guscio dello spessore di 30-50  $\mu$  costituito da copolimeri di polietilene e polipropilene. In particolare questi ricercatori hanno notato che le membrane plastiche di 36  $\mu$  di spessore, e con una permeabilità di 4.5 ( $\text{dm}^3 / \text{m}^3 \text{ 24 ore-atm}$ ), erano quelle più idonee sia per la ovideposizione che per lo sviluppo dell'oofago. Dunque dai risultati si evince che la possibilità di emergere dell'adulto neoformato è strettamente legata allo spessore del guscio che, se sufficientemente sottile, non sembra costituire un ostacolo per l'apparato boccale dell'Imenottero.

House (1978) per la prima volta ha ottenuto l'ovideposizione diretta, e lo sviluppo completo, in una capsula formata da parafilm ripiena di una dieta meridica, dell'endoparassitoide *I. conquisitor*. Egli per evitare problemi di contaminazione, dovuti alla trasmissione di patogeni mediante l'ovipositore, dapprima ha sottoposto a parassitizzazione capsule con all'interno una soluzione antimicrobica poi, appena le femmine introducevano l'ovipositore, egli le prelevava e le poneva in un'altra gabbia, ove aveva predisposto le capsule con la dieta.

## 6. CONSISTENZA FISICA, PRESSIONE OSMOTICA, PH.

### 6.1 Consistenza fisica.

Il tipo di sistema respiratorio delle larvette da porre in allevamento è l'elemento che maggiormente influisce sulla scelta delle caratteristiche fisiche della dieta. Per le larve dei parassitoidi che respirano per via tegumentale (tipico di molti endoparassitoidi Terebranti), il substrato è normalmente liquido, anche se deve essere areato e quindi contenere sufficiente ossigeno; mentre per quelli che presentano un apparato tracheale metapneustico o anfipneustico, come la generalità dei Tachinidi, e che quindi si provvedono quasi esclusivamente di aria atmosferica (o tracheale), le diete semisolide sembrano indispensabili (Mellini, 1975a).

Quest'ultima necessità, che viene soddisfatta come nelle diete per insetti fitofagi aggiungendo agenti con proprietà gelificanti, contrasta con la particolare struttura del canale digerente dei parassitoidi che, non defecando durante l'accrescimento larvale, potrebbero risentire negativamente dell'accumulo di queste sostanze inerti nel mesentero (Mellini, 1975a; Yazlovetsky, 1989).

Un sistema intermedio, per garantire un sufficiente approvvigionamento di ossigeno, potrebbe essere quello di far assorbire la dieta liquida su materiale assorbente (cotone, carta da filtro, materiali di sintesi, etc.) soddisfacendo così contemporaneamente anche le esigenze di natura trofica.

Fra gli agenti gelificanti il più usato nelle diete per entomofagi è stato l'agar; questo complesso polisaccaride del galattoso, estratto da varie specie di *Gelidium* e da altre alghe, contiene una serie di cationi ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^+$  e  $\text{Mg}^{2+}$ ) che sono indispensabili per la gelificazione, i quali rendono però problematico il suo uso nelle diete olidiche per studi nutrizionali. Da esso, inoltre, si può ottenere una frazione neutra gelificante denominata agaroso.

House (1954a) nella prima dieta olidica formulata per *A. affinis*, ha usato una concentrazione di agar pari allo 0.75%, sottolineando come la sua assenza, anche se sostituito da cotone come supporto fisico, provocasse una crescita parziale e stentata delle larve.

Yazgan e House (1970) e Yazgan (1972) hanno reso la dieta per l'endoparassitoide *I. conquisitor* semisolida, aggiungendo agar allo 0.5%, ed inoltre hanno provveduto a rendere la superficie della dieta rugosa, al fine di favorire la presa e l'ingestione da parte delle larve. Per lo stesso Icneumonide, House (1978) ha predisposto un substrato sia per l'ovideposizione che per il suo sviluppo contenente lo 0.25% di agar.

Thompson (1980), fra le numerose diete sperimentate per *B. intermedia*, ha notato che aumentando la concentrazione di agar dallo 0.5-1% al 2%, pur riscontrando formazioni di complessi insolubili, le larve si sviluppavano più rapidamente. Egli infine ha osservato che, anche se si allevavano le larvete su dieta liquida per poi trasferirle su una solida, la resa in adulti non migliorava rispetto all'allevamento continuo su dieta semisolida.

Grenier *et al.* (1978) hanno ottenuto, per la prima volta, lo sviluppo completo di un Dittero Tachinide, *L. diatreae*, mescolando la dieta meridica con lo 0.7% di agaroso. Seguendo questo importante lavoro, Nettles *et al.* (1980) hanno saggiato, per le larve di *E. bryani*, percentuali di agar comprese fra lo 0 ed il 4.0%, riportando i risultati migliori per valori attorno all'1.5%. Per il medesimo parassitoide, Bratti (1989) ha confrontato diete gelificate con agar (1.5%) con diete assorbite da cotone idrofilo non notando nessuna differenza riguardo alle rese in adulti. L'Autore, inoltre, ha rilevato che gli individui provenienti dai substrati agarizzati presentavano pesi medi pupali maggiori (11 mg circa contro gli 8 delle pupe formatesi su dieta liquida).

Yazgan (1981), per l'allevamento di *P. turionellae*, ha adoperato un substrato agarizzato (0.6%) che gli ha permesso di eseguire uno studio approfondito circa le esigenze nutrizionali delle larve.

Thompson (1975), per solidificare il substrato per *E. roborator*, ha sfruttato la denaturazione dell'albumina che, sottoposta ad alte temperature, trasformava la consistenza fisica della dieta da liquida a granulata. In seguito egli, dopo aver saggiato vari gelificanti, ha usato un gel (Sephadex) di tipo G-50 al 2% e LH-20 al 5% che ha consentito alle larve di raggiungere lo stadio adulto.

## 6.2 Pressione osmotica.

La pressione osmotica è un parametro fisiologico di estrema importanza, legato strettamente ai materiali nutrizionali, che deve essere considerato molto attentamente nella preparazione delle diete. In generale, data la permeabilità e la delicatezza del tegumento delle larvete dei parassitoidi, un substrato, non equilibrato nei suoi costituenti con la pressione osmotica dell'emolinfa dell'entomofago, può provocare nell'organismo fenomeni di ipo-ipertrofia oltre che rallentare il suo sviluppo fino, a volte, condurlo a morte.

Già House e Barlow (1956) avevano notato come, aumentando la concentrazione di aminoacidi liberi oltre il punto di isoosmosi fra la dieta e l'emolinfa delle larve, lo sviluppo e la crescita di *A. affinis* fossero molto ritardati.

Per l'allevamento di *P. caudata* e *L. diatreae*, Grenier *et al.* (1974; 1975; 1978) hanno predisposto dei substrati con valori di pressione osmotica rispettivamente di 370, 390 e 400 mOsm, notando che, al di sopra di 450 mOsm, i due Tachinidi non si sviluppavano. Di conseguenza, gli Autori hanno concluso che è sempre vantaggioso preparare delle diete con valori di pressione osmotica simili a quelli dell'emolinfa dei Lepidotteri (circa 350 mOsm).

House (1978) ha rilevato che la dieta messa a punto da Yazgan (1972) per *I. conquisitor*, presentava un'osmolalità molto elevata e che, per ottenere elevate percentuali di schiusa delle uova e di sfarfallamento degli adulti, era necessario riportarla ad un valore prossimo a quello dell'emolinfa.

Alcuni Imenotteri hanno mostrato una buona tolleranza ad osmolalità molto più grandi di quelle dell'emolinfa; è il caso di *E. roborator* che si è sviluppato da uovo ad adulto sopra una dieta olidica con valori di p.o. attorno a 1700 mOsm. Altri invece, come *B. lasus* e *P. vindemiae*, hanno manifestato notevoli difficoltà a sopportare questi valori, preferendo quelli compresi in un intervallo da 400 a 525 mOsm (Thompson, 1981a; Thompson *et al.*, 1983).

Nettles *et al.*, (1985), effettuando delle prove per l'ovideposizione di *T. pretiosum*, hanno ipotizzato che gli scarsi risultati ottenuti con substrati, quali la dieta di Nettles e il liquido di Grace, fossero imputabili ai valori troppo alti di p.o. Lo stesso oofago è stato poi allevato fino allo stadio adulto sopra una dieta con un'osmolalità pari a 490 mOsm (Strand e Vinson, 1985).

Greany (1986) e Strand *et al.* (1988) hanno formulato delle diete rispettivamente per due Braconidi (*M. croceipes* e *C. marginiventris*) e uno Scelionide (*Telenomus heliothidis*) adottando un'osmolalità uguale a quella dell'emolinfa dell'ospite compresa tra 340 e 390 mOsm.

### 6.3 pH.

I valori di questo parametro sono importanti sia per i substrati di ovideposizione che per quelli di crescita.

Nelle diete olidiche e meridiche, in cui gli aminoacidi liberi sono presenti in buone concentrazioni, il pH si aggira attorno a 4.5-5.00 per cui viene normalmente aggiustato, addizionando piccole quantità di soluzioni alcaline, a 6.5-7.00.

Thompson (1975) per eseguire questa operazione ha usato una soluzione 1 N di KOH; House (1954a; 1972) per la dieta di *A. affinis* ha addizionato NaOH, mentre per quella di *I. conquisitor* ha adoperato una miscela di NaOH e KOH.

La stessa soluzione è stata adottata da Grenier *et al.*, (1974; 1975; 1978) per portare i valori attorno a 6.6 per i substrati dei due Tachinidi *P. caudata* e *L. diatreae*. Per un altro confamiliare, *E. bryani*, Nettles (1986), mediante una soluzione composta da 3M di KOH e 1M di NaOH, ha sperimentato per la dieta

valori compresi tra 5.00 e 10.00, concludendo che le larvette crescono qualora l'intervallo di pH sia compreso tra 5.5 a 8.00, pur preferendo valori attorno a 7.

Yazgan (1972; 1981) nelle diete meridiche per *I. conquisitor* e *P. turionellae*, ha portato il pH a 6.5 usando sia KOH 2N che  $K_2HPO_4$  2N. Per alcuni Imenotteri oofagi, tra cui *Trichogramma pretiosum*, *T. dendrolimi* e *Telenomus heliothidis*, i valori di pH che hanno consentito di ottenere buone percentuali di adulti oscillano tra 6.6 e 6.8 (Strand e Vinson, 1985; Coop. Prov. Res. Hubei, 1985; Strand *et al.*, 1988).

Sempre per *Trichogramma* spp., alcuni Autori hanno indagato riguardo l'importanza svolta dal pH per l'ovideposizione. Rajendram e Hagen (1974), per *T. californicum*, hanno riportato che la soluzione salina di Neisenhemeier con pH pari a 7.7 e quella formata dallo 0.85 % di NaCl, neutralizzata con NaOH (pH=7.00), sono state quelle che hanno stimolato maggiormente l'oofago. In seguito Nettles *et al.* (1983) per *T. pretiosum*, hanno sperimentato, per la soluzione salina formata da 124 mM di KCl e 36.5 mM di  $MgSO_4$ , valori di pH compresi tra 6.5 e 9.0 deducendo che, anche se i risultati sono stati abbastanza contrastanti, il valore ottimale era da ricercarsi attorno a 7.0. Ad un risultato simile erano pervenuti Arthur *et al.* (1972) studiando il sistema di ovideposizione di *I. conquisitor*.

Secondo alcuni Autori valori di pH alcalini sarebbero fondamentali per far schiudere le uova microtipiche dei Tachinidi (Moritoshi, 1936; Wishart, 1956). Dato che questi parassitoidi possiedono un'elevata prolificità, riuscire ad ottenere la schiusa delle uova significa poter disporre, per ogni femmina, di migliaia di individui da allevare *in vitro*. Comunque rimane il fatto che valori di pH così elevati non sono idonei al successivo sviluppo degli entomofagi e che, quindi altri metodi, basati soprattutto su criteri meccanici sembrano più consoni per l'obiettivo che si intende perseguire (Mellini e Campadelli, 1988).

#### 7. METODOLOGIE DI STERILIZZAZIONE DELLE DIETE E DISINFEZIONE DEL MATERIALE BIOLOGICO.

La contaminazione microbica (lieviti, funghi e batteri) negli allevamenti *in vitro* dei parassitoidi rappresenta uno dei pericoli maggiori per il successo di questa tecnica.

La grande suscettibilità dei parassitoidi, una volta fuori dal proprio ambiente vivente, richiede condizioni di asepsi quasi assoluta. Uno dei requisiti più importanti è dato dalla situazione igienica del luogo fisico in cui vengono effettuate le diverse operazioni; normalmente tutte le procedure sono svolte sotto cappa a flusso laminare orizzontale, la quale spesso è collocata in ambienti provvisti di filtri per il controllo dell'aerazione esterna. Tutto il materiale utilizzato, vetreria, aghi manicati, contenitori, pipette etc. deve essere autoclavato o qualora ciò non sia possibile, disinfettato mediante immersione in soluzioni apposite a base di ipoclorito di sodio, formalina ed altri detergenti. Quando si usano Petri o contenitori a microcelle in materiale plastico, la sterilizzazione è garantita dalla casa

produttrice ed è di solito effettuata mediante raggi gamma. Anche i raggi ultravioletti (2650 Å) possono essere adoperati per la sterilizzazione delle vaschette di dissezione e per alcuni tipi di plastiche.

Generalmente la presenza dei microorganismi nella dieta altera profondamente la sua composizione e spesso risulta fatale per l'insetto su di essa allevato (Singh e Bucher, 1971). I più comuni microorganismi che vi si trovano sono lieviti, batteri e funghi appartenenti al genere *Aspergillus*, *Rhizopus* e *Penicillium*. Trattandosi in genere di substrati in cui la componente acqua è preponderante, diventa estremamente complesso contrastare il loro sviluppo e sovente, pur operando in ambiente asettico, risulta necessario applicare alla dieta sia trattamenti fisici che chimici.

Per quanto riguarda le procedure di ordine fisico, la più adottata è quella basata sull'impiego del calore, sia nella forma «umida» che «secca». Nel primo caso viene utilizzata l'autoclave che opera, per questo scopo, ad una temperatura di 121 °C e ad una pressione di 6.8 kg (16 lb). Mantenendo queste condizioni per un intervallo di tempo di 10-15', tutti i microorganismi, comprese le loro eventuali spore, sono uccisi. Un altro metodo è dato dalla bollitura che, in genere eseguita per 5-10', consente la distruzione delle forme vegetative ma che, pure se protratta per 16 ore, non elimina quelle quiescenti. Il calore secco è raramente usato per queste diete anche se presenta il vantaggio di provocare una denaturazione delle proteine meno rapida.

Comunque, in tutti i casi, l'operare a temperature così elevate provoca un'alterazione profonda delle caratteristiche fisico-chimiche della dieta, oltre che disattivare completamente ingredienti come, ad esempio, le vitamine. Per ovviare a questo inconveniente le sostanze termolabili sono state spesso sterilizzate con altri metodi, fra cui il più pratico è quello della filtrosterilizzazione. I filtri sono costruiti in modo da trattenere tutte le sostanze aventi dimensioni maggiori di 0.22  $\mu$ <sup>(4)</sup>, bloccando quindi anche i vari microorganismi. I vantaggi di un trattamento di ordine fisico, rispetto all'impiego di antimicrobici, sono riassumibili in due punti:

a) l'insetto allevato non è colpito da queste sostanze che sovente risultano tossiche;

b) viene evitata qualsiasi forma di resistenza da parte dei microorganismi, che spesso è indotta dall'uso protratto soprattutto degli antibiotici.

Sfortunatamente la sola adozione dei sistemi fisici molto raramente si è dimostrata sufficiente per il controllo della microflora dannosa, per cui il ricorso alle sostanze chimiche è stato spesso inevitabile.

Secondo Singh e Bucher (1971) i composti antimicrobici devono essere scelti attentamente tenendo conto delle specie contaminanti e del grado di tolleranza manifestato dall'insetto.

---

<sup>(4)</sup> In commercio si trovano filtri anche con pori di dimensioni maggiori, come ad es. quelli da 0.45  $\mu$ , che però, pur presentando una maggior robustezza, non garantiscono una completa sterilizzazione.

Singh e House (1970a) hanno sperimentato 21 sostanze (tra cui, per citare le più significative, aureomicina, cloromicetina, metilparaidrossibenzoato, penicillina, sorbato di potassio e formalina) nel substrato per *A. affinis*, concludendo che ognuna di queste esercitava un effetto negativo sul parassitoide in funzione della sua concentrazione. Essi hanno definito come «safe level» di un composto quella concentrazione che non provoca la riduzione della resa in pupe ed adulti e non prolunga il ciclo di sviluppo oltre il 25% del tempo impiegato dalla stessa specie allevata su dieta «test».

Grenier (1977), puntualizzando quanto i Tachinidi siano sensibili a numerose sostanze, ha dimostrato che il metilparaidrossibenzoato, addizionato nella dieta allo 0.04%, provocava la morte delle giovani larvette in meno di due ore.

Nettles *et al.* (1980), invece, hanno riportato che le larve di *E. bryani* erano estremamente tolleranti nei confronti degli antibiotici (cannamicina e penicillina), sostenendo come anche questa caratteristica sia favorevole per un'eventuale allevamento massale.

Bratti e Monti (1988) hanno addizionato solfato di gentamicina allo 0.006% in substrati sub-naturali per l'allevamento di *Pseudogonia rufifrons*, notando che l'assenza dell'antibiotico provocava una degenerazione della dieta impedendo così all'entomofago di svilupparsi. Essi inoltre hanno aumentato le dosi fino a concentrazioni dello 0.1% non constatando nessun effetto negativo sulle larve, se non un leggero prolungamento dei tempi di sviluppo per altro non statisticamente significativo. La necessità di adoperare sostanze antibatteriche, qualora si operi in condizioni di parziale asepsi, è stata ribadita da Bratti (1989) che, pur utilizzando emolinfia filtrosterilizzata e materiale biologico (costituito da L<sub>1</sub> di *Pseudogonia*) disinfettato mediante un bagno in formalina, per evitare proliferazione batteriche, ha dovuto addizionare lo 0.01% di solfato di gentamicina.

Xie *et al.* (1986b), sperimentando vari prodotti nella dieta per *T. pretiosum*, hanno rilevato che concentrazioni di acido sorbico e metilparaidrossibenzoato, rispettivamente dello 0.5-2.0% e 0.1-0.4%, impedivano la schiusa delle uova, mentre lo 0.5% di cannamicina, lo 0.15% di gentamicina, lo 0.5% di streptomomicina e 30 g/ml di anfotericina B non interferivano negativamente sullo sviluppo dell'oofago.

Yazgan (1972) ha notato che i numerosi microorganismi che si sviluppavano nella dieta erano tossici per le larve e che un loro controllo era possibile addizionando nel medium Triburon e solfato di streptomomicina. Quest'ultimo antibiotico è stato utilizzato con successo, alla dose di 50 mg/100 ml di dieta, nei substrati sperimentati per *B. intermedia* (Thompson, 1980) oltre che, insieme con solfato di penicillina, in quelli messi a punto per *L. fabarum* (Rotundo *et al.*, 1988).

Un altro antibatterico che, grazie al suo ampio spettro di azione, è stato impiegato frequentemente nei substrati per Imenotteri parassitoidi è il solfato di gentamicina. Greany (1986) lo ha addizionato alle diete per due Braconidi, in misura di 50 µg/ml, non riportando alcuna manifestazione tossica.

Gli agenti contaminanti, oltre che dalla dieta e dall'ambiente, derivano so-

vente dallo stesso materiale biologico, sia che esso provenga da larve o da femmine dissezionate, sia che venga deposto direttamente nella dieta.

Nel primo caso sono state utilizzate diverse soluzioni disinfettanti immergendovi larve o uova, ovvero gli ospiti parassitizzati. Yazgan (1972) e Yazgan e House (1970) per le uova di *I. conquisitor* hanno adoperato la soluzione di White, composta da 0.25 g di HgCl<sub>2</sub>; 6.5 g di NaCl; 1.25 ml di HCl; 250 ml di alcool etilico e 750 ml di acqua distillata.

Thompson (1980; 1981b) ha immerso, per circa 2', le uova di *Brachymeria* spp. in una soluzione di HgCl<sub>2</sub>, provvedendo poi a risciacquarle in acqua sterile.

Strand e Vinson (1985) e Strand *et al.* (1988) hanno trattato le uova superparassitizzate degli ospiti di due oofagi mediante un bagno in ipoclorito di sodio al 2 e 10%. Il medesimo disinfettante è stato adottato da Rotundo *et al.* (1988), per trattare gli afidi da cui si sono estratte le larve di *L. fabarum*, e da Hoffman *et al.* (1974) per le pupe alberganti le uova di *P. puparum*. In quest'ultimo caso gli Autori hanno predisposto una soluzione di NaOCl allo 0.5%, neutralizzata con tiosolfato, in cui hanno immerso le crisalidi per circa 15'.

House (1954a), Grenier *et al.* (1974; 1975; 1978) e Ding *et al.* (1980), hanno disinfettato le femmine gravide dei rispettivi parassitoidi prima di sottoporle a dissezione. Il primo ha usato formalina al 2.5%, mantenendovi le larvette dell'entomofago per 5' prima di trasferirle sopra il substrato, gli altri invece hanno impiegato rispettivamente una soluzione composta dal 75% di alcool etilico e dal 10% di Cetavlon e una composta dal 70% di alcool etilico e dal 2% di NaOCl. L'etanolo è stato impiegato con successo anche da Greany (1986); egli ha trattato le larve ospiti dapprima con una soluzione al 95% e poi con una al 70% (per 5' circa), risciacquandole immediatamente con acqua sterile.

Nettles *et al.* (1980) hanno adottato una tecnica più complessa, trattando oltre che le larvette del Tachinide *E. bryani* con un bagno di formalina al 2%, anche le femmine dei parassitoidi larvideponenti. L'operazione è stata eseguita mettendo nelle gabbie degli adulti una soluzione acquosa di cloranfenicolo, di cui essi si abbeveravano, impedendo così la trasmissione delle eventuali infezioni batteriche durante la parassitizzazione.

La trasmissione dei patogeni da parte delle femmine deponenti è una delle cause maggiori di contaminazione quando si utilizzano substrati di deposizione che sono anche le diete su cui l'entomofago si sviluppa. Per ovviare a questo problema House (1978), per *I. conquisitor*, ha costruito delle capsule di paraffina contenenti una soluzione di Triburon allo 0.1%. Egli, dopo averle immerse per numerose ore in una soluzione di ipoclorito, le ha introdotte in una gabbia contenente le femmine gravide. Ognuna di queste, dopo che aveva inserito il proprio ovidepositore, era immediatamente trasferita in un'altra gabbia contenente capsule simili ma ripiene di dieta. Xie *et al.* (1986b), sperimentando vari metodi per l'allevamento di *T. pretiosum*, hanno messo in evidenza che, qualora si adoperino uova artificiali per la raccolta dei germi, è necessario lavare accuratamente la superficie di queste con detergenti e acqua sterile in quanto la sempli-

ce addizione di antimicrobici nella dieta non è sufficiente a contenere il proliferare delle colonie batteriche.

### 8. TECNICHE DI PREPARAZIONE DELLE DIETE

Oltre alla qualità e al dosaggio degli elementi che compongono una dieta, è indispensabile conoscere come essa viene preparata, poiché spesso le modalità di preparazione possono essere fondamentali per il substrato e quindi per il successo dell'allevamento dell'entomofago. In questa fase, un ruolo molto importante è costituito dalle interazioni fisico chimiche fra i vari componenti che portano a fenomeni come processi di precipitazione, chelazioni, assorbimenti, formazione di complessi non desiderati, etc. che devono assolutamente essere evitati.

#### 8.1 Diete subnaturali.

I due elementi che maggiormente sono adoperati in questo tipo di diete sono stati gli omogeneizzati di pupe e l'emolinfa. Quest'ultima, nei primi lavori effettuati da Bouletrau (1968; 1972), è stata estratta, mediante una piccola incisione tegumentale, da crisalidi in diapausa di *P. brassicae* e posta direttamente nei relativi contenitori senza subire nessun tipo di trattamento. Così facendo il liquido, una volta esposto all'aria atmosferica, andava incontro a processi di ossidazione imbrunendo molto rapidamente. Per evitare questo fenomeno, che avrebbe potuto nuocere ai parassitoidi, Hoffman *et al.* (1973) hanno applicato una tecnica che consisteva nel sottoporre le larve, da cui si estraeva l'emolinfa, ad un bagno in acqua calda a 60 °C per 6', inibendo così gli enzimi preposti alla melanizzazione. In seguito l'emolinfa veniva raccolta in appositi contenitori, effettuando l'amputazione delle zampe toraciche delle larve, per essere poi centrifugata, al fine di togliere gli emociti e le altre particelle, ad una velocità di 23000 giri/min per 30' a 5 °C. Il liquido ottenuto era quindi filtrato (attraverso filtri da 0.3µ) per eliminare eventuali microorganismi e diluito con acqua sterile.

Un sistema simile è stato adottato da Greany (1986) nella preparazione delle diete per due Braconidi. Egli, dopo aver notato che la feniltiourea (agente antiossidante) a dosi maggiori dello 0.005 % era tossica per i parassitoidi, ha applicato il calore per disattivare l'attività fenolossidasi nell'emolinfa. Bratti (1989) ha ottenuto un liquido a base di emolinfa centrifugando per 12-15' dell'omogeneizzato di pupe di *Galleria* previamente trattato con calore per impedire la reazione di ossidazione. Il substrato, sterilizzato mediante filtri con pori da 0.45 µ e addizionato con solfato di gentamicina, ha permesso di allevare con buon successo le L<sub>1</sub> di *P. rufifrons*. Una tecnica analoga alle precedenti è stata eseguita da Xie *et al.* (1986a), i quali però non hanno eseguito nè la centrifugazione, nè la filtrazione, poiché, secondo gli Autori, tali operazioni causerebbero una perdita delle caratteristiche chimiche del liquido nutritizio.

Gli omogeneizzati di crisalidi hanno presentato qualche difficoltà in più nella preparazione rispetto all'emolinfa, poiché, oltre ad essere sterilizzati mediante alte temperature e quindi restare alterati profondamente nelle loro caratteristiche fisico-chimiche, dovevano essere privati del materiale grossolano (residui di cuticola, etc.) che avrebbe interferito negativamente sulla crescita e lo sviluppo dell'entomofago.

Tersac e Guerdox (1981), per l'ovideposizione di *P. instigator*, hanno impiegato un liquido opalescente costituito da un estratto acquoso derivato dall'omogeneizzazione di 1 g di crisalidi mescolato a 2 g di acqua.

Per bloccare le fenolossidasi e per eliminare le particelle solide, gli Autori hanno riposto l'omogeneizzato a bagno maria a 100 °C per 10' e successivamente l'hanno filtrato, mettendolo infine a sterilizzare in autoclave per 10' a 120 °C. In seguito, Awuitor *et al.* (1984) hanno predisposto, per lo stesso parassitoide, una dieta formata da un liquido denso proveniente dallo schiacciamento delle pupe dell'ospite, effettuato mediante una siringa. Il liquido raccolto, privo dei residui cuticolari, è stato posto in provette (1.5 cm x 5 cm) e autoclavato per 20' a 120 °C. Un sistema analogo è stato adottato da Bratti e Monti (1988) nella preparazione del substrato su cui si è sviluppato da L<sub>1</sub> ad adulto il Tachinide *P. rufifrons*. L'unica differenza è che questi ultimi Autori non hanno sterilizzato l'omogeneizzato, aggiungendo un antibiotico per contenere la contaminazione batterica.

## 8.2 Diete olidiche e meridiche.

La complessità di queste diete, dovuta al numero elevato di costituenti, è un elemento che condiziona notevolmente la loro preparazione. I procedimenti adottati dai vari Autori sono stati numerosi variando notevolmente in funzione delle esigenze delle singole specie.

House (1954a) ha diviso i componenti nutrizionali in due parti; la prima era costituita da una soluzione acquosa di sali minerali e aminoacidi, a cui è stato aggiunto una sospensione di colesterolo, disciolto in alcool etilico a 95°, e Tween 80. L'altra era composta da vitamine e zuccheri in soluzione. Prima di mescolare i due gruppi di sostanze e di aggiungere la sospensione di agar, l'Autore ha portato, mediante una soluzione 2N di NaOH, il pH a valori attorno a 6. La prima parte con l'agar, data la maggior stabilità dei suoi ingredienti, è stata sterilizzata in autoclave mentre la seconda è stata filtrata. Il tutto è stato in seguito mescolato all'interno di una beuta e quindi versato nei contenitori.

Una metodologia simile è stata adottata da Yazgan (1972; 1981) per la preparazione di due diete meridiche, con l'unica differenza data dalla preparazione dei lipidi. Egli infatti ha disciolto il colesterolo e gli altri acidi grassi insieme a Tween 80 in acqua calda all'interno di un omogenizzatore Virtis, funzionante ad una velocità di 22500 rpm per 5'. La sospensione è stata conservata sotto N<sub>2</sub> in refrigeratore per poi essere riscaldata a bagno maria prima di essere addizionata nella dieta.

Thompson (1975) ha predisposto delle soluzioni di base per i diversi ingredienti: aminoacidi e proteine, conservate a  $-10^{\circ}\text{C}$ ; lipidi, sciolti in acetone e conservati a  $-5^{\circ}\text{C}$ ; glucosio, filtrato e conservato a temperatura ambiente; sali minerali, preparati in tre soluzioni madre per evitare fenomeni di precipitazione. In seguito egli ha prelevato una piccola aliquota di lipidi e, dopo aver fatto evaporare l'acetone, ha addizionato Tween 80 e KOH per garantire una dispersione omogenea degli ingredienti e aggiustare il pH. La sospensione è stata poi mescolata con la soluzione aminoacidica, opportunamente scaldata, e autoclavata a  $121^{\circ}\text{C}$  per 15'. La dieta, una volta raffreddata, è stata completata con le altre soluzioni filtrosterilizzate e con l'eventuale addizione di albumina, autoclavata nella forma polverulenta dai 20 ai 40'.

Una tecnica diversa è stata quella adottata da Nettles (1986b) nella preparazione e sterilizzazione della dieta meridica di *E. bryani*. L'Autore ha disciolto tutti gli ingredienti in acqua meno la frazione lipidica che è stata solubilizzata in etere, in seguito fatto evaporare mediante azoto, e emulsionata con Tween 80 e acqua. Egli poi, dopo aver addizionato agar, farina di soia e eventuali altri ingredienti, ha versato, in beute da 125 cc, 45 cc della soluzione nutritiva e 5 cc della sospensione dei lipidi. Quindi, aggiustato il pH a 6.75 e scaldata la dieta fino a bollitura, ha sterilizzato il tutto in autoclave (10' a  $120^{\circ}\text{C}$ ).

### 8.3 Diete oligidiche.

La preparazione di queste diete non presenta difficoltà particolari in quanto esse sono costituite da pochi ingredienti. Fino ad oggi quelle che hanno avuto più successo sono state utilizzate per l'allevamento di specie oofaghe. Queste sono composte in parte da emolinfa o omogeneizzato della specie ospite (20-50%) mescolati con ingredienti quali latte in polvere e tuorlo d'uovo.

Xie *et al.* (1986a) hanno messo a punto un substrato per *Trichogramma* spp. su cui sono stati allevati anche alcuni Braconidi, in cui all'emolinfa, trattata con procedimento fisico, veniva addizionata una sospensione di latte in polvere (bollita per 15' e continuamente mescolata) e tuorlo d'uovo fresco. Usando questo procedimento, nessun ingrediente era sterilizzato per cui diventava fondamentale l'uso di agenti battericidi. La dieta è stata in seguito arricchita aggiungendo succo d'uovo di *M. sexta*; queste uova, oltre ad essere voluminose e conservabili a basse temperature per un lungo periodo di tempo, presentavano il vantaggio di possedere dei liquidi interni che, una volta liberati dal chorion, non andavano incontro a processi di ossidazione e di conseguenza non necessitavano di nessun trattamento fisico-chimico. Questo aspetto è molto importante poichè consente ai succhi di mantenere inalterate le proprie caratteristiche nutrizionali e il risultato più evidente è dato dal fatto che, la loro presenza nelle diete, ha permesso di ottenere altissime percentuali di adulti. Bratti e Nettles (1988) hanno adottato per le larve del Tachinide *P. laxa* una dieta oligidica composta dal 20-25% di residuo della lavorazione della soia che, dato l'elevato contenuto in fibre, ha svolto anche funzione di supporto fisico. In questo modo la restante parte della

dieta, costituita da emolinfa di larve di *M.sexta*, è stata assorbita completamente costituendo un'ambiente favorevole per lo sviluppo dell'entomofago.

Altri substrati che sono stati utilizzati inizialmente, e che avevano fatto ben sperare per l'allevamento massale dei parassitoidi, erano quelli costituiti da parti o dalla lavorazione di organi di animali domestici, come ad esempio la dieta formulata da Bronskill e House (1957) per l'icneumonide *P. turionellae*, formata da omogeneizzato di fegato di maiale mescolato in parti uguali con una soluzione salina.

Purtroppo solo questa specie e alcuni Sarcofagidi sono cresciuti con qualche successo per cui, dati i numerosi tentativi falliti, questi economici substrati sono stati parzialmente abbandonati.

## 9. SISTEMI DI ALLEVAMENTO

L'allevamento dei parassitoidi *in vitro* richiede un insieme di metodi, a volte originali e molto variabili, in funzione soprattutto delle singole specie su cui si opera. I fattori da considerare sono numerosi e tra i più importanti vi sono: la consistenza della dieta, la taglia dell'entomofago, la durata del suo ciclo e le esigenze respiratorie.

### 9.1 Ditteri.

House (1954a) per le larve di *A. affinis* ha utilizzato, come contenitori, provette disposte in posizione orizzontale deposte in armadi climatizzati ad una temperatura di 23 °C e U.R. del 60% al buio completo. Per la dieta su cui è stata allevata questa specie, la temperatura aveva un'influenza considerevole, infatti egli ha dimostrato che variando questo parametro cambiava la validità del substrato; così il valore nutritivo di due diete poteva invertirsi, nel senso che mentre a temperature elevate era superiore l'una, a basse era superiore l'altra (House, 1972b).

Grenier *et al.* (1974) hanno dispensato le larvette di *P. caudata* in gocce di dieta isolate, all'interno di capsule Petri di vetro appositamente sigillate con paraffina. Gli stessi Autori (1978) hanno adoperato per *L. diatreae* capsule Petri contenenti circa 1 ml di dieta e ricoperte, al fine di evitare la migrazione dei planidi, da uno strato di parafilm bucato per consentire lo scambio gassoso. Le condizioni di temperatura per ambedue le specie sono state di 22 °C mentre un'elevata U.R. è stata ottenuta, introducendo nei contenitori un tampone salivare imbevuto in una soluzione di acido citrico 0.4 M. Per i due Tachinidi i recipienti costituiti da materiale plastico si sono rivelati non idonei poichè hanno rivelato un certo grado di tossicità. Tale fenomeno non si è invece manifestato per le larvette di *E. bryani*, allevate in gruppi di tre in capsule Petri di polistirene contenenti la dieta. In questo caso la crescita e lo sviluppo delle larve è stato realizzato ad una temperatura di 29 °C ed ad un'U.R. del 90% (Nettles,

1986b). Bratti e Monti (1988), Bratti e Nettles (1988) e Bratti (1989) hanno utilizzato dei contenitori a microcelle sia con 96 che 24 pozzetti per l'allevamento di *Pseudogonia rufifrons*, *Palexorista laxa* e *E.bryani*. I recipienti, una volta posti la dieta e il materiale biologico, sono stati mantenuti in ambienti climatizzati ad una temperatura di 27-28 °C ed una U.R. prossima al 95%.

## 9.2 Imenotteri.

Per gli Imenotteri oofagi sono state utilizzate diverse tecniche; la prima, in ordine cronologico, è stata quella messa a punto da Hoffman *et al.* (1975) per *T. pretiosum*. L'entomofago, una volta estratto dall'ospite, è stato posto sopra un pezzetto di carta da filtro imbevuto di dieta all'interno di una capsula Petri sigillata. La temperatura si aggirava sui 27 °C e la U.R. era prossima al 100%, mentre l'illuminazione era mantenuta costante per tutto l'arco della sperimentazione. Dopo 24-96 ore gli Autori provvedevano a togliere, mediante pipette, il liquido in eccesso consentendo così l'impupamento dell'oofago. Successivamente Guan *et al.*, (1978) hanno utilizzato il metodo della «goccia sospesa». Esso consisteva nel porre la dieta in gocce sopra un piccolo vetrino, il quale veniva ribaltato e sigillato, tramite paraffina, con la faccia interna rivolta verso il basso sopra un vetrino concavo. La goccia così, grazie alla tensione superficiale, rimaneva pendente, garantendo all'oofago uno scambio gassoso ed un'U.R. elevata. Questa tecnica è stata impiegata anche da Bouletrau (1968; 1972) per *P. puparum*. Lo Pteromalide è stato così allevato fino allo stato adulto ad una temperatura di 25 °C e con fotoperiodo 14:10.

Sempre per *Trichogramma* spp., Xie *et al.* (1986b) hanno sperimentato tre metodi basati sull'uso di contenitori diversi:

- a) contenitori a microcelle forniti di 10 µl di dieta;
- b) capsule Petri di polistirene (diam. di 5 cm.), in cui sono state dispensate 5 gocce di 15 µl ciascuna;
- c) capsule Petri di polistirene (diam. di 5 cm) riempite con 1.2 ml di dieta.

Con le prime due tecniche si aveva il vantaggio di limitare il diffondersi di contaminazioni microbiche, mentre con la terza si potevano allevare più parassitoidi per unità di superficie occupata. In tutti e tre i casi la temperatura è stata mantenuta sui 27 °C mentre l'U.R. è variata in funzione del metodo usato; infatti nel caso delle capsule Petri, l'U.R. inizialmente era portata al 95% per poi farla decrescere all'80-85% in prossimità dell'impupamento. Contemporaneamente veniva tolto il liquido in eccesso mediante pipette opportunamente modellate.

Un sistema più complesso è stato utilizzato per *T. schoenobii* da Ding *et al.* (1980). Dapprima essi hanno messo in coltura gli ovari con il metodo della «goccia sospesa», poi hanno trasferito le larvette (in numero di 2-3) in gocce di dieta all'interno di capsule Petri sigillate per mantenere un'U.R. prossima al 100%, infine le stesse, dopo 5-6 giorni, sono state poste in provette chiuse con cotone ad una temperatura di 26 °C ed U.R. del 80-90%.

Tecniche simili sono state impiegate da Hoffman *et al.* (1973) e Thompson (1981b) per due endoparassitoidi pupali. Gli Autori hanno adottato contenitori a microcelle, mantenendo un'U.R. del 100% fino al termine dello sviluppo larvale. Lo stesso tipo di recipiente è stato adottato da Greany (1986) per l'allevamento delle larve di I età di *C. marginiventris* e *M. croceipes* e da Rotundo *et al.* (1988) per quelle di *L. fabarum*. Le celle sono state riempite rispettivamente con 0.1 ml e 0.05 ml di dieta e mantenute ad un'U.R. del 65% e 95% e ad una temperatura di 25-26 °C in completa oscurità.

Risultati soddisfacenti sono stati ottenuti per *I. conquisitor*, *P. turionellae*, *E. roborator* e *P. instigator* con l'impiego di provette di varie dimensioni chiuse con tappo di cotone. Per tutte queste specie la temperatura è stata mantenuta attorno ai 22-23 °C e l'U.R. al 60-70% in completa oscurità.

Ad eccezione di *Trichogramma* spp., tutti i parassitoidi sono stati allevati o individualmente o a piccoli gruppi onde evitare eventuali fenomeni di cannibalismo e limitare le perdite in caso di gravi epizozie.

#### RIASSUNTO

Il presente lavoro, riguardante l'allevamento *in vitro* degli stadi larvali degli insetti entomofagi parassitoidi, è stato suddiviso in due parti.

Nella prima è stata considerata l'importanza dell'allevamento *in vitro* dei parassitoidi per una loro eventuale moltiplicazione massale. In seguito è stato fatto il punto sulla situazione indicando le specie le cui larve sono state allevate con un certo successo su diete artificiali.

Nella seconda parte sono state prese in considerazione le tecniche di allevamento, ponendo particolare attenzione sugli aspetti pratici che determinano la scelta del materiale biologico e la preparazione delle diete.

È stata eseguita una classificazione delle diete, definendone gli ingredienti e puntualizzando la loro importanza per la crescita e lo sviluppo dei parassitoidi. Si sono quindi considerate le metodologie per la raccolta del materiale biologico da porre in allevamento, mettendo in rilievo l'importanza di disporre di elevate quantità di uova o di larve di I età, al fine di effettuare test rapidi per l'identificazione delle diete ottimali. In seguito, oltre agli aspetti nutrizionali, sono stati analizzati anche quelli più propriamente fisici, che assumono per i parassitoidi un'importanza particolare data la speciale struttura del loro canale alimentare e le difficoltà di carattere respiratorio che incontrano una volta fuori dall'ambiente vivente.

Per finire si sono considerate le metodologie chimico fisiche per il controllo dei microorganismi che inquinano l'ambiente e i vari substrati. Queste tecniche, infatti, richiedono condizioni di asepsi molto rigorose e l'utilizzo di materiale, quando sia possibile, sterile.

Dall'esame dei numerosi reperti bibliografici è emerso che l'allevamento degli entomofagi parassitoidi *in vitro* è una tecnica impiegata soprattutto a livello sperimentale per studi sulla nutrizione e sugli aspetti fisiologici legati alla simbiosi ospite-parassita. Le diete che sono state sviluppate fino ad oggi sono principalmente di tipo olidico e meridico e quindi molto complesse da preparare oltre che costose. Un'eccezione a questa situazione è rappresentata dall'allevamento di *Trichogramma* spp. e del Dittero Tachinide *Eucelatoria bryani* Sab. Per gli oofagi, che presentano caratteristiche biologiche in generale molto favorevoli per l'applicazione di questa tecnica, sono state messe a punto diete oligidiche semplici che consentono di ottenere percentuali di adulti molto elevate. Inoltre sono le uniche specie che, per il momento, possono essere allevate su dieta artificiale a ciclo continuo. Il Dittero *E. bryani*, allevato su dieta meridica, mostra una certa facilità a crescere e svilupparsi su substrati di sintesi, anche se manifesta caratteristiche vitali inferiori rispetto ai conspecifici allevati *in vivo*.

In definitiva pare che la produzione massale di alcune specie di parassitoidi sia un obiettivo reale e non teorico e che di conseguenza, in futuro, maggior attenzione debba essere rivolta al perfezionamento delle tecniche che, come risulta da questo lavoro, sono ancora relativamente poco sviluppate rispetto alle esigenze che un settore così complesso richiede.

### *In Vitro* Rearing Techniques For Entomophagous Parasitoids

#### SUMMARY

This survey consists of two parts. The first emphasis the importance of *in vitro* parasitoid rearing for eventual mass rearing. It then discusses those species whose larvae have been reared with varying degrees of success on artificial diets.

The second part reviews rearing techniques focusing on the practical issues that determine the choice of the ingredients and the biological material. Diets are classified according to their ingredients, and their importance in parasitoid growth and development is discussed. This is followed by a review of the methods employed in collecting the biological material for rearing, underscoring the importance of an adequate, i.e. high number, supply of eggs or first instar larvae for rapid testing of diets.

The author then examines, in addition to nutritional aspects, the physical properties of diets. They are particularly important for parasitoids given the particular structure of their digestive tract and the respiratory problems they face when outside the host environment.

The survey concludes with discussing of the chemico-physical methods of controlling microorganism contamination of the environment and diets. These techniques require strict aseptic conditions and where possible sterile material.

A review of the extensive literature reveals that the *in vitro* rearing of entomophagous parasitoids is above all an experimental technique employed in studies of nutrition and of those physiological aspects linked to host-parasitoid symbiosis. The diets developed to date are mainly olidic and meridic, i.e. of complicated preparation and costly. One exception to this rule is the rearing of *Trichogramma* spp. and of the Diptera Tachinidae *Eucelatoria bryani* Sab. For the former species whose characteristics are generally favourable to this technique, simple oligidic diets have been developed which are capable of yielding high percentages of adults. They are also the only one that at present can be reared continuously on artificial diet. The Tachinid *Eucelatoria bryani* reared on a meridic diet shows a certain facility of growth and development on artificial media, although it evidences poorer vital parameters compared to parasitoids of the same species reared *in vivo*.

It would appear that the mass rearing of certain parasitoid species is a real rather than theoretical possibility. Greater attention in the future should therefore be paid to perfecting techniques that, as this survey reveals, are still relatively undeveloped in comparison to the demands of such a complex field of study.

#### BIBLIOGRAFIA CITATA

- ARTHUR A. P., COPPEL H. C., 1953. - Studies on dipterous parasites of the spruce budworm *Choristoneura fumiferana* (Chem.) (Lep. Tortricidae) I. *Sarcophaga aldrichi* (Park) (Dip. Sarcophagidae). - *Can. J. Zool.*, 31: 374-391.
- 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.
- AWUITOR K., MASSELOT M., TERSAC J., 1984. - *In vitro* rearing of *Pimpla instigator* (Hym.: Ichneumonidae). 2. Completion of development in semi-artificial conditions. - *Entomophaga*, 29: 331-339.
- BARONIO P., SEHNAL F., 1980. - Dependence of the parasitoid *Gonia cinerascens* Rond. on the hormones of its lepidopterous hosts. - *J. Insect Physiol.*, 26: 619-626.

- BONNOT G., DELOBEL B., 1970. - Etude de la nutrition azotée de *Phryxe caudata* R. tachinaire parasite de *Thaumetopoea pityocampa*. I. Comparaison des aminoacidémies de deux Hotes possibles: *T. pityocampa* et *G. mellonella* a différents stades physiologiques. - *Ann. Zool. - Ecol. anim.*, 2: 595-605.
- BONNOT G., DELOBEL B., GRENIER S., 1976. - Composition corporelle en acides aminés du parasitoïde *Phryxe caudata* (Diptera) au cours de sa croissance larvaire. - *J. Insect Physiol.*, 22: 505-514.
- BONNOT G., DELOBEL B., GRENIER S., 1984. - Elevage, croissance et développement de *Phryxe caudata* Rond. (Diptera: Tachinidae), sur son hôte de substitution *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera) et sur milieux artificiels. - *Bull. mens. Soc. linn. Lyon*, 53(9): 313-320.
- BOULETREAU M., 1968. - Premiers résultats de l'élevage des larves d'un Hyménoptère Chalcidien (*Pteromalus puparum* L.) sur hémolymphe de Lépidoptère. - *Entomophaga*, 13: 217-222.
- BOULETREAU M., 1972. - Développement et croissance larvaires en conditions semi-artificielles et artificielles chez un Hyménoptère entomophage: *Pteromalus puparum* L. (Chalc.). - *Entomophaga*, 17: 265-273.
- BOULETREAU M., 1975. - Aspects nutritionnels de la spécificité parasitaire chez *Pteromalus puparum* (Hym.: Chalcididae). - *Entomophaga*, 20: 193-199.
- BRATTI A., 1989. - Allevamento «in vitro» degli stadi larvali dei Ditteri Tachinidi. - Tesi di Dottorato di ricerca in Entomologia Agraria. Univ. di Bologna 1.233 pp.
- 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.
- BRONSKILL J. F., HOUSE H. L., 1957. - Notes on rearing a pupal endoparasite, *Pimpla turionellae* (L.) (Hymenoptera: Ichneumonidae), on unnatural food. - *Can. Entomol.*, 89: 483.
- CAMPADELLI G., DINDO M. L., 1987. - Recenti progressi nelle diete artificiali per l'allevamento di insetti entomofagi parassiti. - *Boll. Ist. Ent. «G. Grandi» Univ. Bologna*, 42: 101-118.
- COOPERATIVE RESEARCH GROUP OF ARTIFICIAL HOST EGG OF TRICHOGRAMMA, HUBEI PROVINCE, 1979. - Studies on the artificial host egg of the endoparasitoid wasp *Trichogramma*. - *Acta Entomol. Sin.*, 22: 301-309.
- COOPERATIVE RESEARCH GROUP OF ARTIFICIAL HOST EGG OF TRICHOGRAMMA, HUBEI PROVINCE, 1985. - Study on artificial host egg-EII for *Trichogramma*. - *J. Wuhan Univ.*, 4: 1-10.
- COUNCIL ON ENVIRONMENTAL QUALITY, 1972. - Integrated Pest Management. U. S. Government Printing Office Stock Number 4111-0010, 41 pp.
- DADD R. H., 1977. - Qualitative requirements and utilization of nutrients: insects. In: Handbook Series in Nutrition and Food. Section D, Vol. 1. Nutritional Requirements. Edited by M. Rechcigl, pp. 305-346, CRC Press, Cleveland.
- DADD R. H., 1985. - Nutrition: Organisms. In: Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology (eds. G. A. Kerkut and L.I. Gilbert) Vol. 4, pp. 305-346, CRC Press, Cleveland.
- DEBACH P., 1974. - Biological Control by Natural Enemies. Cambridge Univ. Press, London, 323 pp. 77
- DELOBEL B., BONNOT G., 1976. - Présence de alanyltyrosine chez le diptère tachinaire *Phryxe caudata* Rond. importance relative des acides aminés libres, peptidiques et protéiques. - *Ann. Zool. - Ecol. anim.*, 8: 493-497.
- DING H. C., QUI H. G., HWANG C.B., 1980. - *In vitro* rearing of an egg parasitoid, *Tetrastichus schoenobii* Ferriere (Hymenoptera: Tetrastichidae). - *Contributions Shanghai Inst. Entomol.*, 1: 55-59.
- DJERASSI C., SHIH-COLEMAN C., DUKMAN J., 1974. - Insect control of the future: Operational and policy aspects. - *Science*, 186: 596-608.
- DOUGHERTY E. C., 1959. - Introduction to axenic culture of invertebrate metazoa: a goal. - *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 77: 27-54.

- FANTI P., 1990. - Fattori ormonali inducenti la prima muta larvale del parassitoide *Pseudogonia rufifrons* Wied. (Diptera Tachinidae) su substrati di crescita *in vivo* e *in vitro*. - *Boll. Ist. Ent. «Guido Grandi» Univ. Bologna*, 45: in corso di stampa.
- FANTI P., BRATTI A., 1988. - Sulla possibilità di mute precoci di *Pseudogonia rufifrons* Wied. (Diptera: Tachinidae) in larve immature di *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera Galleridae). - *Boll. Ist. Ent. «Guido Grandi» Univ. Bologna*, 43: 127-137.
- FISHER R. C., 1971. - Aspects of the physiology of endoparasitic Hymenoptera. *Biol. Rev.*, 46: 243-278.
- FLORKIN M., JEUNIAUX C., 1974. - Hemolymph: composition. - In: Rockstein M. - The physiology of insecta. Vol. 5, 2 ed., 255-307.
- FRIEND W. G., 1968. - The nutritional requirements of Diptera. In Radiation, Radioisotopes and Rearing Methods in the Control of Pest Insects. pp. 41-57. Proc. IAEA, Vienna.
- GAO Y. G., DAI K. J., SHONG L. C., 1982. - Studies on the artificial host egg for *Trichogramma*. - Les Trichogrammes Antibes (France), 20-23 Avril 1982. *Les Colloques de UNRA N°9*.
- GARDINER G. R., STOCKDALE H., 1975. - Two tissue culture media for production of lepidopteran cells and nuclear polyhedrosis viruses. - *J. Inv. Pathol.*, 25: 363-370.
- GOODWIN R. H., ADAMS J. R., 1980. - Nutrient factors influencing viral replication in serum-free insect cell line culture. - In: Invertebrate Systems In Vitro. Ed. by Kurstak E., Maramorosch K., Dübendorfer A., pp 493-509.
- GREANY P., 1980. - Growth and development of an insect parasitoid *in vitro*. - *Amer. Zool.*, 20: 946.
- GREANY P., 1981. - Culture of hymenopteran endoparasites *in vitro*. - *In Vitro*, 17: 230.
- GREANY P., 1986. - *In vitro* culture of hymenopterous larval endoparasitoids. - *J. Insect Physiol.*, 32: 409-419.
- GREANY P. D., FERKOVICH S. M., CLARK W. R., 1989. - Progress towards development of an artificial diet and an *in vitro* rearing system for *Microplitis croceipes*. - *South. Entomol.*, suppl. 12, 89-94.
- GREANY P. D., VINSON S. B., LEWIS W. J., 1984. - Insect parasitoids: finding new opportunities for biological control. - *Biosciences*, 34: 690-696.
- GRENIER S., 1977. - Effets nocifs de la Nipagine M sur le parasitoïde *Phryxe caudata* (Dipt., Tachinidae). - *Entomophaga*, 22: 223-236.
- GRENIER S., 1979. - Développement embryonnaire *in vitro*, en milieu artificiel défini de deux parasitoïdes ovolarvipares, *Phryxe caudata* et *Lixophaga diatraeae* (Diptera: Tachinidae). - *Entomol. exp. appl.*, 26: 13-23.
- GRENIER S., 1986. - Biologie ed physiologie des relations hôtes-parasitoïdes chez 3 tachinaires (Diptera, Tachinidae) d'intérêt agronomique. Développement en milieux artificiels. Lutte biologique. - Thèse présentée devant l'Institut National des Sciences Appliquées de Lyon et l'Université Claude Bernard Lyon 1. 156 pp.
- GRENIER S., BONNOT G., DELOBEL B., 1974. - Définition et mise au point de milieux artificiels pour l'élevage *in vitro* de *Phryxe caudata* Rond. (Diptera Tachinidae). I. Survie du parasitoïde sur milieux dont la composition est basée sur celle de l'hémolymph de l'hôte. - *Ann. Zool. - Ecol. anim.*, 6: 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. (Diptera, Tachinidae). II. Croissance et mues larvaires du parasitoïde en milieux définis. - *Ann. Zool. - Ecol. anim.*, 7: 13-25.
- GRENIER S., BONNOT G., DELOBEL B., LAVIOLETTE P., 1978. - Développement en milieu artificiel du parasitoïde *Lixophaga diatraeae* (Townsend) (Diptera, Tachinidae). Obtention de l'imago a partir de l'oeuf. - *C. R. Acad. Sc. Paris*, ser. D, 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 Ent. Sin.*, 21: 122.
- HINK F. W., 1972. - A catalog of invertebrate cell lines. - In Invertebrate Tissue Culture. Ed. by Vago, pp 363-387.

- 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., 1954a. - 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.
- HOUSE H. L., 1954b. - Nutritional studies with *Pseudosarcophaga affinis* (Fall.), a dipterous parasite of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Clem.). II. Effects of eleven vitamins on growth. - *Can. J. Zool.*, 32: 342-350.
- HOUSE H. L., 1954c. - Nutritional studies with *Pseudosarcophaga affinis* (Fall.) a dipterous parasite of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Clem.). III. Effect of nineteen aminoacids on growth. - *Can. J. Zool.*, 32:358-365.
- HOUSE H. L., 1966a. - The role of nutritional principles in biological control. - *Can. Ent.*, 98: 1121-1134.
- HOUSE H. L., 1966b. - Effects of varying the ratio between the amino acids and the other nutrients in conjunction with a salt mixture on the fly *Agria affinis* (Fall.). - *J. Insect Physiol.*, 12: 299-310.
- HOUSE H. L., 1966c. - Effects of vitamins E and A on growth and development, and the necessity of vitamin E for reproduction in the parasitoid *Agria affinis* (Fallen) (Diptera, Sarcophagidae). - *J. Insect Physiol.*, 12: 409-417.
- HOUSE H. L., 1967. - The role of nutritional factors in food selection and preference as related to larval nutrition of an insect, *Pseudosarcophaga affinis* (Diptera, Sarcophagidae), on synthetic diets. - *Can. Ent.*, 99: 1310-1321.
- HOUSE H. L., 1969. - Effects of different proportions of nutrients on insects. - *Ent. exp. & appl.*, 12: 651-669.
- HOUSE H. L., 1972a. - Insect nutrition. - In: Fiennes R. N. - *Biology of nutrition*, I.E.F.N., vol. 18, Pergamon Press, Oxford & New York, 517-573.
- HOUSE H.L., 1972b. - Inversion in the order of food superiority between temperatures affected by nutrient balance in the fly larva *Agria housei* (Diptera:Sarcophagidae). - *Can. Entomol.*,104:1559-1564.
- HOUSE H. L., 1974. - Nutrition. - In: Rockstein M. - *The physiology of insecta*. Vol. V., 2 ed., Academic Press, New York and London, 1-62.
- HOUSE H. L., 1977. - Nutrition of natural enemies. - In: Ridgway, Vinson S. B. - *Biological control by augmentation of natural enemies*. Plenum Press, New York, 151-182.
- 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.
- HOUSE H. L., BARLOW J. S., 1956. - Nutritional studies with *Pseudosarcophaga affinis* (Fall.), a dipterous parasite of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Clem.) V. Effects of various concentrations of the aminoacid mixture, dextrose, potassium ion, the salt mixture, and lard on growth and development; and a substitute for lard. - *Can. J. Zool.*, 34: 182-9.
- HOUSE H. L., BARLOW J. S., 1965. - The effect of a new salt mixture for *Agria affinis* (Fallen) (Diptera: Sarcophagidae) on the growth rate, body weight, and protein content of the larvae. - *J. Insect Physiol.*, 11: 915-918.
- HOUSE H. L., TRAEER M.G., 1948. - An artificial food for rearing *Pseudosarcophaga affinis* (Fall.), a parasite of the spruce budworm *Choristoneura fumiferana* (Clem.). - *79th Ann. Rept. Entomol. Soc. Ont.*, 1-4.
- HUFFAKER C. B., 1969. - *Biological Control*. Plenum Press/Rosetta Ed., New York, 511 pp.
- IRIE K., XIE Z. - N., NETTLES W. C. JR., MORRISON R. K., CHEN A. C., HOLMAN G. M., VINSON S. B., 1987. - The partial purification of a *Trichogramma pretiosum* pupation factor from hemolymph of *Manduca sexta*. - *Insect Biochem.*, 17: 269-275.

- JEUNIAUX C., 1971. - Hemolymph-Arthropoda. - In: Chemical Zoology. Ed. by Florkin H., Sheer B. T. Academic Press, New York, Vol. 6, pp. 63-118.
- KEILIN D., 1944. - Respiratory systems and respiratory adaptations in larvae and pupae of Diptera. - *Parasitology*, 36: 1-66.
- LAWRENCE P. O., 1986. - Host-parasite hormonal interactions: an overview. - *J. Insect Physiol.*, 32: 295-298.
- LIU W. H., XIE Z. N., XIAO G.F., ZHOU Z.F., OU YANK D.H., 1979. - Rearing of *Trichogramma dendrolimi* in artificial diets. - *Acta Phyto. Sin.*, 6: 17-24.
- 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.
- 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., 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., 1983. - L'ipotesi della dominazione ormonale, esercitata dagli ospiti sui parassitoidi, alla luce delle recenti scoperte nella endocrinologia degli insetti. - *Boll. Ist. Ent. «G. Grandi» Univ. Bologna*, 38: 135-166.
- 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.
- MITSUHASHI J., 1978. - Free amino acids in the haemolymph of some Lepidopterous insects. - *Appl. Ent. Zool.*, 13: 318-320.
- MITSUHASHI J., MARAMOROSCH K., 1964. - Leafhopper tissue culture: embryonic, nymphal, and imaginal tissues from aseptic insects. - *Contr. Boyce Thompson Inst.*, 22: 435-460.
- MORITOSHI N., 1936. - Digestive fluids of phytophagous insects and the hatching of the eggs of *Sturmia seicariae* Corn. *Oyo-Debuts. Zasshi*, 8: 20-27 (in R.A.E., 24:320).
- MORRISON R. K., NETTLES W. C. JR., BALL D., VINSON S. B., 1983. - Successful oviposition by *Trichogramma pretiosum* through a synthetic membrane. - *Southw. Entomol.*, 8: 248-251.
- MULLINS D. E., 1985. - Chemistry and physiology of the hemolymph. In: *Comp. Insect. Physiol. Bioch. and Pharmacology*. Ed by Kerkut G. A., Gilbert L. I. pp. 355-400.
- NENON J. - P., 1972. - Culture *in vitro* des larves d'un Hyménoptère endoparasite polyembryonnaire: *Ageniaspis fuscicollis*. Role des hormones de synthèse. - *C. R. Acad. Sc. Paris, ser. D*, 274: 3409-3412.
- NETTLES W. C. JR., 1986a. - Asparagine: a host chemical essential for the growth and development of *Eucelatoria bryani*, a tachinid parasitoid of *Heliothis* spp. - *Comp. Biochem. Physiol.*, 85A: 697-701.
- NETTLES W. C. JR., 1986b. - 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., 1987. - Amino acid requirements for growth and development of the tachinid *Eucelatoria bryani*. - *Comp. Biochem. Physiol.*, 86A: 349-354.
- 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., MORRISON R. K., XIE Z. - N., BALL D., SHENKER C. A., VINSON S. B., 1982. - Synergistic action of potassium chloride and magnesium sulfate on parasitoid wasp oviposition. - *Science* (Washington). 218: 164-6.
- NETTLES W. C. JR., MORRISON R. K., XIE Z. - N., BALL D., SHENKER C. A., VINSON S. B., 1983. - Effect of cations, anions and salt concentrations on oviposition by *Trichogramma pretiosum* in wax eggs. - *Ent. exp. & appl.*, 33: 283-289.

- NETTLES W. C. JR., 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*. - *Entomol. exp. appl.*, 38: 121-129.
- 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.
- NORDLUND D. A., LEWIS W. J., GROSS H. R. JR., 1981. - Elucidation and employment of semiochemicals in the manipulation of insects. In: Mitchell E. R., ed. - *Management of Insect Pests with Semiochemicals*, Plenum New York, 463-475.
- NORDLUND D. A., 1984. - Biological Control with entomophagus insects. - *J. Georgia Entomol. Soc.*, 19(3): 14-27.
- PRELL H., 1915. - Zur Biologie der Tachinen *Parasetigena segregata* Rdi und *Panzeria rudis* Fall. *Z. angew. Entomol.* 2: 57-148.
- RAJENDRAM G. F., 1978. - Oviposition behavior of *Trichogramma californicum* on artificial substrates. - *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 71: 92-94.
- RAJENDRAM G. F., HAGEN K. S., 1974. - *Trichogramma* oviposition into artificial substrates. - *Environ. Entomol.*, 3: 399-401.
- RIDGWAY R. L., VINSON S.B., 1977. - *Biological Control by Augmentation of Natural Enemies*. Plenum, New York.
- ROTUNDO G., CAVALLORO R., TREMBLAY E., 1988. - *In vitro* rearing of *Lysiphlebus fabarum* (Hym.: Braconidae). - *Entomophaga*, 33: 261-267.
- SHANNON R. C., 1923. - Rearing dipterous larvae on nutrient agar - *Proc. Entomol. Soc. Wash.* 25: 103-104.
- SHIELDS G., SANG J. H., 1977. - Improved medium for culture of *Drosophila* embryonic cells. - *DIS.*, 52:161.
- SIMMONDS F. JR., 1944. - The propagation of insect parasites on unnatural hosts. - *Bull. Entomol. Res.*, 35: 219-226.
- SINGH P., 1977. - *Artificial diets for insects, mites, and spiders*. - IFI/Plenum, New York, Washington and London.
- SINGH P., BUCHER G. E., 1971. - Efficacy of safe levels of antimicrobial food additives to control microbial contaminants in a synthetic diet for *Agria affinis* larvae. - *Ent. exp. & appl.*, 14: 297-309.
- SINGH P., HOUSE H. L., 1970a. - Antimicrobials: safe levels in a synthetic diet of an insect, *Agria affinis*. - *J. Insect Physiol.*, 16: 1769-1782.
- SINGH P., HOUSE H. L., 1970b. - Antimicrobial agents: their detrimental effects on size of an insect, *Agria affinis*. - *Can. Ent.*, 102: 1340-1344.
- SMITH R. W., 1958. - Parasites of nymphal and adult grasshoppers (Orthoptera: Acrididae) in Western Canada. - *Can. J. Zool.*, 36: 217-262.
- STRAND M. R., VINSON S. B., 1985. - *In vitro* culture of *Trichogramma pretiosum* on an artificial medium. - *Entomol. exp. appl.*, 39: 203-209.
- STRAND M. R., VINSON S. B., NETTLES W. C. JR., XIE Z. N., 1988. - *In vitro* culture of the egg parasitoid *Telenomus heliothidis*: the role of teratocytes and medium consumption in development. - *Entomol. exp. appl.*, 46: 71-78.
- SVOBODA J. A., KAPLANIS J. N., ROBBINS W. E., THOMPSON M. J., 1975. - Recent developments in insect steroid metabolism. - *Ann. Rev. Ent.*, 20: 205-220.
- SVOBODA J. A., THOMPSON M. J., ROBBINS W. E., KAPLANIS J. N., 1978. - Insect steroid metabolism. - *Lipids*, 13: 742-753.
- TERSAC J., GUERDOUX J., 1981. - Elevage de *Pimpla instigator* (Hym.: Ichneumonidae) dans des conditions artificielles: I. Ponte dans un leurre. - *Entomophaga*, 26: 221-232.
- THOMPSON S. N., 1974. - Aspects of amino acid metabolism and nutrition in the ectoparasitoid wasp, *Exeristes roborator*. - *J. Insect Physiol.*, 20: 1515-1528.
- THOMPSON S. N., 1975. - Defined meridic and holidic diets and aseptic feeding procedures for artificially rearing the ectoparasitoid *Exeristes roborator* (Fabricius). - *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 68: 220-336.
- THOMPSON S. N., 1976. - The amino acid requirements for larval development of the hymenopterous parasitoid *Exeristes roborator*. - *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 69: 835-838.
- THOMPSON S. N., 1977. - Lipid nutrition during larval development of the parasitic wasp, *Exeristes roborator*. - *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. - The nutrition of parasitic Hymenoptera. - In: Proc. 9th Intl. Congr. Pl. Prot., 9396.
- THOMPSON S. N., 1981b. - *Brachymeria lasus*: culture *in vitro* of a chalcid insect parasite. - *Exp. Parasitol.*, 52: 414-418.
- THOMPSON S. N., 1981c. - Essential aminoacid requirements of four species of parasitic Hymenoptera. - *Comp. Biochem. Physiol.*, 69A: 173-174.
- THOMPSON S. N., 1983. - *Brachymeria lasus*: effects of nutrient level on *in vitro* larval growth of a chalcid insect parasite. - *Environ. Parasitol.*, 55: 312-319.
- THOMPSON S. N., 1986a. - The metabolism of insect parasites (parasitoids): an overview. - *J. Insect Physiol.*, 32: 421-423.
- THOMPSON S. N., 1986b. - Nutrition and *in vitro* culture of insects parasitoids. - *Ann. Rev. Entomol.*, 31: 197-219.
- THOMPSON S. N., JOHNSON J., 1978. - Further studies on lipid metabolism in the insect parasite, *Exeristes roborator* (Fabricius). - *J. Parasitol.*, 64: 731-740.
- THOMPSON S. N., BEDNAR L., NADEL H., 1983. - Artificial culture of the insect parasite, *Pachycrepoideus vindemiae*. - *Ent. exp. & appl.*, 33: 121-122.
- THOMPSON M. J., SVOBODA J. A., KAPLANIS J. N., ROBBINS W. E., 1972. - Metabolic pathways of steroid in insects. - *Proc. Roy. Soc. London.*, B, 180: 203-221.
- VINSON S. B., IWANTSCH G. F., 1980. - Host suitability for insect parasitoids. - *Ann. Rev. Entomol.*, 25: 397-419.
- WISHART G., 1956. - Effects of hydrogen ion concentration on hatching of eggs of *Aplomya caesar* (Ald.) (Diptera: Tachinidae). - *Can. Entomol.*, 88: 655-656.
- WU Z. X., ZHANG Z., LI T., LIU D., 1980. - Artificial media devoid of insect additives for rearing larvae of the endoparasitoid wasps *Trichogramma*. - *Acta Entomol. Sin.* 23: 232.
- WU Z. X., QIN J., 1982. - Ovipositional response of *Trichogramma dendrolimi* to the chemical contents of artificial eggs. - *Acta Ent. Sin.*, 25: 363-372.
- 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.
- WYATT G. R., 1967 - Biochemistry of sugars and polysaccharides in insects. In: Advances in Insect Physiology. Ed. by J.W.L. Beament, J.E. Treherne and V.B. Wigglesworth Vol. 4, 287-360. Academic Press. London.
- WYATT G. R., PAN M. L., 1978. - Insect plasma protein. - *Ann. Rev. Biochem.*, 47: 779-817.
- XIE Z. N., NETTLES W. C. JR., MORRISON R. K., IRIE K., VINSON S. B., 1986a. - Effect of ovipositional stimulants and diets on the growth and development of *Trichogramma pretiosum in vitro*. - *Entomol. exp. appl.*, 42:119-124.
- XIE Z. N., NETTLES W. C. JR., MORRISON R. K., IRIE K., VINSON S. B., 1986b. - Three methods for the *in vitro* culture of *Trichogramma pretiosum* Riley. - *J. Entomol. Sci.*, 21: 133-138.
- XIE Z. N., LI L., XIE Y., 1989. - *In vitro* culture of *Habrobracon hebetor* (Say)(Hym.: Braconidae). - *Chin. J. Biol. Control*, 5: 49-51.
- YAZGAN S., 1972. - A chemically defined synthetic diet and larval nutritional requirements of the endoparasitoid *Itopectis conquisitor* (Hymenoptera). - *J. Ins. 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. - *Z. ang. Ent.*, 91: 433-441.
- YAZGAN S., HOUSE L., 1970. - An hymenopterous insect, the parasitoid *Itopectis conquisitor*, reared axenically on chemically-defined synthetic diet. - *Can. Ent.*, 102: 1304-1306.
- 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.