

MARIA LUISA DINDO

Istituto di Entomologia «Guido Grandi» - Università di Bologna.

Alcune osservazioni sulla biologia di *Brachymeria intermedia* (Nees) (Hym. Chalcididae) *in vivo* e *in vitro*.⁽¹⁾

INTRODUZIONE

Negli insetti, la simbiosi ospite-parassitoide può essere influenzata da molteplici fattori, quali le specie di appartenenza dei due partners (in particolare dell'entomofago, cfr. Mellini, 1978, 1983; Dindo, 1987) e l'età della vittima al momento della contaminazione (Mellini, 1985a,b; 1986). Tali elementi sono, tra l'altro, alla base della maggiore o minore complessità dei rapporti fisiologici intercorrenti tra i simbioti.

In linea di massima, quanto più un parassitoide è condizionato, per il proprio sviluppo, da sofisticate (e spesso misconosciute) relazioni con l'ospite, tanto più difficoltoso potrà rivelarsi il tentativo di allevarlo *in vitro* (Thompson, 1986; Campadelli e Dindo, 1987). A questo proposito, l'accrescimento *in vivo* degli Imenotteri pupifagi ed oofagi sembra essere essenzialmente condizionato da fattori nutrizionali, fisici e fisiologici loro propri, piuttosto che da complicati rapporti con l'ospite, che, di solito, soccombe in tempi brevi (Mellini, 1985a). Pertanto, almeno teoricamente, esistono maggiori probabilità di riuscire ad allevare *in vitro* un oofago o un pupifago, che non un larvifago, specie se endofago, il quale, *in vivo*, instaura con la vittima complesse interazioni (Campadelli e Dindo, 1987).

Thompson (1980) ha effettuato una serie di sperimentazioni sul calcidide *Brachymeria intermedia* (Nees), endoparassitoide polifago solitario di crisalidi di Lepidotteri, noto soprattutto come antagonista di *Lymantria dispar* (L.) (Lep. Lymantriidae). Egli, in particolare, ha constatato, 48 ore dopo la parassitizzazione, un arresto di sviluppo, nonché una accentuata diminuzione della respirazione, nell'ospite di sostituzione *Trichoplusia ni* Hb. (Lep. Noctuidae), giungendo alla conclusione che (analogamente alla generalità dei pupifagi) *B. intermedia* uccida rapidamente la vittima. Comunque, i tentativi di allevare *B. intermedia* su dieta olidica, di cui viene riferito nel medesimo studio (Thompson, 1980), si sono conclusi con un parziale

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

insuccesso, poichè la maggior parte degli individui non ha superato lo stadio di prepupa e nessuno è andato oltre lo stadio di pupa. Successivamente, lo stesso Thompson (1981) ha ottenuto, su dieta chimicamente definita, lo sviluppo, fino allo stadio adulto, della specie affine *Brachymeria lasus* (Wlk.). Tale dieta si è dimostrata invece del tutto inadatta per *B. intermedia* (Thompson, comunicazione personale).

Nonostante le cause del parziale fallimento dell'allevamento su dieta artificiale di *B. intermedia* potessero essere molteplici (prima di tutto nutrizionali e/o fisiche, cfr. Thompson, 1980), non andava nemmeno scartata l'ipotesi che questo parassitoide, quantunque pupifago, contraesse *in vivo* interazioni con l'ospite tali da esserne condizionato in modo determinante ai fini dello sviluppo. Ovviamente, in questo caso, si sarebbe dovuto tenerne conto anche in riguardo al suo allevamento *in vitro*.

In uno studio precedente (Dindo, 1987), tramite dissezione delle crisalidi e osservazione delle pulsazioni del vaso dorsale, ho constatato che la morte dell'ospite *Trichoplusia ni* parassitizzato da *B. intermedia* non coincideva con l'arresto di sviluppo evidenziato da Thompson (1980), 48 ore dopo la parassitizzazione. La vittima (a 26-28°C) si manteneva, nella maggioranza dei casi, vitale, come minimo per altre 24 ore, soccombendo solo tra il terzo e il quarto giorno dopo la parassitizzazione, quando la larveta endofaga si trovava almeno in III età. Tali osservazioni non erano comunque sufficienti per concludere che, nel sistema *T.ni* - *B. intermedia*, i rapporti fisiologici intercorrenti tra ospite e parassitoide fossero effettivamente determinanti ai fini del buon esito della simbiosi, nè, tanto meno, che a ciò dovessero essere fatte risalire le cause delle difficoltà incontrate nell'allevamento *in vitro* di questo entomofago.

Con questi presupposti, nel presente lavoro ho compiuto ulteriori osservazioni sulla biologia di *Brachymeria intermedia*, *in vivo* (utilizzando come ospite di sostituzione il lepidottero galleriide *Galleria mellonella* L.) e *in vitro* (utilizzando come substrato trofico un omogeneizzato derivato dall'ospite medesimo). Lo scopo era quello di indagare sia su alcuni aspetti dei rapporti intercorrenti tra i due simbionti, sia sulle possibilità del calcidide di svilupparsi fuori dalla vittima, col fine ultimo di individuare eventuali elementi utili per un successivo allevamento dell'entomofago su dieta priva di materiali derivati dall'ospite.

MATERIALI E METODI

L'ospite di sostituzione *Galleria mellonella* è stato allevato secondo il metodo descritto da Campadelli (1973). L'allevamento massale di *Brachymeria intermedia* è stato eseguito a T 25-27°C, U.R. 35-40%, fotoperiodo 16:8.

Per la presente sperimentazione sono state utilizzate crisalidi di 2-3 giorni di età, giudicata la più idonea per l'entomofago, in base alle percentuali di sfarfallamento, da Minot e Leonard (1976).

La parassitizzazione è stata eseguita esponendo le crisalidi sbozzolate alle femmine del calcidide e rimuovendole subito dopo che erano state perforate dalla terebra una sola volta.

Sono state effettuate tre serie di osservazioni: a) *in vivo*; b) sullo sviluppo del parassitoide in ospiti previamente uccisi; c) *in vitro*.

a) Osservazioni *in vivo*

Sono state essenzialmente mirate al tentativo di individuare il momento della morte dell'ospite, in relazione allo stadio raggiunto dal parassitoide.

Occorre premettere che, analogamente a quanto si verifica in *Trichoplusia ni* (cfr. Dindo, 1987), al massimo 40 ore dopo l'attacco da parte di *B. intermedia*, le crisalidi di *G. mellonella* effettivamente parassitizzate risultano totalmente immobili, mentre quelle, a quel tempo, ancora in grado di reagire agli stimoli contraendo l'addome, sono invariabilmente indenni.

Al fine di verificare se la completa immobilità dell'ospite coincidesse o meno con la sua morte, sono stati parassitizzati 3 gruppi (A, B, C) di 15 crisalidi ciascuno. Le crisalidi che, trascorse almeno 40 ore, non davano segni di mobilità (12 per il gruppo A, 10 per il gruppo B, 11 per il gruppo C) sono state sottoposte a dissezione, rispettivamente, 41-44 ore (A), 50-51 ore (B) e 55-56 ore (C) dopo la parassitizzazione. Si è così potuto osservare se il vaso dorsale di ciascuna crisalide era o non era pulsante e in questo modo stabilire se l'ospite era morto o solo paralizzato.

Non in tutte le crisalidi dissezionate è stata reperita la larva di *B. intermedia*. Tuttavia, trattandosi di larvette estremamente minute e, per giunta, ialine, è probabile che esse, pur presenti, in qualche caso non siano state individuate. Nei 3 gruppi sono state rispettivamente reperite (ovviamente in numero di una per crisalide) 9 (A), 6 (B), 9 (C) larvette, della cui età è stata tentata la determinazione, sia pure approssimativa, in base ad alcune delle osservazioni riportate da Dowden (1935), il quale ha studiato il ciclo biologico di *B. intermedia* nell'ospite naturale *Lymantria dispar*.

In particolare, si è tenuto conto della lunghezza delle larve del parassitoide⁽²⁾. Per distinguere gli individui delle prime due età da quelli delle tre successive (in particolare quelli di II da quelli di III), si è poi cercato di osservare il numero degli spiracoli tracheali, che, in *B. intermedia*, sono aperti fin dalla I età. Di seguito sono indicate le misure della lunghezza delle larve, nonché il numero degli stigmi aperti, riportati da Dowden (1935) per le varie età.

| Età | lunghezza mm | n° paia stigmi |
|-----|--------------|----------------|
| I | 1,08 | 4 * |
| II | 2,00-2,86 | 4 * |
| III | 2,70-3,86 | 9 + |
| IV | 4,00-6,00 | 9 + |
| V | 6,75-11,5 | 9 + |

* 1 paio toracico e 3 paia addominali.

+ 2 paia toracici e 7 paia addominali.

⁽²⁾ Si è ritenuto di poter utilizzare, come termini di confronto, i dati di Dowden (1935), in quanto, verosimilmente, le dimensioni del calcidide, se non altro ai primi stadi, non sono influenzate da quelle dell'ospite.

b) Osservazioni sullo sviluppo di *B. intermedia* in un ospite previamente ucciso.

Per indagare circa le possibilità di sviluppo del parassitoide in un ospite già morto, le crisalidi di *G. mellonella*, immediatamente prima di essere esposte alle femmine del parassitoide, sono state uccise mediante immersione in acqua distillata a 60°C per 12 minuti; in questo modo, si è anche ottenuta la disattivazione degli enzimi responsabili dell'imbrunimento dell'emolinfa e dei tessuti in genere (Bratti e Monti, 1988). Sono state effettuate tre diverse osservazioni, per il calcolo dei seguenti parametri (n: numero di crisalidi testimoni = numero di crisalidi uccise utilizzate per ciascuna osservazione; A: crisalidi testimoni; B: crisalidi uccise).

- 1) Numero di parassitoidi sfarfallati da A e da B (n = 97).
- 2) Tempi medi di sviluppo di *B. intermedia* in A e in B (n = 57).
- 3) Numero di larvette di *B. intermedia* reperite, in A e in B, 5 giorni dopo l'esposizione alle femmine del parassitoide, (n = 24).

L'analisi statistica è stata effettuata per i parametri 1) e 3), mediante il test del χ^2 .

Tanto queste osservazioni che quelle *in vivo* sono state eseguite a T 25-27°C, U.R. 35-40%, fotoperiodo 16:8.

c) Osservazioni *in vitro*.

Sono state effettuate utilizzando, come substrato trofico, un omogeneizzato di crisalidi di *Galleria mellonella*, ottenuto secondo la tecnica impiegata da Bratti e Monti (1988) per l'allevamento *in vitro* delle larve del dittero tachinide *Pseudogonia rufifrons* Wied.

Seguendo le indicazioni dei due Autori, a scopo di contenimento dello sviluppo di colonie batteriche, l'omogeneizzato è stato addizionato con solfato di gentamicina, alla concentrazione dello 0,006%. Come gelificante, è stata utilizzata polvere di agar in misura dell'1%.

Il materiale è stato distribuito, per mezzo di una siringa sterile da 1 ml, in piastre sterili Multidish Nunc a 24 pozzetti, in quantità di 0,5 ml per pozzetto (cfr. Thompson, 1981). In alcuni pozzetti di bordo, è stata versata acqua distillata sterile per garantire il mantenimento di una umidità relativa prossima al 100%.

Trascorse 24 ore (Bratti e Monti, 1988), si è proceduto a trasferire sul substrato, in numero di 1 per pozzetto, le uova del parassitoide, ottenute dissezionando, entro 2 ore dall'ovideposizione, crisalidi di *Galleria mellonella* superparassitizzate. Le uova, prelevate per mezzo di un pennello, sono state immerse in soluzione fisiologica, poi disinfettate in soluzione di ipoclorito di sodio 0,2% per 1 minuto, quindi sciacquate prima in soluzione di sodio tiosolfato 10% e infine in soluzione fisiologica sterile. Il trasferimento delle uova su substrato trofico è stato effettuato per mezzo di pipette di Pasteur. Le piastre sono state chiuse

ermeticamente e mantenute al buio a T 26-28°C. Tutta la procedura è stata condotta sotto cappa a flusso laminare e il materiale utilizzato è stato autoclavato per 12 minuti a 125°C e 1,8 bar.

A latere, sono stati effettuati altri due tipi di osservazioni *in vitro*. Nella prima si è saggiata l' idoneità di un substrato trofico analogo a quello su descritto, ma privo di agar. La seconda ha invece riguardato le possibilità di sviluppo del parassitoide su di un omogeneizzato colorato, che, in quanto tale, rendesse più agevole l'osservazione delle uova e delle larvette neosgusciate (alquanto difficoltosa su un substrato al naturale). L'omogeneizzato, preparato secondo modalità identiche a quelle già indicate, è stato ottenuto a partire da crisalidi che, durante gli stadi larvali, erano state alimentate con dieta addizionata con colorante vitale (rosso Sudan) alla dose di 0,1 g/Kg. In via preliminare, era stata saggiata *in vivo* l' idoneità delle crisalidi colorate, la quale, in base alle percentuali di sfarfallamento del parassitoide, non era apparsa significativamente diversa da quella delle crisalidi testimoni.

RISULTATI E DISCUSSIONE

a) Osservazioni *in vivo*.

In 11 delle 12 crisalidi del gruppo A e in 7 delle 10 crisalidi del gruppo B, il vaso dorsale era ancora pulsante al momento della dissezione. Tali crisalidi, pertanto, non erano, a quel tempo, morte, ma solo paralizzate. Le 9 larvette di *B. intermedia* reperite nelle crisalidi del gruppo A (di cui 8 in crisalidi vive e 1 nell' unica crisalide morta) erano di lunghezza compresa tra 1,65 e 1,9 mm e si trovavano dunque, verosimilmente, in I età più o meno avanzata.

Le 6 larvette individuate nelle crisalidi del gruppo B (di cui 5 in crisalidi vive e 1 in una delle crisalidi morte) erano invece di lunghezza compresa tra 1,7 e 2,2 mm e si trovavano pertanto, probabilmente, in I età più o meno avanzata o in II iniziale.

In tutte e 11 le crisalidi del gruppo C, il vaso dorsale, al momento della dissezione, non era pulsante. Tali crisalidi erano pertanto, con ogni probabilità, tutte morte. Delle 9 larvette in esse reperite, 6 erano di lunghezza compresa tra 2,3 e 2,6 mm e si trovavano dunque, verosimilmente, in II età più o meno avanzata. Le 3 rimanenti erano invece di lunghezza compresa tra 2,7 e 2,75 mm. Una sola di queste, in cui sono state osservate 9 paia di stigmi, era sicuramente già mutata in III età, mentre le altre 2, in cui gli stigmi non sono stati individuati, si trovavano probabilmente ancora in II età (nella quale gli spiracoli tracheali, oltre ad essere in numero inferiore, hanno anche diametro minore e sono pertanto più difficilmente visibili, cfr. Dowden, 1935).

La struttura interna delle crisalidi dei gruppi A e B si presentava, alla dissezione, pressochè inalterata. Nelle crisalidi del gruppo C (morte al momento della dissezione) gli organi interni erano pure inattaccati, mentre il corpo adiposo mostrava segni di una alterazione, presumibilmente connessa all'attività trofica

delle larvette e, in particolare, all'azione degli enzimi citolitici che, in tutti gli Imenotteri endoparassiti, vengono secreti dalle ghiandole salivari e dallo stomodeo (Fisher, 1971).

Nelle crisalidi di *Galleria mellonella* parassitizzate da *Brachymeria intermedia*, la morte è dunque sopraggiunta (a 25-27°C) con almeno 20-25 ore di anticipo e quando le larvette endofaghe si trovavano in uno stadio più precoce, rispetto a quanto si era verificato (a 27°C) nelle crisalidi di *Trichoplusia ni*, attaccate dallo stesso calcidide (cfr. Dindo, 1987). Tale divergenza è probabilmente da mettere in relazione con le diverse caratteristiche dell'una e dell'altra specie ospite e, forse, con le maggiori dimensioni delle crisalidi del nottuide rispetto a quelle del galleriide. E' invece da escludere che la morte della vittima possa essere collegata al raggiungimento di un determinato stadio da parte del parassitoide. Va, a questo proposito, evidenziato, che, in *Trichoplusia ni*, le crisalidi soccombevano pressochè in concomitanza con l'inizio della fase predatrice, e mentre la maggior parte di quelle dissezionate dopo 72 ore dalla parassitizzazione era ancora viva, quasi tutte quelle dissezionate dopo 96 ore non soltanto erano morte, ma presentavano anche segni evidenti di una intensa attività trofica da parte della larva dell'entomofago, che occupava ormai pressochè per intero la loro cavità corporea (Dindo, 1987). In *Galleria mellonella* la morte della crisalide è avvenuta, invece, prima dell'indiscriminato attacco ai tessuti da parte della larva dell'entomofago.

Riguardo alla paralizzazione, che sia in *Trichoplusia* che in *Galleria* precede la morte della crisalide ospite, nel nottuide era stato constatato (Dindo, 1987) che le pupe effettivamente parassitizzate, ancora «mobili» dopo 24 ore dall'attacco da parte di *B. intermedia*, risultavano del tutto paralizzate nel giro delle successive 16 ore. Osservazioni *in vivo* e *in vitro* avevano, inoltre, evidenziato che le uova del parassitoide schiudevano (a 27°C), mediamente, 30-40 ore dopo essere state deposte, pressochè in concomitanza con l'insorgenza della paralisi. Si era concluso che questo fenomeno, troppo tardivo per attribuirne la causa alle sostanze iniettate dalla femmina al momento dell'ovideposizione, potesse essere determinato da fattori, di natura non identificata, connessi con la schiusa dell'uovo. Si ritiene che tali considerazioni possano essere riferite anche a *G. mellonella*, nelle cui crisalidi effettivamente parassitizzate si è pure constatata un'insorgenza progressiva della paralisi, i primi segni della quale non si sono comunque mai resi manifesti prima che dalla puntura della femmina fosse trascorso almeno un giorno. Il fatto che, in seguito a parassitizzazione da parte di *B. intermedia*, *G. mellonella* soccomba in tempi più rapidi rispetto a *T. ni* non pare avere influenza sulla sua idoneità per questo calcidide, che può raggiungere lo stadio adulto in buone percentuali tanto nell'una che nell'altra specie ospite. Prolungate interazioni tra entomofago e vittima non sembrerebbero, pertanto, indispensabili per il buon esito della simbiosi. Tale conclusione è incoraggiante ai fini dell'allevamento *in vitro* di *B. intermedia*, pur non potendosi escludere che il parassitoide induca comunque nell'ospite, prima di condurlo, più o meno rapidamente, a morte, effetti utili, anche se non determinanti, per il proprio sviluppo.

b) Osservazioni sullo sviluppo del parassitoide in ospiti previamente uccisi.

Occorre premettere che le femmine del calcidide attaccano prontamente le crisalidi uccise loro esposte, inserendo la terebra, similmente a quanto si verifica in crisalidi testimoni. Ovviamente, nelle une e nelle altre, non necessariamente all'inserimento della terebra segue l'ovideposizione.

Il numero dei parassitoidi sfarfallati da crisalidi testimoni e da crisalidi uccise costituisce un indice dell'accettabilità e dell'idoneità dell'ospite, considerate globalmente. Da 54 delle 97 crisalidi testimoni è emerso l'adulto di *B. intermedia* (delle rimanenti 43 crisalidi, 11 hanno invece lasciato sfarfallare l'adulto di *G. mellonella* e 32 sono morte); viceversa, solo da 11 delle 97 crisalidi uccise è emerso l'adulto del calcidide. Ciò dimostra che *B. intermedia* è in grado di riprodursi a spese di crisalidi uccise, ma in percentuali molto più basse che in crisalidi testimoni. Questo è stato confermato anche dall'analisi statistica dei risultati: è stata infatti respinta l'ipotesi di uguaglianza, tra crisalidi testimoni e crisalidi uccise, in riguardo alle possibilità, per l'entomofago, di riprodursi a loro spese, dal momento che, per 1 grado di libertà, il χ^2 calcolato su una tabella 2x2 (= 40,81) è di gran lunga superiore al χ^2 per il livello di significatività 1%.

Nelle crisalidi testimoni effettivamente parassitizzate, si manifestano esternamente, già 3 giorni circa dopo la parassitizzazione, dei segni di melanizzazione (probabile conseguenza dell'attività trofica della larvetta endofaga). La melanizzazione si rende, in seguito, via via più evidente, fino allo sfarfallamento del parassitoide. Tale fenomeno si presenta anche nelle crisalidi uccise effettivamente parassitizzate, di modo che, già 3 o 4 giorni dopo l'esposizione alle femmine di *B. intermedia*, è possibile individuare le pupe da cui, presumibilmente, emergerà l'adulto del calcidide. Peraltro, non da tutte le crisalidi uccise e melanizzate è effettivamente sfarfallato l'adulto; comunque, in nessun caso ciò si è verificato da crisalidi rimaste, esternamente, chiare.

I risultati riguardanti i tempi medi di sviluppo di *B. intermedia* in crisalidi testimoni e in crisalidi uccise sono riportati nella tabella 1. I pochi dati disponibili relativi ai parassitoidi emersi da un ospite ucciso non sembrerebbero indicare che vi siano state sostanziali differenze rispetto ai tempi di sviluppo del calcidide in crisalidi testimoni.

Tab. 1 - Tempi di sviluppo (in giorni) di *Brachymeria intermedia* in crisalidi di *Galleria mellonella*, testimoni (A) e uccise (B).

| maschi | | femmine | |
|--------|--------------------------|---------|--------------------------|
| n | gg ($\bar{x} \pm d.s$) | n | gg ($\bar{x} \pm d.s$) |
| A 13 | 13,54 \pm 0,52 | 16 | 15,31 \pm 0,95 |
| B 5 | 14,20 \pm 1,30 | 3 | 15,00 \pm 0,00 |

Il numero delle larvette di *B. intermedia* reperite, 5 giorni dopo l'esposizione alle femmine del parassitoide, in crisalidi testimoni e in crisalidi uccise è stato preso in considerazione a misura dell'accettabilità dell'ospite. Trattasi, in ogni caso, di una stima approssimata per difetto, in quanto non tiene conto nè delle uova eventualmente deposte nella vittima e poi non schiuse, nè delle larvette neosgusciate possibilmente morte e non reperite al momento della dissezione. Comunque, delle 24 crisalidi esposte alle femmine del parassitoide da vive, 5 erano, dopo 5 giorni, morte e apparentemente non parassitizzate. Le restanti 19 contenevano, invece, la larva del parassitoide. In 14 di queste, la larva di *Braconymeria intermedia* era ormai matura, mentre nelle 5 rimanenti le larve si trovavano, probabilmente, in III o IV età.

Delle 24 crisalidi esposte alle femmine del parassitoide da morte, 18 non erano parassitizzate e solo in 6 è stata reperita la larva del calcidide. Di queste 6 larve, 1 aveva raggiunto la maturità, mentre le altre si trovavano, verosimilmente, in III o IV età: da ciò si può forse dedurre che, nelle crisalidi uccise, lo sviluppo stesse, in genere, procedendo più lentamente che nelle crisalidi testimoni. Questo non concorderebbe con i risultati riguardanti i tempi di sviluppo di *B. intermedia*, fino allo stadio adulto. Benchè siano necessari ulteriori approfondimenti al riguardo, è possibile ipotizzare che solo le larvette in grado di accrescersi in una crisalide uccisa allo stesso ritmo che in una crisalide testimone riescano, infine, a sfarfallare. Comunque, le crisalidi uccise sono state accettate in misura di gran lunga inferiore rispetto alle crisalidi testimoni. Ciò è stato, anche in questo caso, confermato dall'analisi statistica dei risultati. Infatti, per 1 grado di libertà, il χ^2 calcolato su una tabella 2x2 (=12,02) è superiore al χ^2 per il livello di significatività 1%; pertanto, è stata respinta l'ipotesi di uguaglianza, in riguardo all'accettabilità, tra crisalidi vive e crisalidi uccise.

In conclusione, *B. intermedia* può svilupparsi a spese di crisalidi uccise, sia pure in percentuali molto minori che in crisalidi testimoni. A questo proposito, il fattore limitante sembrerebbe essere l'accettabilità più che l'idoneità dell'ospite ucciso, anche se sono necessarie ulteriori indagini per stabilire in che misura, per le crisalidi morte, esiste corrispondenza tra queste due tappe del processo parassitario.

Comunque, risulta confermato che le interazioni fisiologiche con un ospite vitale non sono, di fatto, indispensabili per lo sviluppo di *B. intermedia*.

c) Osservazioni *in vitro*

Sono state in parte compromesse da infezioni fungine, che hanno contaminato buona parte dei pozzetti contenenti la larva di *B. intermedia* (per inciso, mai queste infezioni si sono manifestate in modo evidente in pozzetti all'interno dei quali l'uovo del parassitoide non era schiuso).

Delle 50 uova depositate sull'omogeneizzato, 39 sono sgusciate. Le larvette sono state osservate nell'atto di nutrirsi attivamente. Dopo 4-6 giorni si sono

iniziati a notare, in alcune di loro, gli spiracoli tracheali, in numero di 9 paia (prova che tali larve erano, almeno, mutate in III età, cfr. Dowden, 1935). Mediamente dopo 6-7 giorni si è osservato un accrescimento accentuato da parte di alcune delle larve sopravvissute, contemporaneamente ad un marcato imbrunimento del substrato trofico circostante, probabile conseguenza dell'azione degli enzimi citolitici secreti dalle ghiandole salivari e dallo stomodeo (Fisher, 1971). In particolare, una di queste larve è stata osservata nell'atto di secernere delle goccioline di liquido attraverso l'apertura boccale.

La maturità è stata raggiunta, in tutto, da 14 larve, le cui dimensioni non apparivano dissimili da quelle di larve mature allevate *in vivo*.

Nove larve sono morte prima di impuparsi (alcune dopo avere eliminato il meconio). Tre dei parassitoidi superstiti sono, a loro volta, morti allo stadio di pupa farata e 2 soli si sono regolarmente impupati, rispettivamente dopo 14 (a) e dopo 13 giorni (b) dall'immissione delle uova sul substrato (va evidenziato che, a 27°C, quasi tutte le larve sono impupate 7-8 giorni dopo la parassitizzazione dell'ospite). La pupa a) è morta senza lasciar sfarfallare l'adulto. La pupa b), melanizzata nel giro dei 2 giorni successivi, ha, invece, dopo altri 4 giorni, lasciato sfarfallare l'adulto, una femmina. Ciò è pertanto avvenuto, complessivamente, 19 giorni dopo l'immissione dell'uovo su dieta: l'intero sviluppo postembrionale è dunque durato, per questa femmina, circa 4 giorni in più di quanto normalmente si verifica, a 25-27°C, per le femmine *in vivo* (cfr. anche tab. 1). La femmina allevata *in vitro* si è rivelata fertile e ha generato figli di ambedue i sessi. Da ciò si può dedurre che essa si è regolarmente accoppiata e che le sue uova sono state, almeno in parte, fecondate, essendo la partenogenesi, negli Imenotteri Calcididi, arrenotoca (Clausen, 1962).

I risultati ottenuti possono essere definiti incoraggianti. Infatti, è stato dimostrato che *Brachymeria intermedia* è in grado di raggiungere lo stadio adulto e, in particolare, la maturità sessuale, al di fuori dell'ospite, su materiale da esso derivato. Pertanto, le difficoltà finora incontrate nell'allevamento di questo calcidide, fino allo stadio adulto, su dieta olidica (cfr. Thompson, 1980) non sembrerebbero dovute al fatto che, *in vivo*, il buon esito della simbiosi sia legato a complesse interazioni entomofago-vittima.

I tentativi di allevamento di *B. intermedia* effettuati a spese di un substrato privo di agar hanno avuto esito totalmente sfavorevole. Delle 20 uova, immesse in altrettanti pozzetti (e prontamente andate a fondo), non si è, in seguito, reperita più alcuna traccia. Non è noto se tali uova fossero o non fossero schiuse; nel primo caso, i motivi che avrebbero causato la morte delle larvette neosgusciate non sono noti. E' possibile ipotizzare un decesso avvenuto per asfissia, collegato ad un insufficiente quantitativo di ossigeno all'interno del substrato.

L'omogeneizzato ottenuto a partire da crisalidi colorate si è dimostrato meno idoneo, per *B. intermedia*, rispetto al substrato al naturale. L'accrescimento delle larve è stato, in genere, più lento e nessuna ha oltrepassato lo stadio di larva matura. Evidentemente, il colorante vitale (rosso Sudan), che *in vivo* non aveva

causato evidenti problemi per il parassitoide, *in vitro* ne ha in qualche modo ostacolato lo sviluppo.

RIASSUNTO

Vengono riportati i risultati di alcune osservazioni sulla biologia di *Brachymeria intermedia* (Nees), endoparassitoide polifago solitario di pupe di Lepidotteri. Come ospite di sostituzione, è stato utilizzato il lepidottero galleriide *Galleria mellonella* L. Sono state eseguite tre serie di osservazioni: a) *in vivo*, b) sulle possibilità di sviluppo del parassitoide in ospiti previamente uccisi; c) *in vitro*.

a) Le osservazioni *in vivo* sono state mirate al tentativo di individuare il momento della morte dell'ospite, in relazione allo stadio raggiunto dal parassitoide.

Occorre premettere che, a 25-27°C, le pupe effettivamente parassitizzate, trascorse 30-40 ore dall'attacco di *B. intermedia*, risultano incapaci di qualunque movimento. Dissezionando 3 gruppi di crisalidi immobili, 41-44 ore (A), 50-51 ore (B) e 55-56 ore (C) dopo la parassitizzazione, si è constatato che, in quasi tutti gli individui dei gruppi A e B, il vaso dorsale era ancora pulsante. Pertanto, tali crisalidi non erano morte, ma solo paralizzate. Le crisalidi del gruppo C, in cui il vaso dorsale non era più pulsante, erano invece tutte morte. In tali crisalidi, le larvette del parassitoide si trovavano in II età, più o meno avanzata, con l'eccezione di un'unica larva, già mutata in III età.

In *G. mellonella*, la morte è sopraggiunta con 20-25 ore di anticipo rispetto a quanto era stato constatato, in uno studio precedente, in un altro ospite, *Trichoplusia ni* Hb. (Lep. Noctuidae), sempre in seguito a parassitizzazione da parte di *B. intermedia* (a T 27°C). In *T. ni* inoltre, al momento del decesso della vittima, le larvette endofaghe si trovavano almeno in III età.

Pertanto, quanto rapidamente il calcidide conduca a morte il suo ospite non sembra essere di importanza cruciale ai fini del buon esito della simbiosi. Inoltre, la morte della vittima non sembra essere collegata al raggiungimento di un determinato stadio da parte del parassitoide.

b) Le crisalidi sono state uccise immediatamente prima di essere esposte alle femmine del parassitoide, mediante immersione in acqua distillata a 60°C per 12 minuti. È stato dimostrato che *B. intermedia* è in grado di riprodursi a spese di tali crisalidi, sia pure in percentuali molto minori che in crisalidi testimoni. A questo proposito, il fattore limitante sembrerebbe essere l'accettabilità più che l'idoneità dell'ospite ucciso.

c) Il parassitoide è stato allevato a spese di un omogeneizzato di crisalidi di *G. mellonella*. In tale substrato, sono state immerse uova di *B. intermedia* prelevate da ospiti superparassitizzati. La maggior parte delle uova sono schiuse e circa 2/3 delle larve sgusciate hanno raggiunto la maturità. D'altro canto, soltanto 2 si sono impupate. Un'unica pupa ha, infine, lasciato sfarfallare l'adulto, una femmina, la quale si è rivelata fertile. Il tempo di sviluppo, da uovo ad adulto, di questa femmina è stato di circa 4 giorni più lungo di quanto si verifica, normalmente, *in vivo*.

In conclusione, è stato dimostrato che le interazioni con l'ospite non sono indispensabili per lo sviluppo di *B. intermedia*. Questo calcidide è in grado di raggiungere lo stadio adulto e, in particolare, la maturità sessuale, fuori dall'ospite, su materiale da esso derivato.

Some observations on the biology of *Brachymeria intermedia* (Nees) (Hym. Chalcididae) *in vivo* and *in vitro*.

SUMMARY

The results of some observations on the biology of *Brachymeria intermedia* - a polyphagous, solitary, endoparasitoid of lepidopterous pupae - are reported.

As a substitute host, *Galleria mellonella* L. (Lep. Galleriidae) was utilized.

Three series of observations were made: a) *in vivo*; b) on the parasitoid's capacity of developing at the expenses of previously killed hosts; c) *in vitro*.

a) The aim of the observations *in vivo* was to try to find out: 1) how long the parasitized host remains alive; 2) in which stage the parasitic larva is at the time of the host death.

It has to be emphasized that, about 30-40 hours after parasitization, at 25-27°C, the parasitized pupae are completely motionless. By dissecting 3 groups of motionless pupae, 41-44 hours (A), 50-51 hours (B) and 55-56 hours (C) after parasitization, it was noted that in almost all the pupae of the groups A and B, the dorsal vessel was still pumping; therefore, such pupae were paralyzed, but still alive. On the other hand, in all the pupae of the group C, the dorsal vessel was not pumping; they were definitely all dead. In these pupae, parasitic 2nd-instar larvae were generally found. Only one larva had already moulted to the 3rd instar.

Parasitized *G. mellonella* pupae died nearly 20-25 hours earlier than did, during a previous study, *Trichoplusia ni* Hb. (Lep. Noctuidae) pupae, parasitized by *Brachymeria intermedia* (at 27°C). Moreover, at the time of the host death, in *T. ni* pupae the parasitic larvae were of the 3rd instar at least.

Thus, how quickly *B. intermedia* kills its host does not seem to be a key point for successful parasitization. Moreover, the host death does not seem to be related to the reaching of a definite stage by the parasitoid.

b) The host pupae were killed, immediately prior to be exposed to the parasitoid females, by immersion in distilled water at 60°C, for 12 minutes. It was demonstrated that *B. intermedia* can be reproduced at the expenses of such pupae, though at lower percentages than in controls. The limiting factor seems to be the acceptance, rather than the suitability of the killed hosts.

c) *B. intermedia* was reared on pupal homogenate of *G. mellonella*. In such substrate, eggs obtained by dissection of superparasitized host pupae were put. Most eggs hatched and about 2/3 of the larvae got mature. On the other hand, only 2 larvae pupated and 1 let an adult female emerge. Such female was fecund. Its developmental time, from egg to adult, was nearly 4 days longer than usually obtained *in vivo*.

In conclusion, it was demonstrated that the parasitoid-host relationships are not essential for the development of *B. intermedia*. This parasitoid is capable of reaching the adult stage (and sexual maturity) out of host, on host-derived material.

BIBLIOGRAFIA CITATA

- 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. Galleriidae). - *Boll. Ist. Ent. «G. Grandi» Univ. Bologna*, 43: 115-126.
- CAMPADELLI G., 1973. - Allevamento di *Galleria mellonella* L. con dieta semiartificiale. - *Boll. Ist. Ent. Univ. Bologna*, 32: 11-25.
- CAMPADELLI G., DINDO M.L., 1987. - Recenti progressi nello studio delle diete artificiali per l'allevamento di insetti entomofagi parassiti. - *Boll. Ist. Ent. «G. Grandi» Univ. Bologna*, 42: 101-118.
- CLAUSEN C.P., 1962. - Entomophagous insects. - 688 pp. (cfr. pp. 230-236). Hafner Publishing Company, New York.
- DINDO M.L., 1987. - Effetti indotti da insetti parassitoidi nei loro ospiti. - Tesi di Dottorato di ricerca in Entomologia agraria (I ciclo), 174 pp.
- DOWDEN P.B., 1935. - *Brachymeria intermedia* (Nees) a primary parasite, and *B. compsilurae* (Cwfd.) a secondary parasite, of the gypsy moth. - *J. Agric. Res.*, 50, (6): 495-523.
- FISHER R.C., 1971. - Aspects of the physiology of endoparasitic Hymenoptera. - *Biological Reviews*, 46 (2): 243-277.
- MELLINI E., 1978. - Moderni problemi di entomoparassitologia. - *Atti XI Cong. Naz. It. Ent.*, Portici - Sorrento, 10-15 maggio 1976: 263-292.

- MELLINI E., 1983. - L'ipotesi della dominazione ormonale, esercitata dagli ospiti sui parassitoidi, alla luce delle recenti scoperte nella endocrinologia degli insetti. - *Boll. Ist. Ent. «G. Grandi» Univ. Bologna*, 33: 135-166.
- MELLINI E., 1985a. - Importanza degli stadi postembrionali degli ospiti olometabolici, al momento dell'attacco, per la biologia degli Imenotteri parassiti. - *Boll. Ist. Ent. «G. Grandi» Univ. Bologna*, 40: 13-49.
- MELLINI E., 1985b. - Importanza degli stadi postembrionali degli ospiti eterometabolici, al momento dell'attacco, per la biologia degli Imenotteri parassiti. - *Boll. Ist. Ent. «G. Grandi» Univ. Bologna*, 40: 67-83.
- MELLINI E., 1986. - Importanza dello stadio dell'ospite, al momento della parassitizzazione, per la biologia dei Ditteri Larvevoridi. - *Frustula Entomologica*, 7-8: 395-419.
- MINOT M.C., LEONARD D. E., 1976. - Host preference and development of the parasitoid *Brachymeria intermedia* in *Lymantria dispar*, *Galleria mellonella*, and *Choristoneura fumiferana*. - *Env. Ent.*, 5 (3): 527- 532.
- 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., 1981. - *Brachymeria lasus*: culture *in vitro* of a chalcid insect parasite. - *Exper. Parasit.*, 52: 414-418.
- THOMPSON S. N., 1986. - Nutrition and *in vitro* culture of insect parasitoids. - *Ann. Rev. Entomol.*, 31: 197-219.