

PAOLO FANTI

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

Fattori ormonali inducenti la prima muta larvale del  
parassitoide *Pseudogonia rufifrons* Wied. (Diptera Tachinidae)  
in substrati di crescita *in vivo* e *in vitro*

(Lavoro eseguito con il contributo del Ministero della Pubblica Istruzione - M.P.I. 40%)

INTRODUZIONE

La possibilità di allevare insetti parassitoidi su diete artificiali riveste un interesse notevole, per motivi di ordine teorico ed applicato. Tale opportunità può infatti aprire nuove prospettive alla produzione massale di tali ausiliari, incoraggiandone così l'utilizzazione all'interno dei programmi di lotta integrata agli insetti dannosi (Mellini, 1975b; Greany *et al.*, 1984, Campadelli e Dindo, 1987). Inoltre l'impiego di substrati *in vitro* permette di approfondire la conoscenza delle complesse relazioni ospite-parassita, grazie ad un maggiore controllo sull'ambiente di crescita dell'entomofago privato dei fattori legati al metabolismo dell'ospite.

Uno degli aspetti della relazione ospite-parassita che può essere proficuamente studiato in tal modo è quello dei rapporti endocrinologici che si possono instaurare all'interno della coppia di simbionti (Mellini, 1983; Beckage, 1985; Lawrence, 1986a). Sperimentazioni che dimostrano una relazione fra eventi ormonali dell'ospite e fasi dello sviluppo del parassita *in vivo* non permettono infatti di distinguere un'azione diretta sull'entomofago da effetti indiretti sull'ospite, mediati ormonalmente, e che comportano successivamente conseguenze sul parassitoide. Tecniche di allevamento *in vitro* permettono invece di studiare tali relazioni con un numero di variabili ridotto. Tale strategia è stata, ad esempio, adottata da Nenon (1972a, 1972b), Lawrence (1986b), Lawrence e Hagedorn (1986) e Grenier (1988a).

In questa sperimentazione si è voluto approfondire alcuni aspetti della relazione ormonale fra il parassitoide *Pseudogonia rufifrons* Wied. [= *Gonia cinerascens* Rond.] ed il suo ospite di sostituzione *Galleria mellonella* L. Lavorando sperimentalmente su tale coppia, Baronio e Sehnal (1980) hanno dimostrato che esiste una relazione obbligata fra il passaggio dalla prima alla seconda età larvale del parassitoide e gli eventi ormonali della sua vittima, ma, non riuscendo a

riprodurre *in vitro* la muta del tachinide, non hanno potuto trarre conclusioni definitive sulla natura dell'effetto, diretto o meno, esercitato dagli ecdisteroidi dell'ospite su *P. rufifrons*.

Nel corso di questa ricerca sono stati pertanto impiegati substrati artificiali per l'allevamento dell'entomofago, al fine di comparare gli effetti di trattamenti ormonali con i risultati osservati *in vivo*.

#### MATERIALI E METODI

*G. mellonella* e *P. rufifrons* sono state allevate in laboratorio secondo le tecniche descritte rispettivamente da Campadelli (1973) e Baronio e Campadelli (1978).

Le uova microtipiche deposte su zimbelli di cera venivano somministrate a larve di *G. mellonella* all'inizio dell'ultima età in quantitativi elevati per ottenere materiale superparassitizzato.

Dopo circa 72 ore dalla contaminazione, salvo quando diversamente indicato, gli ospiti venivano dissezionati per prelevare le larve di 1<sup>a</sup> età del tachinide e trasferirle sul substrato di crescita prescelto. Prima della dissezione le larve venivano immerse per alcuni secondi in etanolo al 70 % e quindi anestetizzate immergendole in acqua distillata.

Per rimuovere i residui di corpo adiposo dell'ospite le larve dell'entomofago venivano sottoposte a tre lavaggi consecutivi in soluzione fisiologica di Ephrussi-Beadle, previamente filtrata con filtri sterili Millex - GS (Millipore S.A.) da 0.22 µm.

Il substrato trofico *in vivo* era costituito da addomi «legati» di *G. mellonella*, preparati secondo la tecnica descritta da Sehnal e Granger (1975). Gli addomi isolati rimangono vitali per diverse settimane e, essendo privati delle ghiandole protoraciche e dei corpi allati, non presentano variazioni endocrine e non sono soggetti ai cambiamenti associati all'incrisalidamento, a meno che non vengano sottoposti a trattamenti topici con ormoni (Sehnal, 1972).

I trapianti di L<sub>1</sub> di *P. rufifrons* sono stati effettuati entro le 24-48 h successive alla preparazione degli addomi, ponendo le larvette vicino ad un'incisione praticata sul tegumento di un ospite anestetizzato e introducendole delicatamente con la punta di una sottile bacchetta di vetro, appositamente modellata alla fiamma.

Parte dei substrati *in vitro* erano costituiti da omogeneizzati di pupe di *G. mellonella* formate da non più di 24-48 h. Per la preparazione si procedeva nel modo descritto da Bratti e Monti (1988). Le larve dell'entomofago venivano trasferite sul substrato, previo lavaggio come precedentemente descritto, tramite pipette Pasteur usando come liquido di trasporto la soluzione salina di Ephrussi-Beadle.

Nel corso della ricerca è stato anche utilizzato come substrato di crescita un omogeneizzato di larve al quarto giorno dell'ultima età, preparato con le stesse modalità.

L'altro substrato di crescita *in vitro* impiegato era costituito dalla dieta chimicamente definita elaborata da Nettles per lo sviluppo di *Eucelatoria bryani* (Nettles, 1986). I contenitori usati per questa dieta e la modalità di trasferimento delle larvette erano gli stessi usati per gli omogeneizzati, ad eccezione del liquido di trasporto, che era quello impiegato da Nettles (1986).

Per limitare contaminazioni fungine e batteriche tutte le attrezzature impiegate (pipette, pinzette, ecc.) sono state preventivamente autoclavate a 120 °C e 1.8 bar per 15 min. e si è operato il più possibile, nel corso della sperimentazione, sotto cappa a flusso laminare.

Gli ormoni impiegati sono l'ormone giovanile I (Sigma Chemical Co.), il methoprene (fornito dal Dr. Staal, Zoecon Co.), e il 20idrossiecdisone (Sigma Chemical Co.).

Nella sperimentazione gli ormoni sono stati incorporati nei substrati *in vitro* oppure sono state effettuate applicazioni topiche su addomi isolati su cui erano state trapiantate larve di *P. rufifrons* ovvero su larvette poi trasferite su dieta artificiale.

In una prova L<sub>1</sub>, estratte dopo 70-96 h. dalla contaminazione della larva ospite, sono state immerse per circa 60 min. in soluzioni allo 0.05 e 0.1 % di JHI, usando come solvente una emulsione di Tween-80 allo 0.1 % in acqua (Sláma, 1974), e quindi trasferite su omogeneizzati. Un gruppo di larvette testimoni sono state bagnate in una emulsione priva di ormone. Per questa prova sono state eseguite tre repliche. La scelta del Tween-80, dotato di minore attività rispetto ad altri solventi organici (acetone, etanolo, ecc.), è stata fatta per evitare ripercussioni negative sul parassitoide. Un'altra prova è stata effettuata impiegando soluzioni di Methoprene allo 0.1 e all'1% (due repliche).

I trattamenti topici con 20-idrossiecdisone sono stati effettuati con le stesse modalità, ma in soluzione acquosa allo 0.1%.

Il JHI è stato addizionato all'omogeneizzato in concentrazioni di 2 e 10 ng/g., tenendo presente le indicazioni sui titoli di JH nelle larve di *G. mellonella* riportate da Hsiao e Hsiao (1977), Peferoen e DeLoof (1980) e Senhal (1985).

Il 20-idrossiecdisone è stato incorporato alla dieta in concentrazione  $2 \times 10^{-6}$  M, scelta in base al titolo di ecdisone rilevato prima dell'apolisi larva-pupale in *G. mellonella* da Sehnal *et al.* (1981).

Analisi statistica - Per valutare la significatività delle differenze osservate è stato impiegato prevalentemente il test  $X^2$  in tabelle di contingenza  $m \times n$  (Snedecor e Cochran, 1980), applicando, quando necessario, la correzione di Yates o il test esatto di Fischer (Scossiroli e Palenzona, 1971). In alternativa, è stata eseguita l'analisi della varianza, utilizzando per dati percentuali la trasformazione angolare e, per piccoli campioni ( $n < 50$ ) i valori tabulati da Mosteller e Youtz (1961).

## RISULTATI

In alcune prove preliminari si è esaminato il comportamento delle L<sub>1</sub> di *P. rufifrons* estratte da larve di *G. mellonella* circa 72 h. dopo la contaminazione e

quindi trapiantate in addomi legati; questi venivano dissezionati dopo una decina di giorni e le larvette rinvenute venivano nuovamente trasferite su altri addomi. Una cinquantina di parassitoidi sono stati tenuti in questo modo per sessanta giorni senza che si verificasse una muta larvale. Dopo tale periodo quindici  $L_1$ , trapiantate in larve di ultima età di *G. mellonella*, dopo l'incrisalidamento dell'ospite, hanno ripreso e completato il loro sviluppo.

Altri addomi, 24-48 h. dopo la legatura, sono stati immersi in una soluzione allo 0.1 % di 20-idrossiecdisone (Sehna, 1972): in poco più della metà dei casi l'effetto di tale trattamento è stato un incrisalidamento parziale o completo, accompagnato dalla muta di 24 tachinidi su 32. Nelle sperimentazioni successive, addomi isolati sono stati impiegati principalmente per ospitare  $L_1$  come controlli rispetto a quelle trasferite su substrati *in vitro*.

Sviluppo delle  $L_1$  di *P. rufifrons* su substrati *in vitro* costituiti da omogeneizzato di crisalide.

Alimentando larve di prima età con un omogeneizzato di crisalidi di *G. mellonella*, preparato con la procedura precedentemente descritta, si è ottenuto il passaggio in seconda età di circa l'ottanta per cento delle larvette e quindi la formazione di pupari vitali e di femmine adulte feconde (tab.1). Un risultato analogo è stato ottenuto da Bratti e Monti (1988).

Si è inoltre voluto verificare la possibilità per le  $L_1$  del tachinide di svilupparsi in un omogeneizzato costituito da larve al quarto giorno dell'ultima età. Nessuna larvetta delle 63 impiegate è mutata negli 11 gg in cui è stata condotta l'osservazione, mentre  $L_1$  della medesima origine immesse su un omogeneizzato di crisalide sono mutate in 19 casi su 25 ( $X^2 = 30.19$ ,  $p < 0.01$ , corretto secondo Yates).

Confrontando omogeneizzati preparati con crisalidi maschili ovvero femminili non si sono riscontrate differenze nel passaggio alla 2ª età, quindi nelle prove seguenti gli omogeneizzati sono stati preparati senza distinguere il sesso dell'ospite.

Sviluppo delle  $L_1$  di *P. rufifrons* in omogeneizzati di pupa: effetto del tempo di permanenza nella larva ospite e di ormone giovanile (JH1) addizionato al substrato.

In questa prova sono state impiegate  $L_1$  estratte da larve di *G. mellonella* 48, 72 e 96 h. dopo la contaminazione e poste su un omogeneizzato di controllo

Tab. 1 - Sviluppo di  $L_1$  di *P. rufifrons* in un substrato artificiale subnaturale costituito da omogeneizzato di crisalide di *G. mellonella*.

n° $L_1$	mutate in 2ª età	% sulle $L_1$	mutate in 3ª età	% sulle $L_2$	pupari	adulti vitali
211	169	80.1	13	7.7	8	5

preparato con la procedura precedentemente descritta e su omogeneizzati addizionati con JHI, in concentrazioni di 2 e 10 ng/g.

La durata del tempo trascorso tra l'ingestione delle uova microtipiche e la successiva estrazione delle  $L_1$  non ha avuto influenza sulla percentuale di parassitoidi mutati in 2 età (tab. 2) ( $X^2 = 0.81$ , n.s.), ma si è riscontrata una eterogeneità significativa prendendo in considerazione il n° di larve mutate nelle 48 h. successive all'immissione sul substrato *in vitro* ( $X^2 = 7.15$ ,  $p < 0.05$ ). Scomponendo i gradi di libertà della tabella 3 x 2, si osserva che la differenza è significativa nel confronto fra larve estratte dopo 48 h. di permanenza nella larva ospite e quelle immerse nell'omogeneizzato dopo 70 e 96 h ( $X^2 = 4.98$ ,  $p < 0.05$ , calcolato applicando la correzione di Yates).

L'immissione di JHI nel *pabulum* artificiale non ha comportato differenza nelle percentuali di larve mutate in 2 età ( $X^2 = 0.58$ ), ma ha rivelato un'eterogeneità significativa ( $X^2 = 7.33$ ,  $p < 0.05$ ) fra le tesi per quello che riguarda il passaggio al terzo stadio larvale (tab. 3), in particolare fra il controllo e gli omogeneizzati con aggiunta di JHI ( $X^2 = 5.51$ ,  $p < 0.05$ , corretto secondo Yates).

Sviluppo delle  $L_1$  di *P. rufifrons* in omogeneizzati di pupa: effetto di trattamenti topici con JHI e Methoprene.

I dati relativi alle percentuali di larvette mutate in 2 età (tab. 4) rivelano un'eterogeneità altamente significativa fra le tesi a confronto ( $X^2 = 10.59$ ,  $p < 0.01$ ). L'applicazione topica dell'ormone giovanile ha comportato una inibizione dello sviluppo di *P. rufifrons*, poichè la scomposizione degli effetti si rivela altamente significativa contrapponendo il testimone alle tesi trattate ( $X^2 = 6.91$ ,  $p < 0.01$ , corretto secondo Yates), mentre non differiscono fra loro le due concentrazioni ( $X^2 = 2.59$ , n.s.). Va peraltro osservato che la dose più elevata non ha dato l'effetto maggiore.

Anche la somministrazione di methoprene ha dato risultati simili (tab. 5) ( $X^2 = 7.03$ ,  $p < 0.05$ ). In questo caso si è tenuto inoltre conto del tempo impiegato dal parassitoide per raggiungere la seconda età. Tale valore aumenta dalle 53 h. impiegate in media dalle  $L_1$  del testimone fino alle 75 h. del trattamento con la soluzione allo 0.1 % di juvenoide. L'analisi della varianza ed il test di separazione delle medie hanno indicato che la variazione è significativa.

Tab. 2 - Relazione fra il tempo di permanenza nell'ospite prima del trasferimento sull'omogeneizzato e il passaggio in 2 età del parassitoide.

h. nella larva ospite	mutate in 2ª età	mutate in 48 h.
48	92.9 %	71.4 %
72	95.3 %	92.2 %
96	90.6 %	87.5 %

Tab. 3 - Relazione fra la concentrazione di JHI nell'omogeneizzato ed il successivo sviluppo del parassitoide.

Conc. di JHI nell'omogen.	mutate in 2 <sup>a</sup> età	mutate in 3 <sup>a</sup> età
Testimone	91.2 %	26.5 %
2 ng/g	93.5 %	10.9 %
10 ng/g	95.5 %	6.8 %

Sviluppo delle L<sub>1</sub> di *P. rufifrons* in un substrato *in vitro* chimicamente definito: azione del 20-idrossiecdisone.

In questa prova è stata utilizzata la dieta elaborata da Nettles per lo sviluppo di *E. bryani*. Poichè tentativi preliminari di allevamento impiegando L<sub>1</sub> di *P. rufifrons* avevano mostrato che il parassitoide, pur rimanendo vitale, non riusciva a mutare in 2<sup>a</sup> età<sup>(1)</sup>, si è voluto verificare se la causa del mancato sviluppo era di natura endocrina. L<sub>1</sub> estratte dopo tre gg di permanenza nella larva ospite sono state isolate in tre gruppi: un testimone, una tesi a cui è stato somministrato topicamente 20-idrossiecdisone, ed una tesi in cui alla dieta veniva aggiunto l'ecdisteroide in concentrazione  $2 \times 10^{-6}$  M.

Per entrambe le repliche si è inoltre eseguito un ulteriore controllo trapianando una ventina di L<sub>1</sub> in addomi legati.

I parassitoidi mantenuti sulla dieta di controllo, pur rimanendo vitali per il periodo in cui sono state eseguite le osservazioni (23 gg.), non hanno proseguito il loro sviluppo, se non in percentuale trascurabile (tab. 6), mentre nelle tesi interessate al trattamento si è avuto il passaggio alla 2<sup>a</sup> età nell' 80 % dei casi. L'eterogeneità risulta altamente significativa ( $F = 38.2$ ,  $p < 0.01$ ).

Il tempo impiegato dalle L<sub>1</sub> per accrescersi e compiere la prima muta è risultato differire in misura significativa ( $F = 3.4$ ,  $p < 0.05$ ) fra il controllo e le tesi trattate, ma non fra queste ultime (tab. 6).

Tab. 4 - Effetto di trattamenti topici con JHI sul parassitoide sul passaggio in 2<sup>a</sup> età una volta trasferito sull'omogeneizzato.

Trattamento	mutate in 2 <sup>a</sup> età
Testimone	85.7 %
JHI (sol. 0.05 %)	54.8 %
JHI (sol. 0.1 %)	71.1 %

(<sup>1</sup>) Su tale substrato, senza addizione di ormoni, Bratti (1989) ha ottenuto lo sviluppo fino allo stadio pupale partendo da L<sub>2</sub> di *P. rufifrons*.

Tab. 5 - Effetto di trattamenti topici con Methoprene sul parassitoide: percentuale di larve mutate e tempi medi per il passaggio alla seconda età dopo il trasferimento sull'omogeneizzato. Medie seguite dalla stessa lettera non differiscono tra loro ( $\alpha = 0.05$ , Duncan's Multiple Range Test).

Trattamento	mutate in 2 <sup>a</sup> età	h.
Testimone	100.0 %	53.3 a
Methoprene (sol. 0.1 %)	65.6 %	59.7 a
Methoprene (sol. 1 %)	75.0 %	75.4 b

In entrambe le repliche nessuna delle larvette trapiantate in addomi legati ha proseguito il proprio sviluppo e sono state tutte rinvenute in prima età dissezionando gli ospiti dopo 23 gg.

Un trattamento topico con le modalità già descritte è stato inoltre eseguito su un piccolo numero di L<sub>1</sub> dopo 11 gg di permanenza sul substrato *in vitro* privo di 20-idrossiecdisione: 8 larvette su 18 hanno ripreso il loro sviluppo e sono mutate in seconda età, a differenza dei parassitoidi non trattati ( $p = 0.04$ , test esatto di Fischer).

#### DISCUSSIONE

Le osservazioni preliminari hanno confermato quanto riportato da Baronio e Sehnal (1980): lo sviluppo della larvetta del tachinide appare condizionato dagli eventi fisiologici connessi alla muta larva-pupale dell'ospite, in particolare dalle variazioni di carattere endocrino, come sottolineato da Mellini (1975a, 1983).

L'omogeneizzato di crisalidi si è rivelato un valido medium per lo studio della crescita di *P. rufifrons* fino allo stadio adulto. Tale risultato è interessante perchè è il primo caso di parassitoide larva-pupale obbligato di cui si sia ottenuto lo sviluppo a partire dalla prima età su un substrato inerte. Le specie di Tachinidi finora allevate *in vitro* (Grenier *et al.*, 1975; Grenier *et al.*, 1978; Nettles *et al.*, 1980; Nettles, 1989) crescono o possono crescere a spese del solo stadio larvale dell'ospite.

Tab. 6 - Effetto del 20-idrossiecdisione sulla percentuale di parassitoidi mutati e sul tempo medio per il passaggio in 2<sup>a</sup> età. Nella stessa colonna medie seguite dalla stessa lettera non differiscono tra loro ( $\alpha = 0.05$ , Duncan's Multiple Range Test).

Trattamento	% L <sub>2</sub>	h.
Testimone	4.95 a	30.0 a
L <sub>1</sub> in addomi legati	0.00 a	/
topico: 1 h. in sol. 0.1 %	84.75 b	65.1 b
2 * 10 <sup>-6</sup> M nella dieta	67.70 b	61.9 b

In merito al titolo di ecdisione presente nelle crisalidi di *G. mellonella* 24 h. dopo la muta, Sehnal *et al.* (1981) hanno misurato una concentrazione di  $901 \pm 153$  (media  $\pm$  S.E.) ng/g peso fresco, con un picco di circa 1400 ng/g nei maschi e poco più di 2000 ng/g per le femmine circa 48 ore dopo l'ecdisi. Tali valori sono più elevati di quelli riscontrati nelle larve di ultima età subito prima dell'apolisi (circa 780 ng/g) e sono quindi più che sufficienti per soddisfare le condizioni ormonali necessarie alla muta del parassitoide. L'incapacità di compiere la prima muta in un omogeneizzato ottenuto da larve al quarto giorno dell'ultima età può essere plausibilmente attribuita all'assenza di ecdisteroidi nel substrato.

Baronio e Sehnal (1980) avevano ottenuto pupari e un adulto vitale mantenendo *P. rufifrons* su un omogeneizzato di crisalide di *G. mellonella*, ma partendo da larve di seconda età, mentre  $L_1$  sul medesimo substrato sopravvissero per 2-3 gg senza apprezzabili cambiamenti nelle dimensioni e non mutarono. Tale incapacità del parassitoide a mutare e continuare lo sviluppo veniva imputata a bassi livelli di ecdisteroide nel *pabulum* così preparato. Tale risultato può essere invece probabilmente spiegato con la diversa preparazione del substrato di crescita: i due Autori avevano infatti impiegato, per evitare ossidazioni, feniltiourea, in concentrazione  $10^{-4}$  M. Tale sostanza risulta tossica nei confronti degli Imenotteri endoparassitoidi *Cotesia marginiventris* e *Microplitis croceipes* (Greany, 1986) e del Dittero Tachinide *Eucelatoria bryani* (Nettles, comunicazione personale). Impiegando l'omogeneizzato a cui era stata aggiunta feniltiourea  $10^{-4}$  M, Bratti (comunicazione personale) ha verificato che l'entomofago non cresce e non muta.

Il tempo di permanenza nella larva ospite, pur non incidendo sulla percentuale di  $L_2$  del parassitoide, ha influenzato il tempo necessario al passaggio in seconda età e ciò suggerisce che le  $L_1$  di *P. rufifrons* debbano raggiungere dimensioni adeguate per effettuare la muta. Non è stato peraltro possibile determinare questa ipotetica soglia ponderale perchè la manipolazione necessaria per pesare le larvette prima dell'immissione sul substrato artificiale comportava difficoltà per mantenere le condizioni di sterilità desiderate e avrebbe pregiudicato la vitalità delle stesse. Va sottolineato il fatto che, essendo un substrato inerte più vulnerabile di un ospite vivo a problemi di contaminazione batterica o fungina, poter ridurre i tempi di sviluppo dell'entomofago acquista una notevole importanza.

Apparentemente l'ormone giovanile assunto *per os* ha comportato una inibizione dello sviluppo del parassitoide, peraltro percentualmente modesta, almeno alle concentrazioni saggiate, ma tale effetto non si è manifestato in tempi sufficientemente rapidi da influenzare il passaggio alla seconda età. Applicazioni topiche di JHI o juvenoidi hanno comportato un'inibizione dello sviluppo delle  $L_1$ , anche se l'effetto è stato inferiore alle aspettative, in relazione alle dosi impiegate. Baronio e Sehnal (1980), affermano che lo sviluppo del parassitoide nell'ultimo stadio larvale dell'ospite può essere inibito da applicazioni esogene di JH, ma solo in quanto il trattamento previene la trasformazione larva-pupale dell'ospite. In altri termini l'effetto sul tachinide sarebbe prevalentemente indi-



retto, mediato dalle trasformazioni biochimiche che interessano o meno il sim-bionte. Pur non escludendo tale ipotesi, che non permette peraltro di spiegare le osservazioni di Fanti e Bratti (1988) sulla capacità del parassitoide di compiere mute precoci, i dati ottenuti nella presente sperimentazione inducono a ritenere che esiste la possibilità di un'azione diretta sul parassitoide, ancorchè parziale.

I risultati ottenuti impiegando la dieta di Nettles confermano la relazione esistente fra la condizione ormonale dell'ospite ed lo sviluppo del parassitoide *P. rufifrons* e indicano che in un substrato *in vitro* chimicamente definito la muta dalla prima alla seconda età avviene solo in presenza di 20-idrossiecdisonone. Questa osservazione conduce a ritenere che l'effetto esercitato dall'ormone sul parassitoide sia diretto e non mediato da trasformazioni biochimiche del sim-bionte e rende inoltre plausibile che *P. rufifrons* assuma ed utilizzi gli ec-disteroidi dell'ospite *in vivo*.

In merito alle modalità di assunzione dell'ormone, Beckage (1985) ha suggerito che il passaggio dell'ecdisonone potrebbe avvenire attraverso la sottile e non idrofobica cuticola di molti parassitoidi in prima età. Hasegawa e Ata (1972) hanno dimostrato che in *Bombix mori* L. l'attraversamento della cuticola da parte dell'ecdisonone è possibile. Un'alternativa a tale modalità è costituita dall'ingestione, come proposto da Riddiford (1975). I risultati ottenuti nella presente sperimentazione non permettono di escludere, per *P. rufifrons*, nessuna delle due possibilità. Altre ricerche sono necessarie per approfondire tale punto, così come per chiarire altri aspetti della relazione ormonale fra i due sim-bionti, già evidenziati da Mellini (1975) e Lawrence e Hagedorn (1986).

Un approfondimento delle conoscenze sugli esatti meccanismi che regolano la dipendenza ormonale dell'entomofago dalla vittima riveste un'importanza non solo scientifica, ma anche pratica. Diversi parassitoidi sono stati allevati, in condizioni sperimentali, su diete artificiali senza aggiunta di ormoni, ma nessuno di essi è un parassitoide larva-pupale obbligato (il cui ciclo biologico necessita di una connessione con la metamorfosi dell'ospite). E' probabile che il ruolo esercitato dagli ormoni nel rapporto fisiologico ospite-parassitoide sia stato sotto-valutato da questo punto di vista e che una maggiore considerazione possa aprire nuove possibilità nella messa a punto di substrati *in vitro* per l'allevamento di tali entomofagi.

#### RIASSUNTO

*Pseudogonia rufifrons* Wied. [= *Gonia cinerascens* Rond.] è un parassitoide larva-pupale in cui è stata dimostrata la relazione fra la prima muta larvale e gli eventi ormonali dell'ospite, ma senza finora chiarire se l'azione degli ecdisteroidi è diretta ovvero mediata da trasformazioni biochimiche della vittima.

Nel corso di questa ricerca sono pertanto stati comparati gli effetti di trattamenti ormonali su parassitoidi allevati *in vivo* e *in vitro*, impiegando diete artificiali subnaturali o chimicamente definite e, come substrati *in vivo*, addomi «legati» di *Galleria mellonella* L. Gli ormoni utilizzati

(JH-I, methoprene, 20 idrossiecdisone) sono stati incorporati nei substrati *in vitro* oppure somministrati topicamente su addomi isolati dell'ospite in cui erano state trapiantate larve di *P. rufifrons* ovvero su parassitoidi poi trasferiti su dieta artificiale.

Larve di 1<sup>a</sup> età del parassitoide trapiantate in addomi legati dell'ospite, sono rimaste vive fino a sessanta giorni, cioè per tutta la durata delle osservazioni, senza che si verificasse la muta larvale. Larve trapiantate dopo tale periodo in ospiti integri hanno, all'incrisalidamento dell'ospite, ripreso e completato il loro sviluppo. Allo stesso modo, l'incrisalidamento, parziale o totale, degli addomi legati di *G. mellonella*, in seguito a trattamenti topici con 20-idrossiecdisone, ha comportato la muta larvale del parassitoide. Larve di 1<sup>a</sup> età del tachinide trasferite su un omogeneizzato di pupe di *G. mellonella* sono mutate nella quasi totalità dei casi e sono state successivamente in grado di proseguire il loro sviluppo, mentre in un omogeneizzato preparato con larve al quarto giorno dell'ultima età i parassitoidi hanno arrestato il loro sviluppo senza effettuare la muta. Il tempo di permanenza del parassitoide nell'ospite prima del trasferimento sulla dieta artificiale subnaturale ha influenzato il tempo necessario al passaggio in seconda età, ma non il numero di larve mutate. Così l'aggiunta di JH-I all'omogeneizzato non ha modificato la percentuale di L<sub>2</sub>, ma ha comportato un successivo rallentamento del loro sviluppo ed una riduzione delle larve passate in 3 età. Trattamenti topici con JH-I o methoprene hanno invece avuto un effetto più rapido, inibendo lo sviluppo e la muta di parte dei parassitoidi.

In un substrato *in vitro* chimicamente definito privo di ormoni le L<sub>1</sub> arrestano il loro sviluppo e non mutano in seconda età, a meno che non vengano sottoposte a un trattamento topico con 20-idrossiecdisone o che l'ecdisteroide venga incorporato nella dieta.

Le osservazioni svolte inducono a ritenere che l'effetto ormonale esercitato sul parassitoide sia diretto e non mediato da trasformazioni biochimiche del simbionte e rende inoltre plausibile che *P. rufifrons* assuma ed utilizzi gli ecdisteroidi dell'ospite *in vivo*.

#### Hormonal factors triggering the first larval molt of the parasitoid *Pseudogonia rufifrons* Wied. (Diptera Tachinidae) reared *in vivo* and *in vitro*.

#### SUMMARY

While the link between first molt and hormonal status has been established for *Pseudogonia rufifrons* Wied. [= *Gonia cinerascens* Rond.], a larvalpupal parasitoid, no proof has yet been adduced for a direct hormonal effect or a mediated one, through biochemical transformations of the host.

In the present paper the effects of hormonal treatments were compared for parasitoids reared *in vivo* (ligated abdomens of *Galleria mellonella*) and *in vitro* (pupal homogeneous or chemically defined diets). All the maggots used in the experiments were extracted by dissection from previously parasitized hosts. The hormones (JH-I, methoprene, 20-hydroxyecdysone) were applied topically (to ligated abdomens in which the maggots had been transferred or to maggots reared on artificial diet) or added to a chemically defined diet.

First instar maggots transplanted in ligated abdomens never molted, except in hosts that pupated after a topical treatment with 20-hydroxyecdysone.

Almost all of the first instar maggots transferred to pupal homogeneous of *Galleria mellonella* molted and were able to continue their development, while in homogeneous prepared with 4 day old last instar larvae the parasitoids growth was arrested.

The age of the maggots when transferred to the homogeneous influenced the time needed to molt, but not the percentage of molted parasitoids. The addition of JH-I to the homogeneous did

not affect the first molt of the maggots, but their subsequent growth was slow and a lower percentage, compared to control, molted to the third instar. Topical treatments with JH-I or methoprene had a quicker effect, preventing the first molt of some maggots.

In the chemically defined diet, free of ecdisteroids, the first instar maggots showed arrested growth and did not molt, unless they were treated with 20-hydroxyecdysone, either topically or added to the diet. These results suggest that the hormonal effect on the parasitoid is direct and the molt could be promoted by direct uptake of the hosts' ecdysteroids.

#### BIBLIOGRAFIA CITATA

- BARONIO P., CAMPADELLI G., 1978. - Ciclo biologico di *Gonia cinerascens* Rond. (Dipt. Tachinidae) allevata in ambiente condizionato sull'ospite di sostituzione *Galleria mellonella* L. (Lep. Galleriidae). - *Boll. Ist. Ent. Univ. Bologna*, 34: 35-54.
- BARONIO P., SEHNAL F., 1980. - Dependence of the parasitoid *Gonia cinerascens* on the hormones of its Lepidopterous hosts. - *J. Insect Physiol.*, 26: 619-626.
- BECKAGE N.E., 1985. - Endocrine interactions between endoparasitic insects and their hosts. - *Ann. Rev. Entomol.*, 30: 371-413.
- BRATTI A., 1989. - Allevamento in vitro di *Pseudogonia rufifrons* Wied. in estratti di omogeneizzato di crisalidi di *Galleria mellonella* L. e su diete meridiche. - *Boll. Ist. Ent. «G. Grandi» Univ. Bologna*, 44: 11-22.
- BRATTI A., MONTI M., 1988. - Allevamento «in vitro» delle larve di *Pseudogonia rufifrons* Wied. su omogeneizzati di pupae di *Galleria mellonella* L.. - *Boll. Ist. Ent. «G. Grandi» Univ. Bologna*, 43: 115-126.
- CAMPADELLI G., 1973. - Allevamento di *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera Galleriidae) con dieta semiartificiale. - *Boll. Ist. Entomol. 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.
- FANTI P., BRATTI A., 1988. - Sulla possibilità di mute precoci di *Pseudogonia rufifrons* Wied. (Diptera Tachinidae) in larve immature di *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera Galleriidae). - *Boll. Ist. Ent. «G. Grandi» Univ. Bologna*, 43: 127-137.
- GREANY P., 1986. - *In vitro* culture of Hymenopterous larval endoparasitoids. - *J. Insect Physiol.*, 32: 409-419.
- GREANY P., VINSON S.B., LEWIS W.J., 1984. - Insect parasitoids: finding new opportunities for biological control. - *BioScience*, 34:690-696.
- GRENIER S., 1988a. - Developmental relationships between the tachinid parasitoid *Pseudophrichaeta nigrolineata* and two host species-hormonal implications. - In: *Parasitoid insects*, Lyon, September 7-10, 1987, Bouletreau M. e Bonnot G. eds., *Les Colloques de l'INRA*, 48: 87-90.
- GRENIER S., BONNOT G., DELOBEL B., 1975. - Definition 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, 1: 13-25.
- GRENIER S., BONNOT G., DELOBEL B., LAVIOLETTE P., 1978. - Développement en milieu artificiel du parasitoïde *Lixophaga diatreae* (Townsend) (Diptera, Tachinidae). Obtention de l'imago à partir de l'oeuf. - *C.R. Acad. Sci. Paris, Ser. D*, 387: 535-538.
- GRENIER S., DELOBEL B., BONNOT G., 1986. - Physiological consideration of importance to the success of in vitro culture: an overview. - *J. Insect Physiol.*, 32: 403-408.
- HASEGAWA K., ATA A.M., 1972. - Penetration of phytoecdysones through the pupal cuticle of the silkworm, *Bombix mori*. - *J. Insect Physiol.*, 18: 959-971.
- HSIAO T.H., HSIAO C., 1977. - Simultaneous determination of molting and juvenile hormone titres of the greater wax moth. - *J. Insect Physiol.*, 23: 89-93.

- LAWRENCE P.O., 1986a. - Host-parasite hormonal interactions: an overview. - *J. Insect Physiol.*, 32: 295-298.
- LAWRENCE P.O., 1986b. - The role of 20-hydroxyecdysone in the moulting of *Biosteres longicaudatus*, a parasite of the caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa*. - *J. Insect Physiol.*, 32: 329-337.
- LAWRENCE P.O., HAGEDORN H.H., 1986. - Relationship between the ecdysteroid titres of a host and those of its parasite. - *Insect Biochem.*, 16: 163-167.
- MELLINI E., 1975a. - Studi sui Ditteri Larvevoridi. XXV. Sul determinismo ormonale delle influenze esercitate dagli ospiti sui loro parassiti. - *Boll. Ist. Entomol. Univ. Bologna*, 31: 165-203.
- MELLINI E., 1975b. - Possibilità di allevamento di Insetti entomofagi parassiti su diete artificiali. - *Boll. Ist. Ent. Univ. Bologna*, 32: 257-290.
- MELLINI E., 1976. - Moderni problemi di entomoparassitologia. - *Atti XI Congr. naz. ital. Ent., Portici-Sorrento*: 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. Entomol. Univ. Bologna*, 38: 135-166.
- MOSTELLER F.M., YOUTZ C., 1961. - Tables of the Freeman-Tukey transformations for the binomial and Poisson distributions. - *Biometrika*, 48: 433-440.
- NENON J.P., 1972a. - Culture in vitro des embryons d'un Hymenoptère endoparasite poly-embryonnaire: *Ageniaspis fuscicollis* (= *Encyrtus fuscicollis*). Role des hormones de synthèse. - *C.R. Acad. Sci. Paris D*, 274: 3299-3302.
- NENON J.P., 1972b. - Culture in vitro des larves d'un Hymenoptère endoparasite poly-embryonnaire: *Ageniaspis fuscicollis*. Role des hormones de synthèse. - *C.R. Acad. Sci. Paris D*, 274: 3409-3412.
- NETTLES W.C. JR., 1986. - Effect of soy flour, bovine serum albumin, and three amino acid mixtures on growth and development of *Eucelatoria bryani* (Diptera: Tachinidae) reared on artificial diets. *Env. Entomol.*, 15: 1111-1115.
- NETTLES W.C. JR., 1989. - In Vitro Rearing of Parasitoids: Role of Host Factors in Nutrition. - *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 12 (4): in corso di stampa.
- NETTLES W.C. JR., WILSON C.M., ZISER S.W., 1980. - A diet and methods for the in vitro rearing of the tachinid, *Eucelatoria* spp. - *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 73: 180-184.
- PEFEROEN M., DE LOOF A., 1980. - The juvenile hormone titer in *Galleria mellonella*. - *Ann Soc. R. Zool. Belg.*, 109: 87-90.
- PLANTEVIN G., GRENIER S., RICHARD G., NARDON C., 1986. - Larval development arrest and hormonal levels in the couple *Galleria mellonella* (Lepidoptera, Pyralidae) - *Pseudoperichaeta nigrolineata* (Diptera, Tachinidae). - *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 3: 457-469.
- RAMADHANE A., GRENIER S., PLANTEVIN G., 1987. - Physiological interactions and development synchronisations between non diapausing *Ostrinia nubilalis* larvae and the tachinid parasitoid *Pseudoperichaeta nigrolineata*. - *Entomol. exp. appl.*, 45: 157-165.
- RIDDIFORD L.M., 1975. - Host hormones and insect parasites. - In: *Invertebrate immunity*, ed. K. Maramorosch, R.E. Schope, 339-353, New York, Academic.
- SCOSSIROLI R.E., PALENZONA D.L., 1971. - *Manuale di biometria*. - Zanichelli, Bologna, 259 pp.
- SEHNAL F., 1972. - Action of ecdysone on ligated larvae of *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera): Induction of development. - *Acta Ent. Bohemoslov.*, 69: 143-155.
- SEHNAL F., 1985. - Growth and life cycles. - in *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Kerkut G.A., Gilbert L.I., eds., Pergamon Press Oxford: vol. 2: 17-102.
- SEHNAL F., DELBECQUE J.P., MAROY P., MALA J., 1986. - Ecdysteroid titres during larval life and metamorphosis of *Galleria mellonella*. - *Insect Biochem.*, 16: 157-162.
- SEHNAL F., GRANGER N.A., 1975. - Control of corpora allata function in larvae of *Galleria mellonella*. - *Biol. Bull.*, 148: 106-116.

- SEHNAL F., MAROY P., MALA J., 1981. - Regulation and significance of ecdysteroid titre fluctuations in lepidopterous larvae and pupae. - *J. Insect Physiol.*, 27: 535-544.
- SLAMA K., 1974. - Methods of testing and evaluating the biological activity of juvenoids. - In: Sláma, Romanuk, Sorm, *Insect hormones and bioanalogues*, Wien, Springer-Verlag: 93-136.
- SNEDECOR G.W., COCHRAN W.G., 1980. - *Statistical Methods*. - Iowa State, Ames: 1-507.