

EGIDIO MELLINI e AMADOU KONOTIÈ COULIBALY
Istituto di Entomologia «Guido Grandi» dell'Università di Bologna

Un decennio di sperimentazione sul sistema ospite - parassita *Galleria mellonella* L. - *Pseudogonia rufifrons* Wied.: sintesi dei risultati.

(Ricerche eseguite col contributo del C.N.R.)

INDICE

I. Introduzione	Pag.	192
II. Generalità sul sistema	»	194
1. Caratteristiche biologiche dell'ospite <i>Galleria mellonella</i> L.	»	194
2. Caratteristiche generali del parassitoide <i>Pseudogonia rufifrons</i> Wied.	»	196
a. Specificità parassitaria	»	198
b. Strutture anatomiche peculiari	»	198
III. Rilievi su <i>Galleria mellonella</i> L. e tentativi di migliorarne le tecniche di allevamento	»	199
1. Diapausa delle larve mature	»	199
2. Relazioni tra l'età della madre e alcune caratteristiche della prole	»	199
3. Decremento ponderale nel tempo delle crisalidi	»	200
4. <i>G. mellonella</i> quale ospite di sostituzione per parassitoidi	»	200
IV. Apparato genitale femminile e ovideposizione di <i>Pseudogonia rufifrons</i> Wied.	»	201
1. Struttura delle uova microtipiche	»	201
2. Caratteristiche istologiche degli ovaroli e dell'utero	»	201
3. Ritmo di ovideposizione	»	202
4. Conservabilità delle «uova» deposte	»	202
V. Tecniche di parassitizzazione, schiusura delle uova microtipiche e gestione delle larve ospiti	»	203
1. Modalità di contaminazione	»	203
2. Raccolta delle uova microtipiche: zimbelli	»	204
3. Fattori inducenti la schiusa delle uova microtipiche	»	204
4. Prove di incubazione extra-uterina	»	205
5. Gestione delle larve ospiti	»	206
VI. Fattori incidenti sulle percentuali di parassitizzazione	»	206
1. «Dose» pro capite di uova	»	207
2. Livelli di dispersione delle uova sul substrato trofico	»	207

3. Parassitizzazione collettiva e individuale	»	208
4. Età delle uova microtipiche	»	208
5. Ulteriori tentativi per innalzare il tasso di parassitizzazione	»	209
6. Considerazioni conclusive	»	210
VII. Biologia delle larve parassite	»	210
1. Ritmo di accrescimento delle larve di I età	»	210
2. Localizzazione delle L _I e L _{II} , rispettivamente nelle larve e nelle eopupe della vittima	»	211
3. Canale alimentare delle larve di III età	»	212
VIII. Effetti dei fattori ambientali sul sistema	»	213
1. Livelli termici ottimali per l'allevamento dei due simbionti	»	213
2. Basse temperature per la conservazione del parassita	»	214
3. Densità di popolazione dell'ospite	»	214
4. Fotoperiodo	»	216
IX. Effetti del substrato trofico dell'ospite sul sistema	»	217
1. Quantità di pabulum	»	217
2. Periodi di digiuno forzato	»	217
3. Qualità del pabulum	»	218
X. Effetti dell'applicazione di sostanze ormonali ed anti-ormonali al sistema	»	219
1. Juvenoidi	»	219
2. Anti-ormone giovanile	»	222
3. Ecdisteroidi	»	223
XI. Effetti indotti dal parassitoide sull'ospite	»	223
1. Mortalità larvale (prematura)	»	224
2. Intensificazione delle tendenze cannibalistiche	»	224
3. Formazione di crisalidi farate	»	225
4. Pesi delle crisalidi	»	226
5. Mortalità complessiva dell'ospite causata dal parassitoide	»	227
XII. Effetti indotti dall'ospite sul parassitoide	»	228
1. Come stadio «contaminato»	»	228
2. Come sesso	»	230
3. Come mole	»	231
4. Conclusioni	»	232
XIII. Influenze reciproche tra i due simbionti antagonisti a livello endocrino	»	233
1. Del parassitoide sull'ospite	»	233
2. Dell'ospite sul parassitoide	»	233
XIV. Prove di allevamento del parassitoide su diete artificiali	»	235
Riassunto	»	238
Summary	»	242
Bibliografia citata	»	245

I. INTRODUZIONE

Per uno studio metodico dei fenomeni del parassitoidismo, è indispensabile disporre di almeno una coppia sperimentale ospite-parassita, allevata in conti-

nuità in condizioni di laboratorio ben definite. La scelta del sistema è una fase particolarmente critica nel caso che il parassitoide sia rappresentato da Ditteri Larvevoridi, notoriamente più difficili e complicati da allevare rispetto alla generalità degli Imenotteri Terebranti, anche in relazione al fatto che essi attaccano soltanto stadi attivi dell'ospite.

Il nostro gruppo di ricerca, per la verità, si è preoccupato, innanzitutto, di scegliere una vittima che presentasse le seguenti caratteristiche: a) che sia facile da allevare su diete artificiali, possibilmente povere di acqua e quindi difficilmente soggette ad alterazioni ad opera di muffe, batteri ed altri agenti; così da evitare l'introduzione di sostanze antibatteriche, fungistatiche, ecc., le quali, com'è noto, possono agire negativamente sui microrganismi simbiotici degli Insetti, con conseguenze letali, o quanto meno gravi, per questi ultimi; b) che sia largamente utilizzata nei laboratori per ricerche di fisiologia, in modo da potere disporre, già in partenza, di dati utili per lo studio dei rapporti fisiologici con il parassita; c) che sia dotata di una spiccata attitudine a fungere da vittima per i parassitoidi in generale; d) che svolga cicli continui, cioè senza la comparsa di diapause sia pure occasionali. La scelta è così caduta su *Galleria mellonella* L., lepidottero di media taglia, allevato in Istituti di biologia degli Artropodi in tutto il mondo, per il quale disponiamo di una ingente massa di dati e che spesso viene utilizzato come ospite di sostituzione per svariate specie di entomofagi (Campadelli, 1987).

Per l'adozione del parassita, si è invece proceduto in modo empirico. In campagna sono state raccolte sui fiori, in particolare di Ombrellifere, femmine di varie specie di Larvevoridi con le quali, in laboratorio, si è tentato sistematicamente di parassitizzare le larve di *Galleria*. Non poche si sono sviluppate, sia pure in varia misura, in questo ospite di sostituzione del tutto estraneo al loro ambiente di vita. Fra di esse è stata scelta *Pseudogonia rufifrons* Wied. che è apparsa una delle specie più adattabili al nuovo partner ed inoltre quella, date le modalità di contaminazione dell'ospite, meno impegnativa da allevare.

Infatti delle 4 tecniche di parassitizzazione, messe in atto dalle femmine dei Larvevoridi, due non sono in pratica attuabili manualmente, e cioè quelle consistenti nella deposizione di uova macrotipiche sull'ospite e nell'iniezione di uova membranacee nel suo corpo, mentre le altre due, basate sulla deposizione di planidi o di larvette tachiniformi, o sull'ospite o negli ambienti da esso frequentati, ovvero sulla deposizione di uova microtipiche sul suo substrato trofico, bene si prestano ad una contaminazione artificiale da parte dell'operatore; in particolare, poi, quest'ultima, bastando somministrare alle larve ospiti pabulum inquinato dalle uova del parassita nella misura voluta. Va peraltro notato che alla facilità di esecuzione non si accompagnano, per il vero, traguardi precisi nei livelli di contaminazione, che dipendono solo in parte dallo sperimentatore.

In seguito ci siamo resi conto che possono essere adottate anche specie caratterizzate da altre tecniche di contaminazione, non solo per la praticità della loro moltiplicazione, ma anche per l'opportunità che esse offrono di aggredire speciali problemi di parassitologia. Da alcuni anni abbiamo infatti iniziato l'allevamento

vamento continuato, sempre su *Galleria*, di altre 2 specie di Larvevoridi, e precisamente di *Archytas marmoratus* Towns., che depone planidi negli ambienti frequentati dall'ospite, e di *Eucelatoria bryani* Sabr. che introduce larvette neonate direttamente nel corpo della vittima perforandone il tegumento. Questi nuovi sistemi ospite-parassita ci consentono, fra l'altro, di affrontare sperimentalmente particolari tematiche del parassitismo dei Larvevoridi, impossibili da studiare con la solita coppia *Galleria - Pseudogonia*.

Nella presente memoria vengono riuniti e discussi i dati emersi nel corso di ricerche sperimentali, protrattesi per una dozzina di anni, sui complessi rapporti ospite-parassita nella suddetta coppia. I risultati ottenuti, apparsi in oltre una sessantina di pubblicazioni, rivestono un interesse che va ben oltre gli angusti limiti di questo sistema, coinvolgendo aspetti generali della biologia dei Larvevoridi ed in particolare quella della tribù dei Goniini, cui *Pseudogonia* appartiene, caratterizzata in gran parte dalla deposizione di uova microtipiche.

Questo lavoro va inoltre considerato come un approfondimento della trattazione generale, recentemente pubblicata da uno di noi (Mellini, 1990), sul parassitismo di questa vasta ed importante famiglia di insetti entomofagi, nonchè inteso come esempio di progressivo miglioramento delle tecniche per la loro produzione. Da ultimo non va sottaciuta la particolarità di avere adottato come oggetto sperimentale un Dittero Larvevoride, quando la stragrande maggioranza dei lavori dedicati al parassitoidismo interessa invece gli Imenotteri Terebranti. Pertanto la sintesi qui esposta può essere utile anche per un proficuo confronto, ad un livello approfondito, tra certe manifestazioni parassitarie nei due gruppi sistematici sopra menzionati.

II. GENERALITÀ SUL SISTEMA

1. Caratteristiche biologiche dell'ospite *Galleria mellonella* L.

G. mellonella è un lepidottero le cui larve vivono a spese dei favi dell'ape domestica, con relativo contenuto, sia negli alveari, in particolare se indeboliti, sia conservati nei magazzini, rovinandoli irrimediabilmente. Esso compie in natura varie generazioni annuali, favorito dalle temperature relativamente elevate (attorno ai 35°C) che si riscontrano nell'arnia dalla primavera all'autunno nei climi temperati.

Per la facilità con cui può essere moltiplicata durante tutto l'anno, direttamente sui prodotti dell'alveare, ovvero su diete artificiali di agevole preparazione e conservazione, *Galleria* da vario tempo è allevata in permanenza in molti Istituti sparsi in tutto il mondo, come animale di laboratorio da utilizzare soprattutto per ricerche di fisiologia, nonchè come ospite di sostituzione per vari parassitoidi, sia Imenotteri che Ditteri. Incidentalmente ricordiamo che anche privati cittadini la moltiplicano in massa a scopo commerciale, essendo le sue larve, note volgarmente come «camole del miele», largamente richieste quali pregiata e costosa esca per pescatori.

Nel nostro laboratorio, dopo una serie di modifiche e perfezionamenti tecnici, viene da qualche anno a questa parte allevata in cella climatica regolata sui 30°C, con U.R. aggirantesi sul 60-65% e in condizioni di completa oscurità. Consistenti gruppi di crisalidi imbozzolate vengono isolate entro contenitori di plastica atossica di volume pari a circa 3 litri e mezzo (cm 24x17x9). Il coperchio presenta un ampio foro circolare del diametro di 6,5 cm sul quale viene fissato un disco di carta bibula. Le femmine, inseminate già nello stesso giorno dello sfarfallamento, vi depongono le uova localizzandole in una fitta fascia periferica al foro.

Le femmine hanno una elevata fecondità, aggirantesi mediamente sulle 1500 uova pro capite, e queste sono caratterizzate da un'alta percentuale di schiusa prossima al 90%. Le uova, sul relativo supporto cartaceo, vengono trasferite in contenitori simili, col coperchio parimenti fornito di ampia apertura ma, in questo caso, schermata da una fine reticella di ottone per consentire l'aerazione e nel contempo impedire la fuoriuscita delle larve. A queste viene fornita, in 2-3 razioni successive, una dieta artificiale messa a punto da Campadelli (1973 e 1986) attraverso successive modificazioni di quella approntata da Beck (1960), inizialmente prescelta tra le varie formulate da diversi Autori.

Essa è composta da: farina integrale di frumento, 100g; farina integrale di mais, 100g; farina bianca di frumento, 200g; latte in polvere, 100g; lievito di birra secco in polvere, 50g; glicerina pura, 100g; miele, 200g; cera d'api, 150g.

I vari prodotti, previamente sterilizzati, vengono mescolati ad alta temperatura in una impastatrice. Il pastone, così ottenuto, viene suddiviso in tante porzioni che, una volta raffreddate e indurite, vengono sbriciolate in una apposita macchina grattugiatrice. Nella soffice massa costituita da questi frammenti non soltanto resta facilitata l'attività trofica delle larve ma queste nel contempo vi trovano anche un comodo e ben areato ambiente di vita. Un importante miglioramento della dieta è consistito nell'abolizione dell'acqua distillata, la cui presenza favoriva lo sviluppo di muffe, rendendo di conseguenza necessaria l'aggiunta di un fungistatico quale la nipagina. Agli inizi si era ricorsi all'uso di pabulum naturale; questo però, oltre che più costoso, presentava l'inconveniente di essere spesso infestato dal confamiliare *Achroia grisella* F.; ma il fatto più grave era che, assieme ai favi, si rischiava di introdurre negli allevamenti il calcidoideo *Dibrachys boucheanus* Ratz., minuto e irrefrenabile parassita gregario delle larve imbozzolate di *Galleria*, difficile da estirpare e che, in competizione con *Pseudogonia*, riesce sempre a prevalere sviluppandosi in uno stadio dell'ospite precedente a quello distrutto dal larvevoride.

Raggiunta la maturità, le varie centinaia di larve, presenti nello stesso contenitore, si racchiudono in un bianco bozzolo di consistenza pergamenacea fissato sulle pareti alte del recipiente, ma in speciale modo, sul coperchio ove risultano fittamente addossate le une alle altre. Di norma nel giro di 2 giorni dopo la filatura si impupano. Va notato che le crisalidi femminili pesano, mediamente, circa un 30% in più di quelle maschili e che il riconoscimento del sesso è abbastanza facile in base all'esame degli urosterni genitali, come, del resto, nella generalità delle pupe dei Lepidotteri.

Accanto ai pregi già indicati, sia pure sommariamente, della nostra *Galleria*, vi sono, ai fini sperimentali, alcuni difetti non di poco conto, che si è tentato con vario successo di eliminare: in particolare una forte asincronia nello sviluppo delle larve, sia pure appartenenti ad una medesima discendenza, una notevole variabilità nel numero degli stadi larvali che passano da un minimo di 6 ad un massimo di 9, con una frequenza di gran lunga maggiore sui 7 stadi, nonché una tendenza più o meno accentuata delle larve mature ad entrare in diapausa. Tutto ciò porta a mascherare correlazioni altrimenti evidenti in ospiti caratterizzati da uno sviluppo e da un comportamento più omogenei.

Un altro inconveniente, peraltro comune a molti, se non a tutti gli allevamenti massali di insetti, è rappresentato dallo scoppio, di tanto in tanto, di epidemie più o meno gravi. Esse sono determinate da Batteri e da Virus, spesso associati tra di loro, ma fortunatamente localizzati ad una parte soltanto dei numerosi contenitori larvali. Per porre rimedio a ciò, è stato fatto anche il tentativo, peraltro non condotto a termine, di selezionare popolazioni resistenti ai suddetti agenti patogeni. Di solito si ricorre invece all'applicazione delle normali pratiche di igiene generale, e in particolare alla diuturna disinfezione di tutto il materiale impiegato nell'allevamento, mediante immersione per almeno 24 ore in soluzioni di ipoclorito di sodio, nonchè, nei casi estremi, alla eliminazione dei contenitori con forti infezioni in atto. Le larve colpite assumono, dopo la morte, una colorazione nerastra, mentre i loro tegumenti diventano deliquescenti.

2. Caratteristiche generali del parassitoide *Pseudogonia rufifrons* Wied.

Questo larvevoride era, fino all'anno in cui l'abbiamo adottato per costituire il nostro sistema sperimentale, pressochè ignorato dalla scienza, a parte la segnalazione di alcune specie di vittime, tutte appartenenti ai Lepidotteri Nottuidi, presenti nel vecchio mondo in cui è diffuso.

Il suo allevamento ha preso origine da un'unica femmina raccolta all'inizio di autunno a Borgo Capanne, nell'alto Appennino bolognese. Come primo atto si è dovuto studiarne la biologia; a ciò hanno provveduto Baronio e Campadelli (1978) con osservazioni condotte in laboratorio.

Il dittero appartiene alla tribù dei Goniini le cui femmine, in larga maggioranza, depongono uova microtipiche sul substrato trofico dell'ospite, rappresentato di regola dalle foglie delle piante infestate. Una volta ingerite, tali uova lasciano schiudere delle minutissime larvette che in breve perforano le pareti del tubo digerente e, passate nel lacunoma, penetrano in vari organi quali gangli dell'apparato nervoso centrale, ghiandole salivari, ecc. secondo la specie. Orbene, nelle grandi linee, il comportamento di *P. rufifrons* non si discosta da quello del gruppo di appartenenza.

In cella climatizzata a 23-24°C (in seguito la temperatura verrà innalzata a 27°C al fine di accelerare il ciclo), U.R. 65-70% e fotoperiodo di 16:8, le femmine cominciano ad accoppiarsi una dozzina di ore dopo lo sfarfallamento e i

maschi un giorno dopo. La sex ratio è prossima ad 1. Il dimorfismo sessuale è pressochè irrilevante, per cui un sicuro accertamento del sesso può essere effettuato solo tramite l'esame dei genitali esterni. La durata media della vita si aggira sui 15 giorni per i maschi e 22 giorni per le femmine.

In tali condizioni, le femmine iniziano l'ovideposizione 5-6 giorni dopo essere sfarfallate ed hanno una fecondità aggirantesi mediamente sulle 7000 uova pro capite. Queste vengono deposte un pò ovunque nella gabbia di allevamento, ma di preferenza sugli oggetti sollevati dal pavimento o comunque sporgenti verso l'interno della medesima. All'atto della deposizione lo sviluppo embrionale è generalmente ultimato, ma le larvette hanno la particolarità di non sgusciare fino a quando non siano adeguatamente stimulate.

Le uova, seguendo tecniche che saranno illustrate in seguito, vengono somministrate a larve di *Galleria* delle ultime due età. Una volta ingerite, esse schiudono in breve tempo (da mezzora fino a 1-2 ore) e generalmente a livello della metà anteriore del mesentero. Le minutissime larvette ne perforano in breve le pareti, si portano nel lacunoma e quindi penetrano nei muscoli scheletrici dell'addome, di preferenza nelle aree ventrali degli uriti IV-VI. Il segmento muscolare invaso viene completamente svuotato, così che il sarcolemma finisce col formare una sorta di sacca, all'interno della quale filtra plasma emolinfatico di cui la larvetta di prima età continua a nutrirsi. Prossima alla muta, questa arresta il suo accrescimento fino a quando l'ospite, raggiunta la maturità larvale, entra nella fase di eopupa. La piccola larva endofaga passa allora in II età, abbandona il muscolo e si trasferisce nello spazio virtuale compreso tra la cuticola larvale, prossima ad essere rigettata, e quella pupale in formazione, quindi praticamente all'esterno della vittima. Da tale posizione essa penetra nella crisalide neoformata, di solito sotto le pteroteche o le cheratoteche, ancora depigmentate, ove induce un imbuto respiratorio tegumentale secondario.

Da questo momento, garantito il rifornimento di ossigeno atmosferico, il ritmo di accrescimento diviene rapido. Così, 5-6 giorni dopo la formazione della crisalide, il parassita raggiunge la maturità larvale e s'impupa entro l'esoscheletro della vittima, quasi completamente svuotata, isorientandosi col medesimo. In tal modo viene agevolato l'esodo dell'adulto neosfarfallato dal bozzolo, attraverso la fessura presente al polo cefalico, una decina di giorni dopo.

Pseudogonia è, dunque, un parassita larva-pupale obbligato, contraddistinto da una caratteristica eccezionale, quella di dovere penetrare nell'ospite due volte durante l'accrescimento: la prima, come uovo, nelle larve, la seconda, come L_{II} iniziale, nelle crisalidi. Un intero ciclo, nelle condizioni ambientali indicate, si svolge mediamente nel giro di 32 giorni, per contaminazione dell'ospite in ultima età larvale, e in 35 giorni se la parassitizzazione cade su larve della penultima età. Esso è un parassitoide solitario; nei casi di superparassitizzazione, del resto frequentissimi date le modalità di aggressione, l'eliminazione degli individui in soprannumero avviene in gran parte al momento della ecdisi pupale dell'ospite. Molte L_{II} , almeno in apparenza perfettamente vitali, vengono infatti rigettate assieme all'ultima esuvia larvale, nella quale rimangono accartocciate.

Le restanti, ancora in eccedenza, finiscono poi con l'intristire lentamente nella crisalide, pur essendosi garantito l'accesso all'aria esterna e senza mostrare evidenti segni d'attacco, quali ferite, ad opera della superstita. Eccezionalmente, nella stessa vittima, in particolare se di grossa taglia, possono formarsi 2 pupari che però appaiono visibilmente sottodimensionati.

Per quanto riguarda più propriamente le tecniche di allevamento, gli adulti, man mano sfarfallano entro i contenitori in cui sono confinate le crisalidi di *Galleria* previamente sottoposte, come larve, alla parassitizzazione, vengono trasferiti entro grandi gabbie (cm 40x30x30) costruite in plexiglas e provviste, su una parete verticale, di una piccola porta rettangolare e, sulle due adiacenti, di un'apertura circolare schermata con reticella di ottone a maglie sottili, per garantire il ricambio d'aria. Gli adulti vengono riforniti di acqua distillata, mediante una grossa provetta con apertura rivolta verso il basso e appoggiata su capsula Petri col fondo ricoperto da un disco di carta bibula, nonchè di una soluzione di acqua e miele al 20%, imbevuta in un batuffolo di cotone idrofilo, cambiato giornalmente, per evitare fenomeni di fermentazione alcolica fortemente pregiudizievole per i Larvevoridi in genere.

Per quanto concerne la fase di contaminazione, le uova microtipiche vengono somministrate alle larve di *Galleria*, generalmente negli ultimi stadi, su un substrato rappresentato da materiale edule più o meno appetito, e precisamente su palline di normale dieta, in un primo tempo, e su foglioline di cera in seguito.

a. Specificità parassitaria

Considerato che *Pseudogonia* è citata esclusivamente come parassita di Nottuidi, ci siamo chiesti se essa possa evolversi anche a spese di altre famiglie. Così Campadelli (1981) ha condotto varie prove somministrando uova microtipiche, su foglie o su dieta artificiale, a gruppi di larve di varia età di una decina di specie di Lepidotteri appartenenti alle famiglie dei Papilionidi, Saturnidi, Sfingidi, Endromididi, Nottuidi e Piralidi, nonchè ad un Coleottero Crisomelide. In tutti questi fitofagi, le uova sono schiuse normalmente a livello del tubo digerente e le larvette neonate si sono trasferite nel lacunoma; qui però, nella maggioranza delle specie candidate ospiti, si sono manifestati fenomeni di reazione emocitaria e melanica che in breve le hanno portate a morte. Solo nelle 3 specie di Nottuidi (*Mamestra brassicae* L., *Mythimna unipuncta* Hw. e *Sesamia nonagroides* Lef.) e nel Piralide (*Ostrinia nubilalis* Hb.) il parassita si è sviluppato regolarmente fino allo sfarfallamento degli adulti; nell'ultimo ospite citato, le immagini apparivano decisamente minute in rapporto alla sua modesta taglia.

b. Strutture anatomiche peculiari

Degli adulti si sono studiati l'apparato genitale femminile, di cui sarà riferito più avanti, ed il proctodeo per la sua eccezionalità. Nell'ampolla rettale, infatti, sono differenziate, in entrambi i sessi, da 9 a 16 grandi papille (in media 13) a forma di cono allungato. Poiché nella generalità dei Ditteri se ne contano soltan-

to 4, si poteva supporre che l'elevato numero riscontrato in *Pseudogonia* fosse in qualche modo in relazione con l'allevamento in cattività, protrattosi per vari anni, ovvero una caratteristica comune nell'ambito dei Larvevoridi. Si è pertanto provveduto a raccogliere in campagna oltre 1200 adulti di questa famiglia, appartenenti a 76 specie distribuite in 4 sottofamiglie e 13 tribù. Mediante dissezione si è potuto accertare che quasi tutti gli individui presentavano le 4 papille regolamentari. Nell'ambito della tribù dei Goniini, limitatamente alle forme deponenti uova microtipiche, delle 7 specie catturate, 6 rientrano nella regola generale, mentre *P. rufifrons* si riconferma, anche allo stato selvatico, dotata di 14 papille. Un'altra specie di Goniino, non a uova microtipiche, è risultata fornita di 4-9 papille, e pertanto essa, assieme a *Pseudogonia*, rappresentano le uniche eccezioni finora registrate. Considerato tutto ciò, non è possibile indicare una qualche correlazione di ordine fisiologico od etologico con la particolare struttura dell'ampolla rettale nel nostro parassita (Campadelli e Gardenghi, 1984).

III. RILIEVI SU *Galleria mellonella* L. e TENTATIVI DI MIGLIORARNE LE TECNICHE DI ALLEVAMENTO

1. Diapausa delle larve mature

Poiché questa caratteristica è assai grave per un insetto da laboratorio allevato in continuazione, e che per di più coinvolge anche il ciclo di *Pseudogonia*, che è un parassita larva-pupale, si è, come primo atto, tentato di eliminare tale tendenza nelle popolazioni da noi allevate. Considerato che l'attitudine ad entrare in diapausa è sovente controllata geneticamente, si è operato per selezionare una linea a sviluppo continuo. Tale scopo è stato raggiunto nel corso di una decina di generazioni, cernendo e moltiplicando gli individui sfarfallati per primi (Guazzugli e Campadelli, 1974). Con tale procedimento, non si è invece ottenuta, parallelamente, una decisa sincronizzazione dello sviluppo larvale nell'ambito delle medesime popolazioni sebbene non soggette a diapausa.

2. Relazioni tra l'età della madre e alcune caratteristiche della prole

Al fine di rendere più omogenee le popolazioni larvali entro ciascun contenitore, si è indagato in quale misura l'età della femmina prolificante influisca su alcuni aspetti biologici della discendenza. Si è così potuto constatare che, con l'invecchiamento della madre, certe caratteristiche vitali della prole declinano notevolmente, come del resto si è riscontrato in molte altre specie. Le percentuali di sgusciamiento delle uova diminuiscono progressivamente, mentre si allunga la durata dello sviluppo embrionale e postembrionale e aumenta la mortalità larvale. Così la resa in crisalidi, riferita al numero di uova iniziali, diminuisce fortemente con l'avanzare dell'età della madre: per femmine di soli 5 giorni

essa è scesa a poco più della metà. Contemporaneamente il peso delle pupe tende ad abbassarsi. In conclusione, dunque, la qualità della prole decade sotto molti riguardi con la senescenza delle madri (Campadelli, 1983). Tuttavia, considerato che queste depongono circa la metà delle loro uova nel giorno successivo allo sfarfallamento e complessivamente i 2/3 nei primi 2 giorni (sui dieci che dura mediamente la loro vita), si può ovviare agli inconvenienti derivati dalla loro vecchiaia limitandosi ad utilizzare solo le uova deposte nelle prime 48 ore.

3. Decremento ponderale nel tempo delle crisalidi

Considerato che sovente, per valutare i risultati della sperimentazione, è indispensabile conoscere il peso delle crisalidi, si è determinato metodicamente il loro peso giornaliero col trascorrere del tempo. Pertanto, conoscendo la data della loro formazione, è possibile, apportando un fattore di correzione, risalire con buona approssimazione al peso iniziale. Le crisalidi indenni, nel giro di una decina di giorni, pari alla durata media della loro vita, subiscono un decremento ponderale medio, abbastanza progressivo, di circa il 20%, se maschili, e di circa il 15% se femminili. Le crisalidi parassitizzate subiscono un calo di pari entità però concentrato nei primi 6 giorni, al termine dei quali l'endofago ha generalmente concluso il suo sviluppo larvale. Il loro decremento giornaliero è perciò quasi doppio rispetto a quello degli individui indenni (Campadelli, 1980).

Contemporaneamente, e per gli stessi motivi, si è rilevata anche la perdita in peso subita dai pupari nella decina di giorni trascorsi dal parassita nello stadio pupale. Ad un calo forte nel I giorno, e ad uno medio nel secondo, ne segue uno comparativamente modesto nei restanti 8 giorni. Comunque la perdita ponderale è pari, complessivamente, al 16% in ospiti maschili e all'11% in quelli femminili (Campadelli, 1980).

4. *G. mellonella* quale ospite di sostituzione per parassitoidi

Un grande vantaggio offerto da *Galleria* è rappresentato dalla sua eccezionale disponibilità a fungere da vittima idonea per molti entomofagi. Mentre in natura, nel vastissimo areale in cui è diffusa, è insidiata, complessivamente, da 14 specie di Terebranti, in laboratorio sono state finora allevate a sue spese ben 71 specie nuove di parassitoidi, e precisamente 47 di Imenotteri Terebranti e 24 di Ditteri Larvevoridi, famiglia questa assolutamente estranea a tale vittima, e tuttavia capace, in cattività, di aggredirla applicando tutte e 4 le modalità di contaminazione di cui dispone (Campadelli, 1975 e 1987). La grande idoneità di *Galleria*, verso questi Ditteri, è dimostrata anche dalle prove condotte da Campadelli e Baronio (1978): su 15 specie di Larvevoridi raccolte a caso in natura, appartenenti a tribù diverse e dotate di modalità di parassitizzazione differenti, circa la metà ha attecchito, sia pure in varia misura, sul nostro ospite di sostitu-

zione. Questa eccezionale disponibilità di *Galleria* dipende non solo dal fatto che in laboratorio è possibile realizzare l'incontro tra due simbionti viventi in nicchie ecologiche diverse, ma anche dalla particolare dieta su cui è allevata, non legata a piante viventi le quali, com'è noto, elaborando sovente sostanze atte a contrastare i fitofagi, finiscono col colpire in maniera elettiva proprio i suoi possibili parassiti.

IV. APPARATO GENITALE FEMMINILE E OVIDEPOSIZIONE DI *Pseudogonia rufifrons* Wied.

1. Struttura delle uova microtipiche

Sono di forma semiovoidale e misurano 0,20 mm in lunghezza e 0,12 mm nel diametro trasverso. Presentano corion rigido e nero lucente nella superficie dorsale, che è fortemente convessa, e invece corion molle e trasparente nell'area ventrale pianeggiante, destinata ad aderire alle foglie; la membrana vitellina, sebbene esile, è molto resistente avendo consistenza pergamenacea.

Esse appaiono, quindi, del tutto simili a quelle delle altre femmine della tribù Goniini aventi costumi similari. La callotta dorsale del corion ha funzione protettiva, mentre l'area ventrale costituisce un efficacissimo dispositivo di fissazione al supporto, grazie al suo eccezionale potere collante che garantisce l'immovibilità delle uova anche sotto l'azione di forti piogge dilavanti (Campadelli e Mellini 1980).

2. Caratteristiche istologiche degli ovarioli e dell'utero

Nell'ovariolo di tipo meroistico politrofico, comprendente una dozzina di camere ovariche, le cellule trofiche anziché disposte sul suo asse longitudinale, come nella norma, appaiono spostate lateralmente ove finiscono con l'appiattire la regione ventrale dell'uovo. Inoltre l'epitelio follicolare coriogeno può ricoprire questa parte solo dopo il riassorbimento dei trofociti, con conseguente ritardo nella formazione del corion ventrale che tanto differisce, come si è riferito, da quello dorsale (Gardenghi e Mellini, 1980).

Le uova cominciano a scendere nell'ovidutto comune già nel II giorno successivo allo sfarfallamento della femmina. Appena discese, il corion dorsale appare di colore bianco lattescente; poi, man mano esse procedono verso il gonotremia, il guscio imbrunisce fino a divenire nero, quando ancora lo sviluppo embrionale è appena agli inizi.

Di norma le uova vengono deposte solo quando l'embriogenesi è ultimata. La loro incubazione si compie entro l'ovidutto comune, che si trasforma in utero, allungandosi enormemente fino a decuplicare la propria lunghezza (dai circa 3 mm iniziali ad oltre 35 mm) e raddoppiando il proprio diametro da 1/2 mm a 1 mm; tale organo, infatti, si avvolge a spirale fino ad occupare gran parte della cavità addominale della femmina.

Le pareti dell'utero mostrano, attorno all'epitelio, uno strato ben più spesso di voluminose cellule ghiandolari che secernono in grande quantità un denso secreto, dapprima ialino poi lattiginoso, PAS negativo, di natura proteica e rientrante, con ogni probabilità, nel gruppo degli albuminoidi, sostanze sovente utilizzate come lubrificanti naturali. Il secreto viene riversato all'interno dell'organo ove ricopre le uova fittamente stipate, favorendone lo scorrimento e nello stesso tempo neutralizzandone l'apparato di fissazione (Gardenghi e Mellini 1980). Se infatti l'utero viene aperto in acqua, il suddetto liquido si disperde rapidamente, il corion ventrale si imbibisce dilatandosi fino a formare un'enorme vescica collosa, così che le migliaia di uova presenti in breve finiscono con l'agglutinarsi in un unico ammasso appiccicoso non più suscettibile di essere dissolto. Le ghiandole accessorie, di forma tubolare, appaiono invece decisamente minute, contengono un modesto quantitativo di secreto molto denso e fortemente PAS positivo, di cui non conosciamo la funzione, e che si disperde nell'abbondantissimo fluido uterino.

3. Ritmo di ovideposizione

Alla temperatura di 27°C e con fotoperiodo 16:8, la deposizione delle uova inizia al 5° - 6° giorno dopo lo sfarfallamento e prosegue senza interruzione fino alla morte della femmina, esclusivamente, però, durante la fotofase.

Come sarà illustrato più avanti, vengono fornite allo scopo foglioline di cera che, limitatamente a questa indagine, sono cambiate ogni 2 ore e mezzo durante il periodo di luce. I 2/3 delle uova risultano collocati sulla pagina inferiore. Le curve totali di deposizione, di femmine isolate, indicano un'intensità massima di emissione nel II-III-IV giorno dopo l'inizio, con una graduale forte diminuzione nei giorni successivi. Le curve giornaliere, che, come si è accennato, investono solo la fotofase, mostrano un uguale andamento per tutto il periodo di ovideposizione, nonostante il progressivo forte calo numerico col trascorrere dei giorni. Tali curve hanno un andamento parabolico e indicano un picco di attività a metà circa della fotofase, fra la 6^a e 8^a ora, quando viene deposto il 50% delle uova di tutta la giornata (Fanti, 1984).

4. Conservabilità delle «uova» deposte

Come si è già riferito, nelle uova microtipiche, al momento della emissione, l'embriogenesi è generalmente conclusa. Tale fenomeno rappresenta un adattamento a questo speciale modo di contaminazione, permettendo la schiusa dell'uovo anche se ingerito subito dopo la sua deposizione. D'altro canto, in natura, la larveta che deve sgusciare si mantiene vitale, efficacemente protetta com'è entro gli involucri dell'uovo fissato alle foglie verdi, per vari giorni aumentando perciò le possibilità di parassitizzazioni procrastinate.

In relazione al periodo di utilizzo di tali «uova», e per costituire una scorta

cui ricorrere in caso di necessità, si è empiricamente determinata la durata della loro vitalità su foglioline di cera destinate alle larve di *Galleria* per la parassitizzazione. In base alle prove di schiusa in liquidi enzimatici e al tasso di parassitizzazione ottenuto con uova di varie età, si è potuto stabilire che in frigorifero, a +4°C, le larvette nel guscio si conservano vitali, sia pure in percentuali progressivamente minori col trascorrere del tempo, fino ad un massimo di circa due mesi. A temperatura ambiente, sui 20°-24°C, la conservabilità risulta più che dimezzata, riducendosi la sua durata massima a meno di un mese e per quote vieppiù esigue dopo una decina di giorni (Campadelli, 1982). In ogni caso va notata l'eccezionale possibilità, offerta solo con questa modalità di attacco e limitatamente ai substrati di ovideposizione qui impiegati, di contaminare gli ospiti con uova molto vecchie provenienti da femmine morte alcune settimane prima.

V. TECNICHE DI PARASSITIZZAZIONE, SCHIUSURA DELLE UOVA MICROTIPICHE E GESTIONE DELLE LARVE OSPITI

1. Modalità di contaminazione

Durante le prime generazioni di *Pseudogonia*, la parassitizzazione di *Galleria* veniva effettuata in modo del tutto empirico. A larve della penultima, o agli inizi dell'ultima età, venivano propinate uova, prelevate dall'utero di femmine morte da non più di 24 ore, inserendole a piccoli gruppi in nicchie scavate in masse di dieta di circa 1 cm³. Consumato il pabulum contaminato, ne veniva somministrato di fresco in quantità sufficiente a garantire il raggiungimento della maturità larvale.

Tale metodo, per il vero piuttosto grossolano, dava risultati poco soddisfacenti ed incostanti, non solo per l'alto tasso di larve superparassitizzate a livello eccessivo, accanto a individui del tutto indenni, causa la cattiva distribuzione delle uova nel substrato trofico, ma anche perchè spesso venivano forniti elevati quantitativi di uova a sviluppo embrionale incompleto, e quindi inefficaci, sebbene prelevate nel segmento di utero prossimo al gonotrema. Di ciò, peraltro, era possibile accertarsi mediante un rapido esame atto a verificare la presenza, all'interno del guscio, della larvetta già formata. Allo scopo basta infatti porre, tra due vetrini, un campione di uova con una goccia d'acqua; premendo leggermente il coprioggetto, il contenuto dell'uovo viene estromesso dal corion, a livello dell'area ventrale, rendendone facilmente identificabile la natura: la larvetta, infatti, si riconosce con immediatezza grazie allo scheletro cefalo-faringeo nero e alle fasce grigiastre segmentali delle minute spinule. Per il vero va precisato che questo semplice esame visivo non ci consente di stabilire in modo incontrovertibile se tali larve, in apparenza completamente formate, siano in realtà pronte a sgusciare nei tempi brevi. La certezza assoluta può essere raggiunta soltanto attraverso una prova diretta di schiudibilità delle uova, sottoponendone un campione all'azione di idonei liquidi enzimatici ovvero alla centrifugazione, come sarà illustrato più avanti.

Se la tecnica di parassitizzazione sopradescritta poteva ritenersi sufficiente per un semplice allevamento del larveoride, appariva invece del tutto inadeguata per lavori di carattere sperimentale. Anzichè uova uterine di incerta embriogenesi, e tanto grossolanamente distribuite, occorreva riservare alle larve di *Galleria* uova deposte in modo naturale su substrati per loro eduli ed in quantitativi adeguati.

2. Raccolta delle uova microtipiche: zimbelli

Allo scopo sopraindicato, Mellini et alii (1980) hanno identificato, valendosi di sagome di cartoncino, disposte orizzontalmente all'apice di fili di ferro verticali di varia lunghezza, le caratteristiche fisiche del substrato preferito dalle femmine per l'ovideposizione. Si è così potuto rilevare che lo zimbello più attrattivo è quello di colore giallo, a forma di foglia rastremata ad un lato, con superficie perfettamente levigata, di spessore minimo, di area inferiore a 10 cm², sito in posizione elevata e fortemente illuminato. Sulla base di queste indicazioni, è stato allestito un modello di foglia utilizzando cera d'api purificata, cioè un ingrediente della dieta artificiale di *Galleria*, e, come tale, abbastanza appetibile da parte delle larve che, sia pure lentamente, finiscono col divorarlo.

Tali zimbelli vengono infissi isolatamente all'estremità di fili di ferro, sorretti verticalmente da un supporto in legno. Le femmine vi depongono le uova tutt'attorno, in una fascia subperiferica, aggrappandosi con i tarsi delle zampe di un lato ai margini di siffatte foglioline. Dopo un certo tempo viene così a formarsi una stretta pista nerastra, costituita da varie centinaia di uova, e decorrente verso i bordi.

Pur decisamente attrattivi, questi zimbelli, sui quali finisce con lo scaricarsi la gran parte delle uova, non appaiono invece competitivi con le foglie verdi naturali. Allo scopo di aumentarne l'attrattività e, di conseguenza, ridurre la dispersione delle uova su substrati inadeguati, si è tentato di ricorrere all'impiego di eventuali caïromoni. A tale scopo gli zimbelli, prima dell'uso, sono stati conservati per alcuni giorni, protetti da reticelle metalliche, entro normali contenitori di allevamento gremiti di larve dell'ospite, con relativi escrementi e pabulum. Tale metodo non ha però fornito risultati apprezzabili, non discostandosi il numero delle uova ivi deposte da quello sugli zimbelli non trattati.

Le foglioline di cera, così inquinate, vengono elargite alle larve di *Galleria* applicando le tecniche indicate in un paragrafo successivo.

3. Fattori inducenti la schiusa delle uova microtipiche

Queste uova hanno caratteristiche del tutto peculiari, non solo per le dimensioni e la struttura del corion, ma anche sotto il profilo fisiologico, dato che sono le uniche che, pur essendo deposte a sviluppo embrionale ultimato, non schiudono sino a quando non siano opportunamente stimolate e cioè solo dopo la loro ingestione da parte delle larve ospiti.

Mellini e Campadelli (1978) hanno studiato sperimentalmente i fattori che inducono la schiusa. Quelli meccanici, cioè le compressioni esercitate dai pezzi dell'apparato boccale, ovvero da interventi artificiali similari, non sono risultati indispensabili per determinare la schiusa, anche se la anticipano in concomitanza con stimolazioni di natura chimica veramente valide. Essi, inoltre, favoriscono soltanto la fuoriuscita dal corion, ma non dalla tenacissima membrana vitellina che continua a rivestire strettamente, deformandola, la minuta larveta. Fattori altamente efficaci sono invece apparsi quelli chimici, ed in particolare i liquidi enzimatici, segnatamente a base di pepsina e di tripsina. Essi, infatti, oltre a favorire un generale sgusciamiento, esercitano, a differenza dei liquidi privi di enzimi, un'azione molto rapida. L'importanza fondamentale di questi biocatalizzatori è dimostrata dal fatto che se tali liquidi vengono portati ad ebollizione perdono ogni efficacia nel determinare la schiusa. Si è inoltre notato che il tasso di sgusciamiento aumenta fortemente passando dalle uova deposte a quelle uterine, in particolare se estratte da femmine morte e con visceri in via di disgregazione, nel qual caso la fuoriuscita delle larvette avviene anche in semplice acqua distillata.

In relazione alle prove che stiamo conducendo per allevare questo Larvevori-*de* su diete artificiali, abbiamo tentato di individuare un metodo che consenta uno sgusciamiento generale, possibilmente in tempi brevissimi. Nell'ipotesi che la mancata schiusura delle uova, pur con larvette pronte a sgusciare all'atto della deposizione, potesse dipendere dalla pellicola di sostanze albuminoidi che le riveste, ponendole probabilmente in condizioni asfittiche, si sono immersi campioni di tali uova in soluzioni acquose con prodotti chimici atti a «solubilizzare» tali sostanze. I risultati ottenuti sono però apparsi decisamente modesti.

Del tutto soddisfacente si è dimostrata invece l'applicazione di un particolare fattore fisico, non operante in natura nel caso specifico, e cioè la forza centrifuga. Con soli 1000 giri al minuto per la durata di dieci secondi, si è ottenuta la schiusa, sovente quasi totale ed immediata, di uova uterine immerse semplicemente in acqua di fonte o in soluzione fisiologica (NaCl 0.85%) (Mellini e Campadelli, 1988). Le microlarve sgusciate con questo procedimento sono risultate, nel corso di esperimenti con le diete artificiali, perfettamente vitali (Bratti e Monti, 1988).

4. Prove di incubazione extrauterina

Poichè nelle gabbie di allevamento molte femmine soccombono più o meno precocemente, con l'utero ancora infarcito da migliaia di uova in vari stadi dell'embriogenesi, si è voluto verificare se fosse possibile recuperare queste ultime ed utilizzarle, previo il completamento dello sviluppo embrionale fuori dalle vie materne.

L'immersione in soluzione fisiologica, per circa una settimana, di uova prelevate da femmine morte da non più di 1-2 giorni, consente in molti casi, anche per le uova a corion dorsale ancora lattesciente e quindi non incubate, la formazione delle larvette che, se opportunamente stimolate, sono in grado di schiudere (Mellini e Campadelli, 1988).

5. Gestione delle larve ospiti

Nella normale conduzione dell'allevamento due «fattori» sono in varia misura operanti, e precisamente l'accumulo delle deiezioni e la manipolazione delle larve. Si è pertanto impostata una apposita ricerca per misurare i livelli della loro incidenza sulla «qualità» della vittima (Mellini e Bratti, 1983).

Le feci, sebbene solide, anidre e imbrigliate da fili di seta, che in certo modo le isolano dal substrato trofico, esercitano effetti tendenzialmente negativi, anche se evidenti solo a forti concentrazioni. In particolare esse portano ad una flessione nel peso delle crisalidi e ad un allungamento nei tempi di sviluppo delle larve. Ancora più negativa, per i parametri biologici dell'ospite, è la sua manipolazione. Sono infatti sufficienti semplici trasferimenti giornalieri delle larve in ultima età, da un contenitore all'altro, per determinare un forte calo nelle medie ponderali delle crisalidi, sia maschili che femminili, sia indenni che parassitizzate, nonché una caduta nelle percentuali di impupamento assieme ad un prolungamento nella durata della vita larvale.

Da notare, poi, che tutti questi effetti si trasferiscono indirettamente dall'ospite sul parassita, portando ad un sensibile calo nella produzione e nel peso dei pupari. Agli inconvenienti sopradescritti si può porre rimedio abbondando nella quantità di pabulum somministrato alle larve, allo scopo di «diluire» la massa fecale che si va accumulando, ed inoltre evitare, per quanto possibile, la manipolazione delle larve.

Gli effetti di questa ultima operazione appaiono poi particolarmente evidenti se si interviene nel corso dell'ultima età larvale. Per parassitizzazioni condotte su larve sempre più prossime alla filatura del bozzolo, i tempi medi di incrisalidamento si allungano di 3-4 giorni; un fenomeno simile si verifica anche nei testimoni non sottoposti a contaminazione, ma per il resto trattati nello stesso modo. Corrispondentemente i pesi delle crisalidi subiscono invece una progressiva flessione, in entrambi i sessi per i testimoni e solo per la serie femminile nel parassitizzato, salvo che nella tesi a larve sbozzolate, dato che queste avevano ovviamente già terminato l'accrescimento all'atto del loro prelievo (Mellini et alii, 1985).

VI. FATTORI INCIDENTI SULLE PERCENTUALI DI PARASSITIZZAZIONE

Abbiamo studiato l'effetto di vari fattori che possono influire sul tasso di parassitizzazione, allo scopo di incrementarlo, visto che esso, come del resto per la generalità dei Larvevoridi a uova microtipiche, tende a mantenersi su valori piuttosto bassi. Generalmente, nel corso della nostra sperimentazione, tale parametro è espresso in base al rapporto tra il numero dei pupari del parassita e quello delle crisalidi dell'ospite. Per alcune ricerche si sono calcolate anche le percentuali di parassitizzazione delle crisalidi con riferimento alle larve di II età di *Pseudogonia*, la cui presenza è rivelata esternamente da più o meno vistose macchie nerastre nell'avancorpo, in corrispondenza degli imbuti respiratori. I

tassi, così rilevati, sono apparsi più alti di quelli riferiti ai pupari di circa il 10-20%, evidenziando una sensibile mortalità tra le larve del parassita sia in seconda che in III età. Le crisalidi così compromesse finiscono generalmente col morire assieme all'endofago. Eccezionalmente le percentuali di parassitizzazione delle crisalidi sono state riferite agli adulti del Larvevoride. Esse si collocano ad un livello ancora più basso rispetto a quelle sui pupari, denunciando una discreta mortalità pupale del dittero (Mellini e Beccari, 1983). Va infine ricordato, nel valutare i dati sotto riportati, che *Pseudogonia* è un entomofago solitario.

1. «Dose» pro capite di uova

Per stabilire il quantitativo ottimale di uova microtipiche, da somministrare collegialmente alla popolazione larvale dell'ospite, sono state saggiate dosi minime di 4 uova /larva e suoi multipli fino ad un massimo di 200. La resa in pupari del dittero aumenta progressivamente col crescere del carico di uova solo per quantitativi modesti, fino a raggiungere i valori più elevati alla dose di 16 uova/larva. Oltre, la resa scende rapidamente causa la caduta nel tasso di impupamento dell'ospite; infatti, come si ricorderà, il parassita può completare lo sviluppo soltanto nella crisalide. Per di più il peso dei «pupari», e quindi la qualità degli entomofagi, tende ad abbassarsi, sia in crisalidi maschili che femminili, con l'incremento del carico parassitario, e così dicasi per l'indice di trasferimento ponderale, cioè il rapporto tra il peso del «pupario» e quello della crisalide in cui si è formato.

Tutto ciò rappresenta il riflesso della caduta nei parametri vitali dell'ospite il quale, con il progressivo aumento del livello di superparassitizzazione, subisce una notevole crescita del tasso di mortalità prematura (specialmente, poi, se la parassitizzazione ha coinvolto larve di penultima età), ed inoltre un graduale incremento nella formazione di crisalidi farate, nelle quali l'endofago solo raramente riesce a completare lo sviluppo, nonchè una lieve caduta nel peso delle crisalidi (Mellini e Gironi, 1981).

Per quanto riguarda gli aspetti tecnici dell'allevamento di questa coppia ospite-parassita, si conclude che la dose di uova tendenzialmente più efficace, tra quelle sperimentate, è di 16 uova /larva per contaminazioni collegiali di larve nelle fasi iniziali dell'ultima età. Ma poichè, con tale carico e con questo stadio, il peso dei pupari tende leggermente a flettersi, nella pratica si è poi adottata la dose di 8 uova /larva; con essa, anche se le percentuali di parassitizzazione sono alquanto minori, si elimina il suddetto inconveniente conseguendo nel contempo un notevole risparmio di uova.

In ogni caso si conferma che la resa in pupari, rispetto al numero di uova propinate, è estremamente bassa, come del resto è stato rilevato in altri sistemi ospite-parassita in cui quest'ultimo è caratterizzato dall'emissione di uova microtipiche.

2. Livelli di dispersione delle uova sul substrato trofico

Le percentuali di parassitizzazione, per contaminazioni collettive, aumentano progressivamente col crescere del grado di dispersione delle uova sugli zimbelli.

Evidentemente, distribuendo lo stesso quantitativo (8 uova pro capite) su una superficie maggiore, si offre la possibilità di accedere alle stesse da parte di un più elevato numero di larve. Per gruppi di 50 individui, presenti nello stesso contenitore, non si è tuttavia rilevata una proporzione diretta tra i livelli di dispersione e i corrispondenti incrementi nelle percentuali di parassitizzazione; infatti, per raddoppiare queste ultime, occorre quasi decuplicare i primi. Inoltre i tassi di mortalità prematura delle larve ospiti diminuiscono notevolmente col crescere del grado di sparpagliamento delle uova del parassita, contribuendo ad aumentare ulteriormente la resa totale in pupari dell'endofago. Quasi certamente la più elevata mortalità, nelle tesi a maggiore concentrazione di uova, è da attribuire a fenomeni di superparassitizzazione assai spinta che conducono a morte entrambi i simbionti (Mellini e Braga, 1982).

3. Parassitizzazione collettiva e individuale

La prima tecnica indicata è quella più semplice e sbrigativa. Consiste nel fornire globalmente, alle larve riunite nello stesso contenitore, una dose di uova pro capite pari ad un minimo di 4 e ad un massimo di 8-16, opportunamente disperse su un congruo numero di zimbelli di cera. Il giorno successivo, quando questi risultano completamente divorati, viene somministrato un quantitativo di dieta sufficiente a garantire il raggiungimento della maturità larvale.

Con questo metodo non si riescono ad ottenere rese in pupari molto elevate, quasi certamente perchè una parte delle larve non si nutre, o solo in misura minima, degli zimbelli cerosi, restando quindi indenni, mentre un'altra parte, che ne ha ingerito una dose eccessiva, finisce col soccombere o col formare crisalidi farate, non idonee per l'ulteriore sviluppo delle larve di II età del parassita.

Si è così pensato di procedere ad una contaminazione individuale, isolando le larve ciascuna con la propria razione di uova. In questo modo, e soprattutto col carico di 8 uova /larva, si sono ottenute rese in pupari ben più elevate rispetto a quelle della parassitizzazione collettiva anche se, in condizioni di isolamento, le larve esibiscono comportamenti aberranti, sbriciolando le porzioni di zimbello, riunendone i frammenti con fili sericei e non ingerendo, di conseguenza, tutte le uova. Va comunque tenuto presente che, in ogni caso, i quantitativi di uova propinati sono da ritenersi puramente nominali.

Considerata però la notevole mole di lavoro che tale tecnica richiede, si ritiene che valga la pena adottarla solo nel corso di ricerche a carattere sperimentale, mentre per gli allevamenti massali rimane consigliabile quella della parassitizzazione collettiva anche se dà risultati inferiori (Campadelli e Zanotti, 1990).

4. Età delle uova microtipiche

Poiché, come si è rilevato in un capitolo precedente, la vitalità delle «uova» diminuisce gradualmente col trascorrere del tempo, sovente sono state impiegate

per la parassitizzazione uova, per così dire, di giornata, cioè deposte nel giro delle ultime 24 ore. La sostituzione, nelle gabbie per gli adulti, degli zimbelli già usati, carichi di uova, con quelli nuovi viene infatti eseguita ogni mattina.

Rilievi con cadenza più ravvicinata (rispetto a quelli eseguiti precedentemente da Campadelli, 1982), nel corso della prima settimana successiva all'ovideposizione, hanno indicato che tanto le percentuali di parassitizzazione ottenute quanto il tasso di schiusa delle uova crescono in modo significativo passando da quelle appena deposte a quelle «vecchie» di 48 ore, per poi diminuire sensibilmente nei giorni successivi. Si ritiene che la minore validità delle uova, emesse da poco tempo, risieda nel fatto che in esse la larveta, anche se in apparenza perfettamente formata, non è ancora pronta per sgusciare. Pur nel concetto generale che le femmine a uova microtipiche ovidepongono a sviluppo embrionale concluso, è lecito ritenere che vi sia, come in tutti i fenomeni biologici, una certa variabilità e che una certa percentuale di uova, diversa da una femmina all'altra e secondo le particolari contingenze, abbia bisogno di 1-2 giorni supplementari per essere in grado di schiudere (Coulibaly, 1991). Ricerche successive di Mellini e Borgatti (1991) hanno effettivamente dimostrato che, con l'invecchiamento delle femmine prolificanti, inizia, attorno al 10° giorno di ovideposizione, l'emissione di uova addirittura non embrionate, con un tasso che si accresce gradualmente, col trascorrere del tempo, fino a valori prossimi al 20%.

5. Ulteriori tentativi per innalzare il tasso di parassitizzazione

Nella convinzione che gli inconvenienti, registrati con la contaminazione collettiva, risiedano in una irregolare distribuzione delle uova fra le larve coinquiline, delle quali una parte ne inghiotte in eccesso ed una parte, non sufficientemente attratta dalla semplice cera, non ne ingerisce affatto, si è tentato di migliorare, a favore di queste ultime, le qualità eduli degli zimbelli. Così ne abbiamo allestiti di quelli formati col pabulum delle larve, alquanto modificato per l'esclusione delle farine integrali, ma certamente assai appetiti. Essi però sono risultati poco attrattivi per le femmine ovideponenti del parassita, causa il colore bruno-scuro e la superficie piuttosto ruvida; per questo motivo e per il fatto che gli incrementi nelle percentuali di parassitizzazione sono apparsi decisamente modesti, essi sono stati scartati (Mellini e Calzolari, dati non pubblicati).

Sempre allo scopo di rendere più appetito il substrato su cui vengono deposte le uova, si è ricorso allo stratagemma di immergere le foglioline di cera, a ovideposizione avvenuta, in soluzione di miele a varia concentrazione, ovvero in sospensioni acquose di polline. Le larve divorano gli zimbelli così trattati più rapidamente e più completamente, facendo registrare miglioramenti, sebbene modesti, nella resa dei pupari rispetto ai controlli (Mellini e Panza, dati non pubblicati).

Notevole importanza riveste, in riguardo alle percentuali di parassitizzazione, lo stadio che viene contaminato; esse infatti, a parità di altre condizioni, aumen-

tano con l'avanzare del medesimo; ma di ciò sarà detto più avanti trattando, in generale, degli effetti dello stadio dell'ospite, al momento della contaminazione, su varie caratteristiche biologiche del suo antagonista.

6. Considerazioni conclusive

Il parametro discusso in questo capitolo è, ovviamente, di primaria importanza ai fini della moltiplicazione massale del parassita.

I fattori che incidono sulle percentuali di parassitizzazione sono dunque, riassumendo, il numero di uova pro-capite somministrate, la loro età, il loro livello di dispersione sugli zimbelli, l'appetibilità del substrato che le sopporta, e le modalità di contaminazione (individuale o collettiva).

A questi ne va aggiunto almeno un altro, pure importante, che sarà considerato più avanti, e cioè l'età delle larve da sottoporre alla contaminazione. Possiamo qui anticipare che la resa in pupari è tanto maggiore quanto più avanzato è lo stadio esposto alle uova dell'entomofago.

Va però ribadito che, anche applicando tutte le condizioni più favorevoli, non abbiamo mai ottenuto percentuali di parassitizzazione molto elevate, superiori all'80%. Pure aumentando enormemente la «dose» di uova, gli incrementi sono, in proporzione, estremamente modesti. D'altra parte non si può eccedere nelle suddette dosi perchè, accanto a lievi aumenti percentuali, si manifesta poi, nel concreto, un calo nella resa dei pupari riferito alla popolazione iniziale di larve, causa l'innalzarsi dei tassi di mortalità tra le larve ospiti e di formazione di crisalidi farate, inidonee per lo sviluppo del parassita (Mellini e Gironi, 1981).

VII. BIOLOGIA DELLE LARVE PARASSITE

1. Ritmo di accrescimento delle larve di I età

La larveta, sgusciata nel mesentero dell'ospite, migra nel lacunoma e, nel giro di qualche ora, penetra in un muscolo delle pareti addominali. A questo punto, il ritmo della sua crescita è largamente influenzato dallo stadio della vittima al momento della contaminazione. Se questa viene effettuata su larve di penultima età, la L_1 del parassita presenta un ritmo rapido in corrispondenza della muta dell'ospite all'ultima età, cui ne segue uno assai lento, fino a che questo non ha raggiunto la maturità larvale. Se viene condotta su larve dell'ultima età al 3° e 5° giorno, il ritmo è dapprima lento per poi accelerare fortemente quando la vittima perviene alla maturità. Se, infine, la contaminazione viene condotta su larve sbazzolate, la crescita è invece, fin dall'inizio, rapidissima. Di norma, comunque, il passaggio ad L_{II} è procrastinato fino a quando l'eopupa dell'ospite non entra in fase di apolisi.

Va sottolineato che il ritmo di accrescimento delle L_1 dell'entomofago dipende non solo dal ritmo di sviluppo della vittima ma, ovviamente, anche da carat-

teristiche proprie, individuali, com'è dimostrato dalla notevole variabilità ponderale delle L_1 coinquiline in vittime superparassitizzate una tantum. D'altro canto il ritmo di crescita di queste ultime viene a sua volta alterato dalla presenza delle L_1 endofaghe, ed in particolare sensibilmente rallentato per penetrazione in fasi avanzate dell'ultima età (Mellini et alii, 1986).

2. Localizzazione delle L_1 e L_{II} , rispettivamente nelle larve e nelle eopupe della vittima

La larva neonata, una volta introdottasi in un muscolo dell'ospite, vi permane fino a quando non passa in II età. I muscoli più interessati sono quelli a livello del 4° e 5° urite. Tuttavia si è potuto stabilire che la distribuzione delle L_1 tende progressivamente a spostarsi in direzione cefalica con l'avanzare dell'età dell'ospite al momento della contaminazione, per cui vi è una certa correlazione fra lunghezza delle larve ospiti e localizzazione delle L_1 del parassita. Ciò induce a supporre che la loro frequenza nei vari segmenti non dipenda da preferenze in relazione ad eventuali peculiari caratteristiche dei medesimi, ma sia semplicemente la conseguenza del punto in cui avviene la schiusa dell'uovo microtipico all'interno del canale alimentare della vittima. In altri termini, le L_1 perforerebbero le pareti dell'intestino appena sgusciate e, pervenute nell'emocele, si alloglierebbero nei muscoli somatici immediatamente prospicienti. Pertanto, se la vittima è di maggior mole, a parità di tragitto compiuto dalle uova ingerite e di tempo impiegato per schiudere, le larvette verrebbero automaticamente a trovarsi spostate in avanti rispetto alla segmentazione del corpo dell'ospite. Inoltre, in ogni caso, non vi è relazione fra il peso raggiunto dalle L_1 e la loro localizzazione, per cui si può anche escludere che esistano nel corpo della vittima dei segmenti privilegiati in cui l'accrescimento del parassita resti in qualche modo favorito.

Quando l'ospite perviene allo stadio di eopupa, la larveta endofaga compie la prima muta, fuoriesce dal muscolo e si introduce nello spazio virtuale compreso tra la cuticola pupale in formazione e l'esuvia larvale destinata ad essere rigettata. A questo punto, le L_{II} si rendono chiaramente visibili, per trasparenza, all'esterno del corpo della vittima, per cui è assai agevole rilevarne la distribuzione durante la decina di ore in cui dura la fase di apolisi. Inizialmente la localizzazione delle L_{II} riflette quella delle L_1 intramuscolo, ma poi essa tende a spostarsi in direzione cefalica e, per quanto in misura minore, verso quella caudale, cosicchè tutti i segmenti del corpo, sia toracici che addominali, ne restano coinvolti.

Nelle vittime superparassitizzate, che rappresentano la norma, la comparsa delle L_{II} nello spazio esuviale non è simultanea, o pressochè tale, ma avviene in tempi successivi, anche notevolmente distanziati, durante tutto il periodo dell'apolisi.

Non si è notata nessuna correlazione tra ubicazione e peso delle L_{II} . Invece, in linea di massima, finiscono col prevalere automaticamente le L_{II} che, al mo-

momento dell'ecdisi dell'ospite, si trovano nella regione anteriore, dato che la penetrazione nella crisalide neoformata avviene per insinuazione sotto le teche, ed in particolare quelle alari ancora depigmentate.

Le L_{11} site nella metà posteriore del corpo della eopupa vengono invece rigettate assieme all'esuvia larvale che, scivolando in direzione caudale, le spazza via imprigionandole nelle sue pieghe. Tale decimazione non è tuttavia negativa per il parassita, visto che esso è solitario mentre, causa le modalità di contaminazione, l'ospite resta regolarmente superparassitizzato. Anzi, l'eliminazione relativamente precoce degli individui in soprannumero costituisce un vantaggio per il superstite che così può sfruttare tutta la vittima a proprio beneficio, la quale poi, nel caso di *Galleria*, è addirittura sottodimensionata rispetto agli ospiti naturali rappresentati dai ben più corpulenti Nottuidi (Mellini e Campadelli, 1986).

3. Canale alimentare delle larve di III età

Le larve dei Ditteri Larvevoridi, che sono tutte endofaghe, non defecano, come del resto la generalità dei parassitoidi, fino al conseguimento della maturità. Evidentemente nel loro tubo digerente si trovano differenziate strutture atte ad impedire la fuoriuscita di sostanze fecali, che inquinerebbero il loro stesso substrato trofico. In realtà, però, l'anatomia di questo apparato, al pari di quella degli altri visceri, è stata ben poco studiata in questa famiglia. Perciò di particolare interesse appaiono i reperti da noi presentati in riguardo alle larve di *Pseudogonia* (Gardenghi e Mellini, 1990).

Il mesentero, eccezionalmente allungato e di calibro pressochè uniforme, appare internamente suddiviso, da strette fasce circolari di cellule epiteliali particolarmente turgide, in tante concamerazioni intercomunicanti. In ognuna di esse, i processi di digestione e di assorbimento procedono con ritmo proprio, indipendente da quelle vicine. In relazione a ciò, ed al fatto che la larva si libera degli escrementi solo alla fine della fase trofica, non si attua, durante i processi digestivi, la graduale progressione del contenuto intestinale in direzione caudale. Questa poi è impedita, a livello del tratto posteriore del canale alimentare, da varie strutture anatomo-istologiche. Infatti il mesentero, a livello della valvola pilorica, non solo risulta fortemente rastremato, ma presenta il lume addirittura obliterato da cellule epiteliali notevolmente allungate in direzione mediale, fino a tangere reciprocamente, nonchè da un vero e proprio zaffo, assai compatto, di piccole cellule sporgenti all'interno del proctodeo. A questo primo efficace sbarramento, che occlude completamente l'intestino, ne seguono altri due, rappresentati dal segmento posteriore dell'ileo, particolarmente esile ma con pareti formate da grosse cellule epiteliali che ne ostruiscono il lume per lungo tratto, e, da ultimo, da enormi cellule epiteliali poste avanti ed attorno all'apertura anale che appare virtuale.

In conclusione, perchè possa avvenire l'espulsione dei materiali contenuti nell'intestino, deve aprirsi la valvola pilorica, deve ridursi, forse per perdita di

turgore, il volume delle cellule epiteliali situate a monte dell'ampolla rettale, ed infine devono essere azionati i muscoli dilatatori dell'apertura anale.

VIII. EFFETTI DEI FATTORI AMBIENTALI SUL SISTEMA

1. Livelli termici ottimali per l'allevamento dei due simbionti

La temperatura è certamente uno dei fattori climatici più studiati, per la sua primaria importanza nel condizionare lo sviluppo e l'attività degli insetti. Le ricerche abbondano poi nei confronti dei parassitoidi, soprattutto allo scopo di individuare il livello termico ottimale per la loro produzione. Numerose sono pure quelle relative ai Larveoridi; ma esse, in genere, si limitano a rilevare la correlazione inversa tra innalzamento della temperatura e durata dello sviluppo, anche se, in realtà, il livello ottimale varia con lo stadio. Va tuttavia osservato che nel caso dei parassitoidi, accanto agli effetti diretti del fattore termico, si pongono quelli indiretti derivati dalle influenze subite dagli ospiti, le quali, com'è noto, finiscono, in varia misura, col riflettersi sui primi. Ora è soprattutto da questa angolazione che abbiamo indagato sul nostro sistema, e quindi, non solo sugli aspetti meramente quantitativi, ma anche su quelli qualitativi della produzione (Mellini et alii, 1979).

Larve di *Galleria*, sottoposte a parassitizzazione agli inizi dell'ultima età, sono state allevate a vari livelli termici, varianti da 20° a 34°C. Il peso delle crisalidi, sia maschili che femminili, sia parassitizzate che indenni, è aumentato progressivamente con l'innalzarsi della temperatura. Di pari passo è cresciuto il peso dei pupari del parassita, ed in misura proporzionale all'incremento subito dalle vittime. Se ne deduce, pertanto, che il peso dell'entomofago non è direttamente influenzato dalla temperatura, ma soltanto dal peso raggiunto dal suo ospite. Anche la resa in crisalidi tende ad innalzarsi con il gradiente termico. Invece la resa in pupari del parassita, che si mantiene all'incirca costante fino a 30°C, si dimezza di colpo a 34°C. Così dicasi per le percentuali di sfarfallamento, per cui, a questa temperatura, la resa in adulti si riduce a circa 1/5 di quella registrata ai valori termici inferiori. Dal punto di vista pratico, emerge quindi che il livello termico ottimale non coincide per i due simbionti: mentre per l'ospite si aggira sui 34°C ed oltre, per il suo parassita esso scende a circa 27°C.

Successivamente Campadelli e Tosi (1984) hanno ripreso l'argomento, analizzando l'effetto di livelli termici, almeno nominalmente costanti, compresi tra 24° e 35°C, intervallati di 2°C e a partire da larve contaminate in penultima età. Le percentuali di parassitizzazione, calcolate in base al rapporto numerico pupari/crisalidi, si mantengono pressochè invariate fino a 29°C per poi scendere rapidamente fino ad azzerarsi a 35°C, come pure le percentuali di sfarfallamento degli adulti del parassita.

Restano pertanto confermati i dati sopra esposti in riguardo a questi parame-

tri. Discrepanze vengono invece riscontrate per quanto riguarda i pesi degli ospiti che, anzichè aumentare con la temperatura, tendono invece a diminuire. Il parassita, comunque, segue le curve ponderali delle sue vittime. La differenza sostanziale, tra questa sperimentazione e la precedente, consiste nel fatto che, grazie ai continui perfezionamenti apportati alle tecniche di allevamento, i pesi delle crisalidi di entrambi i sessi sono nel frattempo aumentati mediamente del 40%.

2. Basse temperature per la conservazione del parassita

Constatato che *Pseudogonia* può essere mantenuta a lungo vitale, in condizioni di quiescenza, a +4°C allo stato di uovo, si è voluto accertare se tale livello termico potesse essere adottato per preservare anche stadi successivi dell'entomofago, già penetrati nei loro ospiti (Campadelli, 1986). Esso si è invece rivelato nocivo per entrambi i simbionti, anche per esposizioni di relativamente breve durata. Su larve non sottoposte a parassitizzazione, nonchè su larve parassitizzate in penultima età ed esposte al freddo in quello stesso stadio o nel successivo, una permanenza di soli 4 giorni dimezza abbondantemente le percentuali di incrisalidamento e tende ad abbassare quelle di sfarfallamento dalle crisalidi indenni, mentre non incide in modo significativo sui pesi. Per quanto riguarda il parassita, si verifica una forte caduta nella produzione dei pupari, non solo causa il declino nel tasso di impupamento dell'ospite, ma anche per una sensibile contrazione nelle percentuali di parassitizzazione delle crisalidi superstiti, probabilmente a causa di una mortalità differenziata incidente in misura superiore tra gli individui contaminati od anche direttamente a carico dello stesso parassita. L'indice di trasferimento non subisce invece variazioni di rilievo, nonostante le profonde modificazioni biochimiche che il freddo può indurre negli insetti. Aggiungiamo infine che, a differenza di quanto si è rilevato in altri sistemi, l'esposizione della vittima a basse temperature non rappresenta, nel caso della nostra coppia, un metodo sicuro per procedere alla sua deparassitizzazione.

3. Densità di popolazione dell'ospite

È noto che la densità di popolazione può condizionare in vario modo gli insetti, spesso accelerandone o rallentandone l'accrescimento, ovvero modificandone caratteristiche megetiche, morfologiche, cromatiche ed etologiche. Allo scopo di rilevare nel nostro sistema l'effetto del fattore affollamento, applicato all'ospite, abbiamo messo a confronto densità di popolazione progressivamente raddoppiate, partendo da 6 larve fino a 100, parassitizzate alla fine della penultima età collegialmente, e quindi distribuite in contenitori di uguale capienza (2 litri) agli inizi dell'ultima età (Mellini et alii, 1979). Va osservato che in questi primi periodi della nostra sperimentazione su questa coppia, la cella climatica

era regolata sui 27°C. Il peso medio delle crisalidi maschili e femminili, sia parassitizzate che indenni, è cresciuto progressivamente con l'aumentare della densità dell'ospite; parimenti si sono innalzate fortemente anche le percentuali di incrisalidamento. Le ripercussioni sul parassita sono apparse immediate: sono aumentati corrispondentemente i livelli ponderali dei «pupari» ed inoltre è migliorata la resa nella loro produzione, dato che l'incrisalidamento della vittima è una condizione essenziale perchè lo sviluppo dell'antagonista, arrestato allo stadio di L_{II} iniziale, possa procedere.

Come si può rilevare, vi è stretto parallelismo tra gli effetti ottenuti aumentando la densità di popolazione e quelli conseguiti innalzando la temperatura. Pertanto, in un lavoro successivo (Bratti, 1985), si sono misurate, mediante un termoregistratore a sonde, le temperature reali nella massa trofica invasa dalle larve che tendono a riunirsi in gruppo (densità di popolazione da 12 a 200). Si è così potuto constatare che, mentre il livello termico a densità 12 si discosta pochissimo da quello della cella (da qualche anno oramai regolata sui 30°C), a densità doppia e quadrupla sale notevolmente, finchè, a densità 200 è, almeno il primo giorno, di 8°C superiore. Tuttavia man mano ci si avvicina all'incrisalidamento, la temperatura nei contenitori tende gradualmente a scendere fino a livellarsi con quella della cella climatizzata. Le percentuali di parassitizzazione mostrano solo una leggera flessione alla densità più elevata, mentre quelle di sfarfallamento dell'entomofago si mantengono su valori invariati, sebbene sia stata superata, sia pure per breve tempo e solo inizialmente, la soglia termica dei 35°C, letale per il parassita. Questa apparente contraddizione cade se si ritiene che *Pseudogonia*, nel corso della I età larvale, sia dotata di una maggiore resistenza alle «alte» temperature e se si considera che, dal momento in cui essa muta alla II età nell'eopupa dell'ospite, il livello termico si è oramai abbassato sui valori nominali della cella.

A questo punto ci si è chiesto se i miglioramenti che subisce *Galleria*, con l'aumentare della densità di popolazione, siano da attribuire a veri e propri effetti di gruppo ovvero, semplicemente, all'incremento termico che l'affollamento realizza. Per rispondere a tale quesito, si è impostata una sperimentazione in cella climatizzata a 35°C, anzichè a 27° e a 30°C come per le due precedenti, e su 7 livelli di affollamento compresi tra 1 e 100 (Dindo e Monti, 1986).

Da essa è emerso che tanto i pesi delle crisalidi che le percentuali di mortalità non presentano variazioni significative nelle varie tesi. Si è pertanto concluso che *Galleria* non è sottoposta ad effetti di gruppo, ma semplicemente trae vantaggio dall'aumento del livello termico che l'affollamento determina, e specialmente quando è al di sotto dei 35°C, che è la temperatura di cui normalmente beneficia il nostro lepidottero negli alveari da aprile a settembre.

Poichè nel corso di certe sperimentazioni, ed in particolare quando si applica la tecnica della contaminazione individuale, le larve vengono allevate, almeno per un certo periodo, isolatamente, sarebbe consigliabile, per evitare le aberrazioni comportamentali precedentemente segnalate e nel contempo favorire l'ingestione delle uova, mantenerle, per quella giornata, in ambiente climatizzato

sui 35°C, per poi trasferirle, a contaminazione avvenuta, nella cella regolata sui soliti 30°C.

4. Fotoperiodo

Al pari della temperatura, il fotoperiodo è un fattore cardinale per la vita degli insetti sui quali influisce a vari livelli, sia fisiologici che etologici che morfologici.

Le varie condizioni fotoperiodiche (16:8, 0:24, 0:24 con buio interrotto nella mattinata da brevi ed irregolari periodi di illuminazione, 24:0 con luce rossa) sono state applicate a *Galleria* a partire dalle fasi intermedie della penultima età larvale, durante la quale è caduta la parassitizzazione, fino allo sfarfallamento degli adulti di entrambi i simbionti, quindi durante solo un segmento, e per di più relativamente breve, della vita dell'ospite (Mellini e Dindo, 1982).

Per *Galleria* la condizione più favorevole è rappresentata da una scotofase permanente. In tale situazione le larve impiegano un tempo significativamente minore per giungere all'impupamento ed inoltre i pesi delle crisalidi, tanto maschili che femminili, sia parassitizzate che indenni, raggiungono in media pesi superiori. La condizione più sfavorevole è invece costituita dal fotoperiodo 16:8, che è quello comunemente impiegato per l'allevamento degli insetti.

Col fotoperiodo 0:24 *Pseudogonia* beneficia, al solito, dei vantaggi conseguiti dalla sua vittima, innalzando i pesi dei pupari ed abbreviando i tempi di sviluppo fino al raggiungimento di questo stadio. Pertanto, nell'economia dell'allevamento, conviene mantenere il sistema ospite-parassita in condizioni di oscurità permanente almeno fino all'impupamento di quest'ultimo, visto anche che, a differenza di quanto accade per vari Ditteri Ciclorrafi in situazioni simili, il nostro entomofago non manifesta fenomeni di diapausa. Durante tale periodo è anche consigliabile usare, nella cella, lampadine schermate di rosso, poichè l'illuminazione ripetuta, sia pure per breve tempo, durante le normali ispezioni per la manutenzione dell'allevamento, tendono a disturbare le larve di *Galleria*.

In seguito, mentre l'ospite continuerà il ciclo con fotoperiodo 0:24, gli adulti del parassita dovranno essere posti in cella con fotoperiodo standard 16:8, affinché possano nutrirsi, accoppiarsi e ovideporre.

Poichè *Pseudogonia* non entra mai in diapausa, qualora l'ospite continui ininterrottamente i suoi cicli, ci siamo chiesti se essa resti del tutto indipendente dalle condizioni ambientali, ed in particolare dal fotoperiodo. Da una popolazione del dittero evolutasi al buio, dalla schiusa delle uova fino allo sfarfallamento, sono stati prelevati 2 gruppi di adulti, subito isolati in 2 celle, una con fotoperiodo 16:8 e l'altra con fotoperiodo 8:16. Le principali differenze rilevate nelle due situazioni sperimentali sono: a) le femmine a giorno breve iniziano l'ovideposizione con 3 giorni di ritardo rispetto a quelle esposte a giorno lungo; b) cominciano a deporre uova non embrionate prima dei controlli ed in numero notevolmente più elevato. Ma per quanto riguarda l'insorgenza di un eventuale stato di diapausa non sono emerse differenze tra le due tesi: in ogni caso con

le uova dei 2 gruppi si è ottenuto lo sviluppo regolare del parassita fino allo stadio immaginale e con tassi di parassitizzazione, misurati sui pupari, del tutto simili (Mellini e Borgatti, 1991).

IX. EFFETTI DEL SUBSTRATO TROFICO DELL'OSPITE SUL SISTEMA

1. Quantità di pabulum

È stato calcolato il fabbisogno alimentare di *Galleria* durante i due ultimi stadi larvali (Dindo e Monti, 1988). Esso si aggira su 1-1,2 g di dieta standard pro capite. Quantitativi dimezzati di dieta (0,6 g) portano a medie ponderali significativamente più basse, sia per le crisalidi parassitizzate che per le indenni, ed in particolare per quelle femminili; inoltre allungano i tempi di impupamento negli individui parassitizzati di entrambi i sessi.

L'entomofago risente delle variazioni quantitative della dieta dell'ospite in vari modi. Innanzitutto accusa una caduta nei pesi dei pupari formati in vittime sottodimensionate, accompagnata da un allungamento nei tempi di impupamento, in conseguenza degli analoghi fenomeni intervenuti a carico della vittima. Oltre a ciò, mostra un aumento nell'indice di trasferimento ponderale (rapporto tra peso del pupario e quello della crisalide) negli esemplari cresciuti su quantitativi di dieta minori; evidentemente i parassiti, disponendo di vittime di mole ridotta, le sfruttano più a fondo. Accanto a queste ripercussioni abbastanza intuitive, ed in gran parte negative, se n'è manifestata una inattesa e apparentemente positiva, cioè percentuali di parassitizzazione più elevate negli ospiti sottoalimentati. Questo fenomeno può tuttavia essere spiegato, ipotizzando che in simili vittime, in qualche modo indebolite proprio per la carenza di cibo, i meccanismi di difesa contro il parassita siano meno efficienti. Peraltro da questi pupari, che come si è riferito sono più piccoli, le percentuali di sfarfallamento degli adulti denunciano una sensibile flessione.

2. Periodi di digiuno forzato

Nel corso dell'allevamento di *Galleria* può accadere che le larve restino per qualche giorno prive di cibo. Si è voluto perciò studiare quali effetti, periodi di digiuno più o meno prolungato possano determinare nell'ospite e di riflesso nel suo antagonista. È noto infatti che in certi sistemi la carenza di cibo per l'ospite, anche se protratta solo per qualche giorno, può provocare, in popolazioni precedentemente contaminate, una drammatica caduta nelle percentuali di parassitizzazione. Anche nella nostra coppia sperimentale lo sviluppo dell'entomofago potrebbe infatti essere condizionato dalle variazioni sia quantitative che qualitative, a livello biochimico, dell'ospite sottoalimentato, senza contare possibili variazioni nel bilancio ormonale del medesimo con ripercussioni sull'antagonista, vista la sua dipendenza dalle secrezioni endocrine della vittima.

Sono state sottoposte a periodi di digiuno, protratti per 2, 3 e 6 giorni, larve

dell'ultima età parassitizzate nello stadio precedente; dopo la fase d'inedia, esse sono state rifornite del normale quantitativo di pabulum. Gli effetti a carico dell'ospite sono consistiti in un progressivo decremento ponderale delle crisalidi, già evidente con soli due giorni di digiuno; tale lasso di tempo è pertanto sufficiente a compromettere in modo definitivo il futuro accrescimento delle larve, anche se queste vengono subito dopo adeguatamente foraggiate.

I tempi di incrisalidamento si allungano di un periodo maggiore, o pari, a quello di digiuno; pure la mortalità larvale si innalza mentre quella pupale si mantiene su valori costanti. Dette variazioni nei parametri biologici dell'ospite finiscono coll'influire regolarmente su quelli del parassita, il quale manifesta una decisa flessione nel peso dei pupari e una notevole caduta nella sua resa, anche per un digiuno di 2 giorni soltanto (Fanti, 1983).

Quanto sopra dimostra in modo inequivocabile come ritardi anche brevi, nel rifornimento di pabulum alle larve dell'ospite, portino automaticamente ad uno scadimento qualitativo e quantitativo nella produzione del parassita e, più in generale, tenuto conto anche dei risultati della sperimentazione di cui al paragrafo precedente, dell'importanza primaria, per tutto il sistema, di una buona alimentazione per l'ospite.

3. Qualità del pabulum

Uno degli ingredienti più dispendiosi, nella dieta artificiale di *Galleria*, è rappresentato dalla cera di Api. Allo scopo di abbassare i costi, si è tentato perciò di eliminare tale prodotto.

L'esperienza, al solito, è stata impostata su larve della penultima età, visto anche che il maggiore accrescimento ponderale in assoluto si realizza, com'è regola tra gli insetti, durante i due ultimi stadi. La contaminazione, collettiva, alla dose di 8 uova/larva, è stata effettuata nel corso di detta età.

Per quanto riguarda l'ospite, si è rilevato che le diete migliori sono quelle in cui il quantitativo di cera è più elevato, e le peggiori quelle in cui tale ingrediente manca. In concreto, i pesi delle crisalidi, nelle prime, tendono ad essere più elevati, e così dicasi per le percentuali di incrisalidamento. Corrispondentemente anche i pesi dei pupari tendono ad essere più alti, come pure gli indici di trasferimento sia in ospiti maschili che femminili. Ciò dimostra che la cera d'api, ed in particolare quella grezza, brunastra e non purificata, è un componente indispensabile della dieta di *Galleria* ed inoltre che i suoi benefici si riflettono su *Pseudogonia* la quale, non solo trae vantaggio da una vittima di maggiore mole ma riesce, nel caso specifico, anche a sfruttarla in misura più spinta (Campadelli e Barlotti, 1985).

È emerso inoltre che, dal punto di vista tecnico della preparazione del pabulum, la cera deve essere sciolta a bagnomaria; se viene invece liquefatta alla fiamma, la qualità di entrambi i simbionti cade ai livelli più bassi.

Da questo contesto risulta evidente che le interazioni a livello tritrofico non si manifestano solo nelle simbiosi più complesse pianta-fitofago-parassitoide, ma

anche in quelle relativamente semplificate in cui la pianta è sostituita da una dieta artificiale.

Va d'altro canto rilevato che la cera, da sola, non consente l'accrescimento delle larve di *Galleria*; in tali condizioni infatti, oltre ad un allungamento abnorme dei tempi di impupamento, si formano crisalidi assai minute ed in percentuali assai basse, e per di più solo partendo da larve di ultima età, con conseguente incredibile nanizzazione dei parassiti e caduta verticale nella loro produzione (Mellini e Campadelli, 1982).

Ancora più interessanti, in riguardo ai livelli tritrofici con parassita appartenente alla famiglia dei Larvevoridi, sono le esperienze di Bratti e Costantini (1991) sul sistema *Galleria mellonella*-*Archytas marmoratus*, che da alcuni anni alleviamo in permanenza accanto a *Pseudogonia*. Arricchendo il contenuto proteico della dieta dell'ospite, mediante l'aggiunta di farina integrale di soia, non si ottengono, all'apparenza, sensibili miglioramenti nelle caratteristiche biologiche di *Galleria*, rispetto alla dieta normalmente usata, ma si evidenziano, invece, notevoli benefici per l'entomofago, la cui resa migliora sia dal punto di vista quantitativo (percentuali di parassitizzazione più elevate) che qualitativo (pesi maggiori dei pupari).

Infine, con riferimento alla qualità della dieta, va ricordato quanto discusso in un capitolo precedente, e cioè gli effetti nocivi dell'inquinamento causato dalle feci, sebbene solide, emesse dall'ospite *Galleria* nel suo stesso pabulum, se accumulanti in quantità elevata.

X. EFFETTI DELL'APPLICAZIONE DI SOSTANZE ORMONALI ED ANTIORMONALI AL SISTEMA

In relazione all'ipotesi ormonale formulata e perfezionata da uno di noi (Mellini, 1975 e 1983), secondo la quale la fisiologia del parassita è, nei due primi stadi larvali, largamente condizionata dal bilancio endocrino della sua vittima, si sono condotte alcune esperienze basate sull'applicazione di prodotti ormonalmente attivi sull'ospite, per registrarne poi gli effetti su entrambi i simbionti.

1. Iuvenoidi

Le nostre ricerche si sono concentrate su questi prodotti largamente noti ed in parte usati dagli agricoltori nella lotta contro gli insetti nocivi. Anche altri Autori si sono occupati dell'impatto di tali molecole sugli entomofagi, ma in genere limitandosi a considerare solo le percentuali di mortalità indotte sulle loro popolazioni. Noi, invece, abbiamo voluto studiare anche gli aspetti qualitativi dei parassiti emergenti da vittime trattate per contatto ovvero per os. I prodotti commerciali usati sono il triprene, l'idroprene, il metoprene e un derivato del benzossatiolo.

L'applicazione del triprene sull'ospite nell'ultima età larvale, prima o

dopo la parassitizzazione, con dosi progressivamente raddoppiate da 0,39 nl fino a 1600 nl, ha determinato, attraverso l'espletamento di una muta in soprannumero, un prolungamento della vita larvale, un incremento ponderale delle crisalidi nonché un aumento della mortalità larvale. Mentre la somministrazione per contatto, effettuata una tantum, dà, al di sopra di una dose minima efficace, risposte megetiche simili per quantitativi anche notevolmente diversi, il trattamento per os, se prolungato nel tempo (da 2 a 20 giorni), induce un progressivo ingigantimento.

Gli effetti dello iuvenoide sull'endofago sono apparsi quasi esclusivamente indiretti, e cioè mediati da quelli verificatisi nella vittima. Essi consistono, corrispondentemente, in: a) un allungamento della vita larvale di pari durata; b) un incremento nel peso dei pupari ma non in misura rigidamente proporzionale a quello subito dalla vittima, dato che, come sarà riferito più dettagliatamente in seguito, l'indice di trasferimento tende ad abbassarsi col crescere della mole di questa; c) un calo nella produzione dei pupari parallelo a quello verificatosi a carico delle crisalidi, per cui si deduce che la mortalità del parassita dipende unicamente, o quasi, da quella dell'ospite; nè fa differenza se il trattamento topico ha seguito o preceduto la parassitizzazione, o se lo iuvenoide ha accompagnato più o meno a lungo l'endofago, come è accaduto nel caso della somministrazione per os.

In conclusione, questo mimetico dell'ormone giovanile ha determinato, nel sistema, sia effetti negativi (incremento della mortalità) sia effetti positivi (aumenti ponderali delle pupe) per cui, in definitiva, la biomassa finale nelle tesi trattate non varia sensibilmente rispetto al testimone, salvo che alle dosi più elevate (Mellini e Gironi, 1980).

Anche i trattamenti con idroprene sono stati effettuati su larve nelle fasi iniziali dell'ultima età, previa parassitizzazione nello stadio precedente; essi però sono consistiti solo in applicazioni topiche, con dosi varianti da 16 a 80 nl. In ogni caso, a parità di dose, questo iuvenoide è apparso decisamente più attivo del precedente.

Sull'ospite ha causato la stessa sintomatologia ed in più una spiccata mortalità pupale, non registrata con l'uso del triprene. Il parassita, oltre al solito ingigantimento dei pupari e allungamento della vita larvale, accusa una mortalità assai più elevata, in conseguenza del protrarsi dell'azione negativa dell'idroprene a carico delle crisalidi, cioè dello stadio in cui esso compie lo sviluppo dalla II età larvale in poi.

Pure in questa sperimentazione, gli effetti provocati dallo iuvenoide sull'endofago sono risultati indiretti, e cioè rappresentati da un semplice trasferimento di quelli indotti nell'ospite; non si manifestano però, come accade in questo, fenomeni di progressiva mortalità pupale in relazione alla dose (Mellini e Cesari, 1982).

In ogni caso, tuttavia, l'azione dell'idroprene sul sistema è piuttosto drastica e l'incidenza negativa sul parassita è maggiore, causa, come si è accennato, il procrastinarsi dell'effetto letale sulle crisalidi, con conseguente coinvolgimento

dell'antagonista. Per quanto concerne il prolungamento della vita larvale dell'ospite trattato, l'analisi dell'incremento ponderale giornaliero medio indica che, mentre la prima parte del supplemento temporale viene trascorsa in attività trofica, la restante viene passata, in proporzione crescente con la dose, in uno stato di quiescenza.

Con una ulteriore ricerca, si è voluto indagare sugli effetti di applicazioni topiche di iuvenoidi a stadi ontogenetici dell'ospite più avanzati. Così si sono somministrate dosi crescenti di idroprene da 0,16 a 10 nl pro capite, oltre che a larve agli inizi dell'ultima età, a larve prossime alla maturità, nonché a larve mature, eopupe e crisalidi neoformate.

Le risposte dell'ospite variano con lo stadio. La produzione di adulti si annulla per trattamenti sulle eopupe; l'incremento ponderale delle crisalidi si azzerà per le applicazioni su larve vicine alla maturità e su stadi successivi; la durata della vita larvale invece aumenta, oltre che per larve all'inizio dell'ultima età, anche per quelle quasi mature e mature.

Per quanto concerne gli effetti sull'entomofago, non si notano differenze notevoli nelle percentuali di parassitizzazione in rapporto allo stadio contaminato; inoltre la morte del parassita allo stadio di larva o di pupa, negli ospiti trattati, è apparsa dipendere, in larga misura, da una precoce morte della crisalide. Infatti, affinché la selettività dello iuvenoide nel sistema si manifesti appieno, è necessario che l'ospite resti in vita fino a quando l'antagonista non abbia superato una certa fase critica dello sviluppo, oltre la quale la vitalità della sua vittima non è più una condizione indispensabile. Comunque, in seguito ad applicazioni su eopupe e pupe dell'ospite, si assiste ad un forte decremento ponderale dei pupari; ciò significa che la morte prematura cui soggiaceranno le crisalidi, quando non compromettono la sopravvivenza del parassita, ne pregiudicano tuttavia, in qualche misura, le capacità di accrescimento.

Le buone caratteristiche di selettività dell'idroprene, nei riguardi del parassita, vengono poi confermate in modo inequivocabile dal fatto che, nel caso di applicazioni sulle eopupe, tutte destinate a formare crisalidi soccombenti, le percentuali di parassitizzazione e di sfarfallamento dell'entomofago non si discostano da quelle rilevate per gli altri stadi trattati, ove, invece, una discreta aliquota della popolazione dell'ospite non parassitizzata riesce a sfarfallare (Mellini e Boninsegni, 1983).

Uno dei rari prodotti con meccanismo d'azione simile a quello dell'ormone giovanile, registrato in Italia e disponibile per l'impiego in pieno campo, è il ben più noto e diffuso methoprene. Abbiamo perciò ritenuto opportuno saggiarne l'impatto sul nostro sistema ospite-parassita. Allo scopo sono state fatte applicazioni topiche, con dosi varianti da 100 a 800 nl, su larve nei primi due giorni dell'ultima età, prima o dopo la parassitizzazione, nonché per via orale per un periodo variabile da 1 a 8 giorni. Gli effetti sono praticamente gli stessi ottenuti coi precedenti iuvenoidi; viene inoltre confermato che le conseguenze sul parassita sono indirette e cioè semplicemente derivate da quelle subite dall'ospite. Si precisa, infine, che gli incrementi ponderali minori, determinati

dalle dosi basse dello iuvenoide, appaiono dovuti ad un semplice prolungamento della fase trofica dell'ospite, mentre quelli maggiori sono da attribuire anche all'espletamento di una muta in soprannumero.

La differenza principale, fra trattamenti topici e quelli per os, consiste nel fatto che mentre i primi danno, al di sopra di una dose minima efficace, risposte simili per dosi diverse, i secondi determinano un progressivo ingigantimento in relazione alla durata dell'applicazione. Va poi rilevato che gli adulti giganti che riescono a sfarfallare, in percentuali maggiori nel caso di somministrazioni per os (forse in relazione al fatto che lo iuvenoide viene assunto gradualmente nel tempo, anzichè in un'unica dose massiccia, come per le applicazioni topiche), generalmente si riproducono deponendo uova fertili dalle quali schiudono larvete vitali, in grado di dare origine ad una nuova generazione del lepidottero. Non vi sono invece differenze sostanziali tra le risposte date dagli entomofagi penetrati prima o dopo il trattamento topico dell'ospite (Verenini, 1983).

Accanto a questi iuvenoidi di provenienza U.S.A., si è voluto provare anche un composto più recente di sintesi italiana, e più precisamente il 5- (1- (2- (2-etossi- etossi) etossi) etossi) - 1,3 - benzossatiolo, acetale preparato da M. Dolci dell'Università di Torino. Si è proceduto ad applicazioni topiche del prodotto, al solito diluito in acetone, a dosi progressivamente doppie di principio attivo, varianti da 10 nl fino a 500 nl pro capite a larve nelle fasi iniziali dell'ultima età, al solito previamente sottoposte a parassitizzazione nello stadio precedente.

Gli effetti sull'ospite sono consistiti in un modesto aumento di peso, in un allungamento pressochè trascurabile della vita larvale media, in una elevata mortalità, non solo a carico delle larve ma altresì dilazionata sulle crisalidi. Il prodotto è risultato, quindi, avere scarso potere iuvenilizzante e di contro cospicua attività insetticida.

Gli effetti di questo mimetico dell'ormone giovanile sull'entomofago si sono dimostrati ancora una volta indiretti, e assai modesti per quanto concerne pesi e tempi. La notevole selettività del prodotto è dimostrata dal fatto che non si verifica una netta caduta nel tasso di parassitizzazione e che non vi è relazione diretta tra questa e aumento della dose del principio attivo. Inoltre le percentuali di sfarfallamento del parassita sono notevolmente più elevate di quelle dell'ospite in tutte le tesi e, per di più, quelle di individui malformati, cioè caratterizzati dalla mancata introflessione dello ptilino e dalla distensione parziale o totale delle ali, non si discostano in maniera significativa dal testimoniaio (Verenini et alii, 1985).

2. Anti-ormone giovanile

Visti i risultati tutto sommato piuttosto modesti, raggiunti finora in campo applicato dai mimetici dell'ormone giovanile nel contenimento degli esapodi nocivi, la ricerca, in questi ultimi anni si è rivolta, con sempre maggiore impegno, verso sostanze in grado di esercitare, invece, un'azione antagonista verso il suddetto ormone. Abbiamo perciò ritenuto opportuno studiare l'impatto di questi

nuovi prodotti, capaci di indurre metamorfosi precoci o comunque anomalie di sviluppo fin dalle prime fasi della vita postembrionale, sui parassitoidi. Gli antiormoni più noti sono certamente i precoceni, ma poichè questi agiscono quasi esclusivamente sugli insetti eterometabolici, siamo ripiegati sul fluoromevalonato, composto di sintesi caratterizzato da notevole attività anti-ormone giovanile nelle larve di molte specie di Lepidotteri, in quanto dotato di azione inibente la sua sintesi.

Il prodotto è stato applicato topicamente su larve della penultima età parassitizzate, ed anche indenni, per verificare eventuali interazioni fra il FM e v ed il parassitoide. Su *Galleria*, tale sostanza, alle dosi di 40, 80 e 160 nl pro capite, ha causato un impupamento precoce, un calo nei pesi delle crisalidi, varie anomalie nello sviluppo, quali la comparsa di forme intermedie larva-pupa e di crisalidi farate, nonché un lieve aumento della mortalità larvale. Questi effetti si sono riflessi su *Pseudogonia* che ha accusato sia un decremento nei pesi che nella produzione dei pupari, determinatisi in conseguenza, rispettivamente, della nanizzazione delle crisalidi e del calo numerico nella loro formazione. Non si sono invece registrati effetti diretti della sostanza sull'entomofago, com'è dimostrato dal fatto che le percentuali di parassitizzazione, al solito calcolate in base al rapporto numerico pupari/ crisalidi, e le percentuali di sfarfallamento si mantengono, in tutte le tesi trattate, sullo stesso livello dei controlli. Infine non si sono riscontrate, confrontando i gruppi sottoposti e non a parassitizzazione, particolari interazioni fra FMev e parassita (Fanti e Bratti, 1986).

3. Ecdisteroidi

A differenza dei prodotti precedenti, che sono stati applicati all'ospite, quelli ecdisonici sono stati somministrati, nella maggioranza dei casi, direttamente al parassita. Ciò è stato possibile allevando le larvette entomofaghe su diete artificiali chimicamente definite, come verrà illustrato nella parte finale della presente memoria.

L'aggiunta di infinitesimali dosi di 20- idrossiecdisone alle suddette diete, ovvero trattamenti topici sulle larvette di I età, da tempo ferme in tale stadio, hanno indotto in tempi brevi la muta. Tali prove ci spingono a ritenere che anche nell'ospite naturale l'effetto esercitato dall'ormone sul parassitoide sia diretto e che questo assuma ed utilizzi gli ecdisteroidi della vittima.

Il medesimo risultato è stato ottenuto trattando topicamente, con tale ormone, addomi «legati» di larve di *Galleria*. In conclusione l'abile sperimentazione condotta da Fanti (1990) ha dimostrato in modo inequivocabile la necessità di ecdisteroidi esogeni per l'induzione della muta nelle larve di I età del parassita.

XI. EFFETTI INDOTTI DAL PARASSITOIDE SULL'OSPITE

Com'è noto, i parassiti appartenenti all'ordine dei Ditteri non causano, a differenza di quelli facenti parte dell'ordine degli Imenotteri, notevoli ripercus-

sioni sulle loro vittime prima di condurle a morte. Le loro femmine, infatti, mancando di ovipositore morfologico, non sono in grado di iniettare nei loro ospiti, come invece fanno gli Apocriti, secreti atti a modificarne i processi fisiologici.

Pertanto le influenze esercitate dai Larvevoridi sulle loro vittime sono da attribuire esclusivamente all'attività delle larve endofaghe, ed in particolare a quelle della prima e della II età iniziale che, in equilibrio con gli ospiti, si comportano da veri parassiti senza recare loro danni irreparabili. Le larve dei Larvevoridi, se non altro, possono immettere, nel corpo della vittima, liquidi digestivi, tant'è vero che esse, generalmente, finiscono, come larve di III età a sviluppo avanzato, con l'evolversi in un pabulum parzialmente liquefatto. Quindi, almeno teoricamente, vi è la possibilità di un intervento chimico sull'ospite, senza escludere quello, per così dire, di ordine meccanico, dovuto alle migrazioni ed ai movimenti delle larvette endofaghe che peraltro, nel presente caso, risultano estremamente ridotti.

1. Mortalità larvale (prematura)

Sovente, in occasione di parassitizzazioni collettive, si registra un aumento nei valori di questo parametro, e specialmente se la contaminazione è condotta su stadi larvali precedenti l'ultima età; questi, infatti, possono soccombere in occasione della muta successiva alla parassitizzazione. È ovvio che, in tali casi, anche l'entomofago perisce come larva di I età, dato che il suo ulteriore sviluppo può generalmente procedere solo nelle crisalidi.

Com'è intuitivo, il tasso di mortalità aumenta gradualmente col crescere della dose di uova propinate alle larve (Dindo, 1982) ed è maggiore, a parità di razione, per le larve giovani (Dindo, 1988). Anche per questo motivo, oltre che per praticità, si è giunti alla conclusione che, almeno nella normale routine dell'allevamento, è preferibile sottoporre a parassitizzazione larve dell'ultima età (Mellini e Gironi, 1981).

2. Intensificazione delle tendenze cannibalistiche

Non di rado le larve tipicamente fitofaghe dei Lepidotteri esibiscono fenomeni di cannibalismo, i quali possono essere incentivati da situazioni contingenti, quali l'affollamento nonché la quantità e la qualità del cibo disponibile. Ci si è pertanto chiesti se la parassitizzazione, ad opera di *Pseudogonia*, possa esaltare le tendenze adelfofaghe di *Galleria*, che già si manifestano, sia pure sporadicamente, anche in condizioni normali a carico delle crisalidi imbozzolate.

Da una prima sperimentazione, condotta da Dindo e Cesari (1985), è risultato che le percentuali di pupe divorate, di solito parzialmente, crescono in modo significativo nelle tesi sottoposte a parassitizzazione, rispetto a quelle non contaminate. Inoltre si è visto che il fenomeno tende ad intensificarsi col carico di

uova somministrate, nonchè col crescere della densità di popolazione dell'ospite, sebbene il fattore affollamento di per sè non esalti in modo significativo, almeno ai livelli saggiati, la propensione verso il cannibalismo nelle tesi non sottoposte a parassitizzazione.

Considerato che le suddette alterazioni comportamentali dell'ospite sono indotte da larvette estremamente minute, e per di più confinate entro muscoli, si è tentato di chiarire attraverso quale meccanismo esse possano esercitare la loro influenza. Si è così indagato sugli effetti, determinati al riguardo, da una scarsa disponibilità di cibo per la vittima, visto che il digiuno, anche se parziale, è ritenuto uno dei principali fattori scatenanti le tendenze cannibalistiche. Dalle prove è emerso che tale condizione, da sola, non le esalta, mentre, se associata alla parassitizzazione, sia con 4 che con 8 uova/larva, le incrementa in misura altamente significativa. Se ne conclude pertanto che, risultando il digiuno praticamente ininfluenza nel rafforzare l'adelfofagia, questa non sia causata da un eventuale aumento delle esigenze trofiche, determinatosi verosimilmente nell'ospite in seguito alla presenza ed alla attività dell'endofago (Dindo, 1987). La scarsa disponibilità di cibo è invece apparsa un fattore importante nell'innalzare il tasso di mortalità larvale, com'è dimostrato dal confronto tra i testimoni non parassitizzati nutriti normalmente ovvero sottoalimentati. Posto che è la presenza della L_1 endofaga la responsabile dell'aumentata adelfofagia della vittima, si è voluto verificare se i tempi di permanenza della minutissima larvella possano influire sull'intensità del fenomeno. Somministrando la dose di 8 uova pro capite a larve di penultima età, nonchè a larve di ultima età nelle fasi iniziali e in quelle finali, si è potuto notare che il tasso di cannibalismo diminuisce in modo altamente significativo con l'avanzare della età di contaminazione, mentre nei rispettivi controlli non parassitizzati si mantiene su uno stesso basso livello. Si conferma pertanto l'ipotesi di partenza, e cioè che gli effetti indotti dal parassitoide, a questo riguardo, sono tanto maggiori quanto più a lungo si è protratta la sua permanenza come L_1 nella vittima (Dindo, 1988). Ciò del resto collima con la tendenza, riscontrata nelle prove precedenti, ad un incremento dei fenomeni cannibalistici col crescere della dose di uova somministrate all'ospite.

Attualmente si sta sperimentando sulla eventuale importanza degli enzimi, riversati dalle larve parassite nel corpo dell'ospite, quali fattori responsabili o corresponsabili delle sue esaltate manifestazioni cannibalistiche.

3. Formazione di crisalidi farate

Si tratta di pupe difettose, inguainate nell'ultima esuvia larvale, dalle quali non sfarfallano nè l'ospite nè il parassita. Le L_1 endofaghe, attivate dall'apolisi pupale della vittima, compiono regolarmente la muta; le L_{11} inducono l'imbuto respiratorio ma poi finiscono lentamente col soccombere in condizioni asfittiche poichè l'esuvia larvale dell'ospite, non essendo stata rigettata, chiude il foro verso l'esterno dell'imbuto impedendo gli scambi gassosi.

Le pupe farate compaiono sporadicamente anche nelle popolazioni non sottoposte a contaminazione, ma la loro frequenza aumenta notevolmente fra quelle parassitizzate, ed in particolare se la somministrazione delle uova microtipiche è avvenuta collegialmente.

Le percentuali, poi, appaiono progressivamente più alte col crescere della dose di uova propinate (Mellini e Gironi, 1981) ed in generale assai più elevate se la contaminazione è caduta su larve dell'ultima età piuttosto che su stadi precedenti (Dindo, 1982).

4. Pesi delle crisalidi

Le larve vittime dei Larvevoridi possono, in vari sistemi, raggiungere pesi minori rispetto agli individui indenni. Ciò accade quando lo sviluppo del parassita è indipendente da quello dell'ospite, per cui quest'ultimo soccombe più o meno precocemente in relazione allo stadio che ha subito l'attacco.

Ben diverso è il caso della nostra coppia poichè, qualunque sia lo stadio contaminato, il parassita sacrifica l'ospite soltanto dopo che questo si è incrisalidato. Perciò se si verificano influenze sull'accrescimento della vittima, queste possono essere determinate solo dalle minute larvette intramuscolari di I età, che, ripetiamo, sono di solito l'unico stadio dell'endofago presente nelle larve in accrescimento.

Per carichi parassitari modesti, cioè almeno fino a 16 uova/larva, l'incidenza dei minuti endofagi realmente sgusciati e alloggiati nei muscoli (pari all'incirca alla metà delle uova ingerite) sui parametri ponderali degli ospiti è poco evidente. Infatti, per contaminazioni su larve dell'ultima età, il peso medio delle crisalidi è solo tendenzialmente minore negli individui effettivamente parassitizzati, se di sesso femminile; le differenze ponderali denunciano invece un calo significativo se la parassitizzazione è anticipata al penultimo stadio, sempre limitatamente alle femmine (Dindo, 1982).

Pure per contaminazioni in fasi sempre più avanzate dell'ultimo stadio, si assiste ad una progressiva riduzione nei pesi delle crisalidi femminili, mentre quelle maschili accusano addirittura un incremento rispetto ai testimoni indenni, forse a causa di una mortalità larvale differenziata a carico degli individui di minor mole (Mellini et alii, 1985).

Nel corso delle prime sperimentazioni, quando il peso medio delle crisalidi era decisamente basso, si era notato che, al di sotto di un certo livello ponderale, le crisalidi parassitizzate, sia maschili che femminili, erano alquanto più pesanti delle indenni, mentre al di sopra di tale soglia la regola non era più valida. Ciò induceva a ritenere che il leggero scarto ponderale a favore delle crisalidi parassitizzate, registrato per gli individui medio-piccoli, si realizzasse grazie ad un meccanismo di mortalità differenziata a carico degli ospiti di taglia minore, ovvero attraverso una più facile eliminazione del parassita nei medesimi. Così finirebbe con lo spostarsi automaticamente verso l'alto il peso delle crisalidi parassitizzate rispetto alla media di quelle sane.

Come si vede, la situazione è abbastanza complessa, causa l'interferenza di vari fattori. Turchetti (1987), studiando nel nostro sistema le differenze manifestatesi nei fenomeni parassitari, col variare dell'età dell'ospite alla contaminazione, conclude che il parassita non sembra esercitare alcun effetto sul peso delle crisalidi. È vero che la parassitizzazione in ultima età si accompagna ad un calo nel peso delle crisalidi, ma poichè lo stesso decremento si registra anche nel controllo indenne, la causa va ascritta ai noti effetti negativi della manipolazione, cui le larve in questo stadio sono più sensibili, se non altro perchè, in mancanza di un'ulteriore muta larvale, vengono meno le possibilità di recupero.

Per carichi parassitari elevati, invece, il peso delle crisalidi diminuisce progressivamente col crescere della dose di uova, anche se il fenomeno viene in parte mascherato da un graduale incremento nella mortalità larvale dell'ospite (Mellini e Gironi, 1981).

5. Mortalità complessiva dell'ospite causata dal parassitoide

Per misurare l'efficacia di un parassitoide, nel contenere le popolazioni di un ospite, si determinano, di solito, le percentuali di parassitizzazione quando ormai l'entomofago ha raggiunto le fasi finali dello sviluppo. Esse però rappresentano solo una parte, e sovente non quella maggiore, della mortalità complessiva causata dalla sua azione. Questo fatto è ben noto in riguardo agli Imenotteri, sia Terebranti che Aculeati, le cui femmine possono uccidere direttamente un'aliquota più o meno cospicua di ospiti, semplicemente nutrendosi della loro emolinfa sgorgante da fori praticati, con i genitali esterni, nel tegumento, proprio a tale scopo.

Per i parassitoidi appartenenti all'ordine dei Ditteri, detta operazione non è possibile, non essendo le femmine attrezzate per ferire l'ospite.

Tuttavia una attenta analisi condotta da Dindo (1986) ha messo in evidenza che le percentuali di mortalità riscontrate nelle popolazioni di *Galleria*, parassitizzate da *Pseudogonia*, vanno ben oltre le pure percentuali di parassitizzazione, misurate in base al rapporto numerico pupari/crisalidi. Infatti, contaminando collettivamente larve della penultima età, con dosi di 4 e di 8 uova/larva, si è constatato che, accanto ad un tasso di parassitizzazione pari soltanto al 22 e al 17%, se ne pone uno di mortalità complessiva dell'ospite (sempre riferito al numero iniziale delle larve impiegate nella sperimentazione) di ben l'80% e l'88%, rispettivamente.

Questi fattori di mortalità aggiuntiva, nelle tesi sottoposte a contaminazione, sono rappresentati, in varia misura, da: a) mortalità larvale, b) formazione di crisalidi farate (dalle quali, di norma, non sfarfalla nessuno dei due simbionti), c) cannibalismo a carico delle crisalidi, d) mortalità pupale prematura (con la morte, anche in questo caso, di entrambi i partner).

XII. EFFETTI INDOTTI DALL'OSPITE SUL PARASSITOIDE

1. Come stadio «contaminato»

L'età dell'ospite, al momento della parassitizzazione, riveste una enorme importanza per il parassitoide, sia esso appartenente all'ordine degli Imenotteri che a quello dei Ditteri, condizionandone vari parametri biologici (Mellini, 1986). Per tale ragione, questo argomento è stato affrontato più volte nel nostro sistema sperimentale consentendo di mettere in evidenza le seguenti influenze.

a) Sulla durata dello sviluppo larvale. Poichè l'accrescimento della larva endofaga, dalla II età in poi, può svolgersi solo quando l'ospite si è incrisalidato, ne consegue che il tempo per raggiungere la maturità è tanto più lungo quanto più precoce è lo stadio contaminato. È del resto, questa, una condizione comune a tutti i parassitoidi caratterizzati da un ritmo di sviluppo dipendente da quello della vittima. Così, per penetrazioni in larve di *Galleria* verso la fine dell'ultima età, la larveta di *Pseudogonia* riduce la durata del primo stadio a soli 5 giorni, contro i 9 impiegati per contaminazione nelle fasi iniziali della stessa età (Mellini et alii, 1985).

b) Sul peso dei pupari. Esso è sempre correlato, in modo più o meno stretto, a quello delle crisalidi.

Tuttavia il peso raggiunto dalle larvette endofaghe all'inizio della II età (cioè verso la fine della fase più propriamente parassitaria) varia in relazione allo stadio contaminato, nel senso che esso è tanto maggiore quanto più precoce è l'età dell'ospite al momento della parassitizzazione (Baronio et alii, 1981).

Se la contaminazione cade su fasi vieppiù avanzate dell'ultimo stadio, fino alla maturità, il peso dei pupari formati in ospiti femminili diminuisce in modo progressivo, parallelamente al decremento ponderale delle rispettive crisalidi, in conseguenza della tardiva manipolazione subita dalle larve. In ospiti maschili, invece, il peso dei pupari si mantiene su valori costanti, poichè le crisalidi di questo sesso, effettivamente parassitizzate, risultano, forse attraverso fenomeni di mortalità differenziata a carico degli individui di minor mole, tendenzialmente più pesanti rispetto ai vari testimoni (Mellini et alii, 1985). In ogni caso gli indici di trasferimento, considerando globalmente quelli dei due sessi per ciascuna tesi, non variano in modo sensibile, per cui si escludono processi di nanizzazione a carico del parassita con l'avanzare dell'età di contaminazione, come invece accade in altri sistemi coinvolgenti Larvevoridi. Anche se le dimensioni raggiunte dalle L_{11} iniziali, al momento dell'impupamento dell'ospite, sono minori, per contaminazioni effettuate in fasi molto avanzate dell'ultima età, l'ulteriore, comparativamente enorme, accrescimento dell'entomofago non ne risulta compromesso.

Anche Turchetti (1987), che trova pupari di peso inferiore per parassitizzazione in ultima età, rispetto a quella in penultima, attribuisce il fenomeno non ad un effetto dell'età di contaminazione dell'ospite sul parassita, ma semplicemente ad un calo ponderale delle crisalidi nelle tesi contaminate in ultima età. Calcolando poi la biomassa dell'antagonista, egli giunge alla conclusione che essa è,

sì, maggiore per contaminazione in ultima età, dato il più alto numero di pupari, ma che qualitativamente è migliore per contaminazione nel penultimo stadio, visto che il peso dei pupari è, in questo caso, più elevato.

c) Sul tasso di parassitizzazione. Contaminando separatamente larve delle ultime 4 età, con la dose di 8 uova pro capite (quella di solito adottata nella sperimentazione), si è rilevato che le percentuali di parassitizzazione aumentano gradualmente con l'avanzare dello stadio colpito (Fanti e Campadelli, 1987).

Tale fenomeno trova la sua spiegazione in due ordini di fatti: I) le uova microtipiche hanno maggiori probabilità di passare indenni attraverso l'apparato boccale di ospiti a sviluppo larvale più avanzato (Mellini e Braga, 1982); II) le larve del I stadio del parassita, che di solito sono indotte a passare in II età dalla muta pupale dell'ospite, possono restare attivate anzitempo da una semplice muta larvale, qualora la contaminazione sia stata precoce (Fanti e alii, 1987). In tale caso le L_{II} vengono rigettate con l'ecdisi dell'ospite, non avendo modo di indurre l'imbuto respiratorio secondario, che può essere differenziato esclusivamente sotto le teche pupali.

Anche Turchetti (1987) trova che le percentuali di parassitizzazione sono significativamente superiori per contaminazioni in ultima età, rispetto a quelle ottenute intervenendo sulla penultima, sia che tale parametro venga misurato in base al solito rapporto numerico tra pupari e crisalidi, sia in base a quello tra L_{II} - L_{III} del parassita e crisalidi. Egli fa poi notare che il primo tasso risulta costantemente inferiore al secondo, indicando, in tal modo, che la mortalità larvale dell'entomofago può raggiungere livelli tutt'altro che trascurabili. Infine, con una approfondita analisi dell'incremento nelle percentuali di parassitizzazione, egli scopre che tale fenomeno è completamente a carico di ospiti femminili.

In generale, la contaminazione di larve nelle fasi terminali del loro accrescimento crea problemi più o meno gravi per i Larvevoridi che concludono il loro sviluppo in tale stadio dell'ospite. Appariva pertanto di grande interesse accertare cosa succede nel caso in cui la parassitizzazione avvenga mediante l'ingestione di uova microtipiche, quindi per una specie a sviluppo completamente dipendente da quello della vittima ed in gran parte procrastinato nello stadio pupale. Allo scopo sono state messe a confronto larve contaminate in vari periodi, compresi tra la penultima età e le fasi finali della costruzione del bozzolo, condizione, quest'ultima, che in natura non può ovviamente mai verificarsi. Va precisato che le larve estratte da tale involucro riprendono, per qualche tempo, l'attività trofica rendendo così efficace la somministrazione delle uova. Le percentuali di parassitizzazione aumentano passando dalla penultima all'ultima età, ma poi diminuiscono notevolmente nel corso di questa, contaminando larve a sviluppo vieppiù avanzato; risalgono infine sorprendentemente, in modo brusco, parassitizzando larve sbazzolate. Ciò è possibile perchè l'endofago riesce in tempo utile a passare in II età, grazie al ritardo subito dall'ospite nell'impupamento e grazie al proprio eccezionalmente rapido ritmo di sviluppo, stimolato dalla carica di ecdisteroidi presenti nell'emolinfa della vittima in questo stadio (Mellini et alii, 1985).

2. Come sesso

Il parassita, come abbiamo ripetutamente accertato nel nostro sistema, risente profondamente delle condizioni dell'ospite. È pertanto logico attendersi che un carattere tanto importante e complesso, qual'è il sesso della vittima, possa ripercuotersi in qualche modo sull'entomofago. Ed infatti abbiamo riscontrato vari effetti ai seguenti livelli (Mellini et alii, 1978).

a) Sul peso dei pupari. Quelli formatisi in ospiti femminili pesano mediamente circa il 30% in più, rispetto a quelli sviluppatasi in ospiti maschili. Ciò rappresenta la conseguenza del forte dimezzamento sessuale di *Galleria* in favore delle femmine e di un indice di trasferimento tendenzialmente maggiore in vittime di questo sesso, soprattutto da parte della larva entomofaga femminile, come viene in seguito confermato anche da Fanti (1983).

b) Sulle percentuali di parassitizzazione. Esse risultano significativamente più elevate in crisalidi femminili, come del resto viene segnalato anche per altri sistemi con parassita larvevoride. Nel presente, date le modalità di contaminazione indiretta dell'ospite e la breve durata di esposizione delle uova microtipiche alle larve, le differenze nel tasso di parassitizzazione, a meno che non si dimostri una maggiore propensione da parte delle larve femminili a nutrirsi delle foglioline di cera inquinate dalle uova, potrebbero essere spiegate solo attraverso una mortalità differenziata del parassita nelle due categorie di ospiti.

Il suddetto fenomeno viene rilevato a più riprese nel corso di vari lavori (Mellini e Campadelli, 1980; Campadelli, 1984). Turchetti (1987) ha poi precisato che la maggiore resa in pupari nelle crisalidi femminili, rispetto alle maschili, si verifica soltanto per contaminazione in ultima età.

c) Sulla sex ratio del parassita. Essa è nettamente a favore dei maschi. Esaminata però in relazione al sesso dell'ospite, emerge che mentre nelle crisalidi femminili essa è prossima all'unità, in quelle maschili se ne discosta significativamente a svantaggio delle femmine. Questi risultati collimano con quelli discussi nel paragrafo precedente: la minore fuoriuscita di parassiti da ospiti maschili, lì segnalata, si attuerebbe dunque grazie ad una flessione nella componente femminile.

Il fenomeno di una costante minore produzione di entomofagi femminili, in ospiti maschili, indica una certa inadeguatezza della vittima di questo sesso nei riguardi del parassita di sesso opposto. La ragione di ciò probabilmente risiede nelle minori dimensioni della crisalide maschile, da un lato, e nelle maggiori esigenze trofiche del parassita femminile, dall'altro.

In conclusione, dunque, in *Galleria* le femmine risultano decisamente superiori ai maschi come ospiti di *Pseudogonia*, innanzi tutto perchè in esse il parassita, sia maschio che femmina, raggiunge un peso notevolmente superiore, poi perchè in esse tende a realizzare un indice di sfruttamento più elevato e la sex ratio non si sposta a favore dei maschi, come invece succede in vittime di questo sesso, ed infine perchè in esse le percentuali di parassitizzazione raggiungono valori più elevati, come è stato confermato, più o meno esplicitamente, anche nel corso di indagini successive.

La sperimentazione condotta da Mellini et alii (1978), i cui risultati sono stati esposti sopra, indica nel maggiore peso, esibito dagli ospiti femminili, la principale caratteristica responsabile della loro superiore qualità nei riguardi del parassita. Le ricerche di Fanti e Biondi (1988), oltre a confermare la supremazia, quali ospiti, delle crisalidi femminili sotto l'aspetto quantitativo, ne dimostrano altresì la preminenza qualitativa. Per neutralizzare l'influenza del dimegismo sessuale della vittima, essi hanno suddiviso le crisalidi in 12 classi ponderali e hanno confrontato i vari parametri del parassita, nei due sessi dell'ospite, nell'ambito di ciascuna classe. Si è così potuto osservare che le percentuali di parassitizzazione, a carico delle femmine, sono statisticamente più elevate in tutte le classi, escluse la prima e l'ultima. Poichè è improbabile che le larve femminili di *Galleria*, date le modalità di contaminazione, ingeriscano un più elevato numero di uova, gli Autori formulano varie ipotesi per spiegare la maggiore idoneità delle femmine a fungere da ospiti per *Pseudogonia*. Fra di esse, sono ricordate variazioni nel livello degli enzimi nel canale alimentare (responsabili della schiusa delle uova) nei due sessi, diversa intensità della reazione emocitaria di difesa nonchè livelli endocrini differenti.

3. Come mole

Visto che gli ospiti naturali di *Pseudogonia* sono rappresentati da Lepidotteri Nottuidi, quindi da organismi ben più corpulenti di *Galleria*, appariva opportuno verificare l'adattamento del nostro larvevoride al variare della mole di questo suo ospite di sostituzione. In un campo megetico allargato della vittima, con pesi delle crisalidi oscillanti da una trentina di mg fino a oltre 500 mg, si è potuto accertare che il peso dei pupari del parassita aumenta con quello dell'ospite, da una media di 20 mg ad una di oltre 160 mg, dimostrando pertanto che questo entomofago, al pari di molti altri, è dotato di capacità di adattamento veramente notevoli. Però, mentre l'incremento si mantiene proporzionale in vittime di peso inferiore ai 200 mg, oltre questo limite esso tende a flettersi progressivamente, anche se in crisalidi giganti si formano pupari relativamente enormi. Infatti l'indice di trasferimento, cioè il rapporto ponderale tra pupari e crisalidi, che fino al suddetto limite tende a stabilizzarsi su valori medi prossimi a 0,500, superato si abbassa gradualmente fino a scendere a 0,350. Si ritiene pertanto che il peso ottimale dell'ospite si aggiri sui 200 mg. Poichè, di norma, solo le crisalidi femminili si avvicinano o addirittura superano, in allevamenti standard, questo traguardo, appare evidente che, tutto sommato, *Galleria* è un ospite sottodimensionato per *Pseudogonia*; questa, di conseguenza, non può, evolvendosi a sue spese, estrarre in pieno il suo potenziale megetico e quindi tutte le caratteristiche ad esso collegate, quali fecondità, longevità, ecc.

Va peraltro ricordato che, poichè l'indice di trasferimento varia notevolmente da una coppia all'altra, a parità di peso e di sesso della vittima, il peso finale raggiunto da ogni singolo parassita dipende non solo dalla massa dell'ospite, in cui si è trovato a svilupparsi, ma altresì dalle proprie capacità intrinseche di accrescimento (Mellini e Campadelli, 1982).

Le dimensioni dell'ospite, oltre che sul peso dell'entomofago, influiscono, a quanto pare, anche sulla sua sex ratio. Infatti, mentre nelle classi ponderali inferiori prevalgono numericamente i parassiti di sesso maschile, in quelle di maggiore peso sono di gran lunga predominanti i parassiti femminili. Tende quindi a verificarsi, nei riguardi di questo parassitoide dittero, un fenomeno simile a quello che si manifesta in certi entomofagi Imenotteri. Il meccanismo dello spostamento della sex ratio a favore dei maschi negli ospiti di piccola taglia è tuttavia diverso nei due gruppi: per il dittero consiste, verosimilmente, in una mortalità differenziata che grava maggiormente sulle femmine (più esigenti), per gli Imenotteri nel manifestarsi della partenogenesi arrenotoca in presenza di ospiti minuti.

In conclusione esiste, dunque, un dimegetismo sessuale di *P. rufifrons* a favore del sesso femminile, peraltro poco evidente perchè di norma impedito dalle modeste dimensioni della vittima; esso però tende a manifestarsi negli ospiti di maggiore taglia.

Per quanto riguarda le percentuali di parassitizzazione, in campo megetico allargato (cioè con le classi ponderali inferiori alimentate durante l'ultima età con sola cera e in quelle superiori nutrite, durante lo stesso stadio, con dieta addizionata a triprene), esse hanno un andamento parabolico. In campo megetico normale, tolta la classe ponderale inferiore (media 75 mg), ove si riscontrano le percentuali più basse in assoluto, la curva mostra, partendo da un massimo nella classe successiva (media 109 mg), un andamento tendenzialmente decrescente, con riferimento alle L_{II} ed ai pupari dell'entomofago, mentre sale con riferimento agli adulti. Ciò significa che la mortalità dei pupari decresce con l'aumentare della loro mole, parallelamente ad una maggiore vitalità, misurata sulle indenni, delle crisalidi più pesanti (Mellini e Beccari, 1983).

4. Conclusioni

Il parassita, dunque, subisce puntualmente, all'interno del sistema, tutta una serie di influenze ad opera del partner. Una parte di esse dipende direttamente dalle caratteristiche intrinseche, proprie dell'ospite, e sono quelle discusse nel presente capitolo. L'altra parte è invece semplicemente trasmessa attraverso l'ospite; si tratta di particolari influenze da questo subite, in determinate condizioni ambientali o sperimentali, che ne modificano certe caratteristiche con immediate ripercussioni, come per la categoria precedente, sull'antagonista. Sono quelle discusse nell'VIII, IX e X capitolo. In definitiva appaiono decisamente scarsi i fattori che possono agire in maniera elettiva, indipendente e diretta sugli stadi preimmaginali del parassita.

Questa precisa, costante e ineluttabile dipendenza dei parassitoidi dalle loro vittime non stupisce quando si consideri che tali entomofagi si evolvono a spese di un unico individuo dell'ospite, il quale, pertanto, rappresenta tutto il loro mondo e tutte le risorse cui possono attingere durante lo sviluppo larvale. Tuttavia può accadere che mentre le differenze, tra gruppi di vittime variamente

trattate, finiscono col risultare significative, quelle tra i rispettivi parassiti non lo siano. Così ad esempio, a livello ponderale, col diminuire della taglia dell'ospite tende ad aumentare l'indice di trasferimento, per cui l'entomofago può in parte compensare, con uno sfruttamento più spinto, la scarsità di pabulum di cui dispone.

XIII. INFLUENZE RECIPROCHE TRA I DUE SIMBIONTI ANTAGONISTI A LIVELLO ENDOCRINO

1. Del parassitoide sull'ospite

Effetto iuvenilizzante. È stato riscontrato nel corso di varie sperimentazioni. Quando la parassitizzazione viene effettuata sul penultimo stadio larvale, come di solito è accaduto nel corso delle nostre ricerche, la muta allo stadio successivo viene mediamente ritardata di un giorno, oltre i tre della durata media normale di questa età (Mellini et alii, 1986). Ciò nonostante i tempi di incrisalidamento, sempre per contaminazioni in penultima età, diminuiscono significativamente, sia per i maschi che per le femmine (Dindo, 1982), causa una spiccata tendenza a ridurre la durata dell'ultimo stadio larvale, rispetto agli individui non sottoposti a parassitizzazione.

Cinque anni dopo, Turchetti (1987) non trova invece, per entrambi i sessi dell'ospite, differenze significative nei tempi intercorrenti tra parassitizzazione e incrisalidamento della vittima, nè per contaminazione di larve in sesta età, nè per quelle in settima.

Infine, se l'esposizione alle uova dell'entomofago viene attuata nei confronti di larve estratte dal bozzolo appena formato, l'ospite ritarda l'incrisalidamento di oltre un giorno sui 4 impiegati dal testimone pure sbozzolato, dando così modo al parassita di raggiungere rapidamente la II età, cioè lo stadio che garantisce l'ulteriore accrescimento dell'entomofago nelle crisalidi (Mellini et alii, 1985).

2. Dell'ospite sul parassitoide

Uno di noi (Mellini, 1975 e 1983) ha emesso, e successivamente perfezionato, la cosiddetta ipotesi ormonale, secondo la quale la fisiologia larvale del parassitoide è, in varia misura, dominata, durante la prima e la seconda età iniziale, dal bilancio endocrino dell'ospite. Ora il nostro sistema, imperniato su un parassita larva-pupale obbligato, e quindi a sviluppo strettamente dipendente dall'ospite, bene si presta a ricerche sperimentali sull'argomento.

Nel corso di una prima indagine, si è riusciti a stabilire che la larva di I età del parassitoide compie la muta quando nell'ospite si verifica una scarica di ecdisteroidi, in assenza di ormone giovanile, e quindi in occasione della muta che porta alla formazione della crisalide (Baronio e Senhal, 1980). L'ecdisione agisce direttamente sull'entomofago e non tramite modificazioni biochimiche indotte nell'ospite. Esso, oltre ad attivare la fisiologia dello sviluppo nell'antagoni-

sta, ne modifica il comportamento, inducendone la fuoriuscita dai muscoli delle pareti addominali della vittima e la migrazione nello spazio virtuale compreso tra esuvia dell'ultima età larvale e cuticola della pupa in formazione. Nel prosieguo dell'accrescimento il parassita non subisce, a quanto pare, ulteriori influenze da parte degli ormoni dell'ospite che peraltro, nel giro di qualche giorno, finisce col soccombere.

La parassitizzazione, in fasi sempre più avanzate dell'ultima età larvale, conduce ad una progressiva accelerazione nel ritmo di sviluppo della L_1 endofaga, in concomitanza col variare del bilancio endocrino nella vittima, che si sposta decisamente a favore dell'ecdisione. Così, anche contaminando larve già imbozzolate, la L_1 dell'entomofago riesce in extremis a compiere la muta nella eopupa e quindi a prendere possesso della crisalide che in breve si forma. Tale fenomeno è possibile perchè, accanto all'eccezionalmente rapido ritmo di crescita dell'endofago, in tale contigenza, si verifica un sensibile ritardo nell'impupamento dell'ospite, come si è già riferito nel paragrafo che precede (Mellini et alii, 1985).

Ma l'importanza primaria degli ecdisteroidi della vittima, quali agenti attivatori della crescita e capaci di indurre la prima muta nel parassita, è dimostrata dalle seguenti esperienze. Anzichè contaminare larve di ultima o di penultima età, come si fa nella normale routine e nel corso delle sperimentazioni, si sono somministrate uova a larve ancora più giovani, ovvero le larve contaminate sono state allevate alla temperatura critica di 20° C (che è compatibile con l'accrescimento del parassita ma non dell'ospite), od anche sottoposte a raffreddamento (0° C) per 3 ore all'inizio dell'ultima età, determinando così una muta in soprannumero. Con questi vari accorgimenti si ottiene lo scopo di allungare il periodo di permanenza della L_1 nell'ospite. Orbene, così operando, si è potuto constatare che una certa aliquota (aggirantesi su circa il 50% nelle due ultime condizioni sperimentali, che sono le più favorevoli) di L_1 effettua la muta in occasione del passaggio dell'ospite a larva dell'ultima età, quindi precocemente, sempre in seguito ad una scarica di ecdisteroidi però in contemporanea presenza di ormone giovanile. Poichè in una stessa larva, appena mutata all'ultima età, possono coesistere sia L_1 che L_{II} del parassita, ne consegue che le diverse L_1 sono variamente sensibili agli stessi stimoli; il fatto che in condizioni naturali la maggioranza di esse compia, in ogni caso, la muta nella eopupa garantisce la sopravvivenza dell'entomofago poichè le sue L_{II} , spesso insinuatesi tra le due cuticole larvali, non sono in grado, in un ospite ancora allo stato di larva, di indurre la formazione di un regolare imbuto respiratorio e vengono rigettate in fase di ecdisi assieme all'esuvia dell'ospite (Fanti et alii, 1987).

Del resto il concetto che l'ecdisione eserciti un effetto stimolante la crescita delle giovanissime larve del parassita era già stato generalizzato da Mellini (1983) e poi, ancora una volta, dimostrato sperimentalmente da Mellini et alii (1986), avendo essi riscontrato un deciso incremento ponderale delle L_1 in occasione della muta dell'ospite da penultima ad ultima età larvale. Poichè, d'altro canto, le L_1 endofaghe hanno, ciascuna, un peculiare ritmo di accrescimento, si

può supporre che passino in II età solo quelle che, in occasione della muta larva-larvale dell'ospite, hanno già raggiunto dimensioni critiche, oltre le quali un appropriato stimolo ne può indurre la muta.

Fanti e Bratti (1988), oltre a confermare i dati precedenti, precisano il destino delle larvette endofaghe mutate precocemente in II età. Una parte segue il normale iter comportamentale, fuoriuscendo dai muscoli e trasferendosi nello spazio esuviale dell'ospite, proprio come avviene in occasione dell'apolisi pupale. Un'altra parte, invece, permane nei muscoli ovvero ne fuoriesce senza però portarsi a livello del tegumento; anche queste finiscono con l'andare perdute, non riuscendo a mettersi in contatto con l'aria atmosferica o quella tracheale della vittima. È dubbio che qualcuna riesca a sopravvivere e a prendere possesso della crisalide.

Lo studio delle influenze ormonali, esercitate dall'ospite sul suo antagonista, resta enormemente facilitato allevando quest'ultimo su diete artificiali, e cioè su un substrato trofico eccezionalmente semplificato. È quanto ha fatto Fanti (1990). Egli ha impiegato L_1 prelevate da larve dell'ultima età dell'ospite circa 3 giorni dopo la contaminazione. Le larvette sono state trasferite: a) su omogeneizzato di crisalidi formatesi da non oltre 48 ore, b) su omogeneizzato di larve al IV giorno dell'ultima età, c) su dieta chimicamente definita formulata da Nettles (1986), d) ovvero iniettate in addomi «legati» di larve di ultima età. Mentre nella prima tesi le L_1 hanno, dopo qualche giorno, compiuto la muta, nelle altre tre le larvette, pure mantenendosi vitali anche per circa 2 mesi, e crescendo persino in modo abnorme, non sono riuscite a passare in II età. È stato però sufficiente un trattamento topico dell'ospite o del parassita, ovvero un trattamento per os di quest'ultimo, sempre con ecdisonici, per indurre la muta dell'endofago. Tutto ciò induce a confermare che l'effetto ormonale, esercitato sul parassitoide, sia diretto e non mediato da trasformazioni biochimiche indotte dall'ecdisona nell'ospite.

In relazione a quest'ultimo punto, sono state programmate ricerche intese a verificare, mediante l'uso di prodotti marcati ad azione ormonale, se la larvetta endofaga assuma ed utilizzi direttamente gli ormoni presenti nel lacunoma dell'ospite.

XIV. PROVE DI ALLEVAMENTO DEL PARASSITOIDE SU DIETE ARTIFICIALI

Come per tutti gli altri settori della entomoparassitologia, anche il tema dell'allevamento in vitro degli insetti entomofagi ha avuto come oggetto preferenziale gli Imenotteri Apocriti.

Per quanto concerne i Larvevoridi sono state finora allevate con successo soltanto 2 specie, entrambe a sviluppo indipendente da quello delle vittime, e quindi non strettamente legate da vincoli fisiologici con i partner, sempre soccombenti come larve in età più o meno avanzata in rapporto al momento della contaminazione.

Il caso di *P. rufifrons* è assai più complesso, trattandosi di parassita a fisio-

logia strettamente integrata con quella dell'ospite, e per la quale l'accrescimento larvale, oltre la prima età, può procedere soltanto in seguito a stimolazioni di ordine endocrino, provenienti dalla vittima in occasione delle mute ed in particolare di quella pupale.

Le prime prove sono state impostate allo scopo di accertare se il nostro «s sofisticato» parassitoide larva-pupale è in grado di svilupparsi fuori dall'ambiente vivente. A tale fine è stata utilizzata una dieta subnaturale, rappresentata da un omogeneizzato in toto di crisalidi di età non superiore alle 48 ore, per garantire la presenza di un titolo ancora assai elevato di ecdisteroidi. Esse sono state immerse in acqua a 60° C per circa un quarto d'ora, al fine di disattivare gli enzimi responsabili dell'imbrunimento dell'emolinfa e degli altri tessuti, e quindi schiacciate entro una siringa sterile. Al denso liquido così ottenuto è stato addizionato solfato di gentamicina, per ostacolare lo sviluppo di colonie batteriche; quindi il pabulum è stato agarizzato per impedire l'affondamento, e di conseguenza l'affogamento, delle larve dalla II età in poi. Anche in considerazione del fatto che *Pseudogonia* è un parassita solitario, le larvette sono state distribuite singolarmente nei vari pozzetti di piastre sterili, sempre operando sotto cappa sterile a flusso laminare, per realizzare le condizioni di massima asepsi, e a temperature di 24-25° C. Nella esperienza sono state impiegate larvette variamente sviluppate, ottenendo i seguenti risultati.

Le larve neogusciate per centrifugazione hanno aumentato una trentina di volte il peso iniziale senza però riuscire a compiere la muta.

Le larve di I età, prelevate dai muscoli di larve nell'ultimo stadio, 4 giorni dopo l'ingestione delle uova microtipiche, sono passate in grande maggioranza in II età, ma solo aliquote modeste hanno raggiunto gli stadi successivi fino a quello adulto.

Le larve di II età iniziale prelevate dalle eopupe, tra le due cuticole, hanno dato risultati assai simili a quelli ottenuti con le L₁ intramuscolari, fino a lasciare sfarfallare qualche adulto parimenti vitale (Bratti e Monti, 1988).

Questa prima esperienza ha dunque dimostrato: I) che il nostro Larvevoride, nonostante i complessi rapporti fisiologici con l'ospite, può svilupparsi su un substrato privo di vita; II) che è indispensabile addizionare un antibiotico (solfato di gentamicina) all'omogeneizzato, altrimenti le larvette soccombono in tempi brevi, in seguito al rapido diffondersi nel pabulum di colonie batteriche; fra l'altro, si tenga presente che il canale alimentare delle crisalidi, anch'esso schiacciato nella preparazione dell'omogeneizzato, è fortemente inquinato da questi microrganismi.

In una seconda esperienza si sono provati estratti di omogeneizzato di crisalidi di *Galleria* nonché diete meridiche. Il primo è ottenuto per centrifugazione dell'omogeneizzato e successiva sterilizzazione mediante filtrazione; è costituito in prevalenza da emolinfa. Le seconde sono composte da una base olidica, formulata da Nettles (1986) per un altro Larvevoride, cui vengono addizionati prodotti di basso costo, ricchi di sostanze proteiche, quali farina di soia, caseina ecc. Per agevolare la respirazione delle larvette parassite, il substrato trofico

liquido è stato agarizzato ovvero, in alternativa, imbevuto in minuti batuffoli di cotone idrofilo. In ogni caso si è mantenuta, al solito, una rigorosa asepsi sterilizzando materiali e strumenti in autoclave, manipolando il materiale biologico in camera sterile, aggiungendo solfato di gentamicina alla dieta, disinfettando le larvette in soluzioni di formalina. Come per la prova precedente, si sono impiegate larve neonate, fatte sgusciare artificialmente, larve di I età estratte dopo una permanenza di circa 3 giorni negli ospiti naturali, e larve di II età iniziale prelevate dalle eopupe.

Le larve neonate, poste in «emolinfa» e nelle diete meridiche, riescono a compiere la muta solo in esigua percentuale; oltre non procedono soprattutto a causa, a quanto pare, della forte carica microbica veicolata dalle uova estratte dall'utero di femmine morte del parassita.

Le L_I prelevate mediante dissezione dalle larve di ultima età, e trasferite in substrati meridici, ben raramente riescono a compiere la muta, causa la mancanza di ecdisteroidi, come dimostrato da Fanti (1990).

Le L_{II} iniziali, su dieta meridica, sono passate ad L_{III} solo in piccola parte ed una soltanto ha formato il pupario.

Per quanto riguarda la struttura portante la dieta liquida, non vi sono differenze significative tra i risultati ottenuti con agar e quelli con cotone.

Si conclude infine che la dieta di Nettles, mostratasi soddisfacente per un'altra specie di Larvevoride, è per la nostra *Pseudogonia* del tutto inadeguata, anche se integrata con materiali proteici di varia natura e provenienza (Bratti, 1989).

Nel tentativo di confezionare una dieta di basso costo, si è pensato di saggiare l'idoneità del siero bovino, disponibile in enormi quantità e per di più a prezzi pressochè irrisori. L'idea di utilizzare simile substrato ci è sorta considerando, da un lato, la stretta affinità dei Larvevoridi con le altre famiglie facenti parte della stessa superfamiglia Oestroidea che comprende numerose forme agenti abituali di miasi nei Mammiferi, e dall'altro, analizzando le segnalazioni, peraltro rare, di Larvevoridi che hanno occasionalmente determinato miasi nell'uomo (Mellini, 1991).

Si è così allestito un pabulum formato per circa l'80% da siero e per circa il 20% da «estratto» di crisalidi, con l'aggiunta, in piccole dosi, di una mistura di aminoacidi, di trealosio e di tuorlo d'uovo, allo scopo di integrare soprattutto il contenuto in glucidi e lipidi, che sono estremamente deficitari nell'ingrediente di base. Per consentire gli scambi gassosi alle larve, nei pozzetti in piastra sterile sono stati versati quantitativi minimi di pabulum (15 µl), ripetuti al bisogno, tali da consentire alla larva di emergere con gli spiracoli dell'ultimo urite, maggiormente impegnati nella respirazione. In seguito si è preferito agarizzare la dieta liquida e somministrarla in quantità più che sufficienti per l'intero sviluppo dell'entomofago. Su tali substrati sono state messe in allevamento larvette negli stadi sopraindicati. Finora si sono ottenute numerose larve della III età e vari pupari in cui l'adulto si è completamente formato senza peraltro sfarfallare. Le ricerche proseguono anche in considerazione del fatto che le nostre

sono le prime diete veramente economiche finora proposte (Mellini e Campadelli, dati non ancora pubblicati).

RIASSUNTO

Impiegando questo sistema sperimentale sono stati affrontati, in campo teorico, vari dei principali problemi del parassitoidismo, nonché, in campo pratico, perfezionate le tecniche per incrementare le rese nella produzione del parassita.

L'ospite *Galleria* è stato scelto perchè classico insetto da laboratorio, impiegato in disparate ricerche di fisiologia, e ospite di sostituzione per numerosi parassitoidi. Il parassita *Pseudogonia* è stato assunto perchè rivelatosi, fra le varie specie di Larvevoridi da noi saggiate, quella meglio adattabile alla suddetta vittima, ed inoltre per le sue modalità di contaminazione attuata mediante uova microtipiche, del tutto idonee per la parassitizzazione artificiale. Poichè le conoscenze su questa specie si riducevano soltanto alla indicazione di alcuni ospiti, rappresentati da Lepidotteri Nottuidi, si è dovuto, come primo atto, studiarne, sia pure a grandi linee, la biologia.

In seguito si è passati a migliorare le qualità di *Galleria* in quanto ospite, eliminando, attraverso processi di selezione, la spiccata tendenza delle larve mature ad entrare in diapausa, ed incrementandone, mediante vari accorgimenti, i pesi per avvicinarli a quelli degli ospiti naturali. Al fine di ridurre la forte eterogeneità nello sviluppo larvale, si sono studiate, fra l'altro, le variazioni nei parametri biologici della prole in funzione dell'età della madre, giungendo alla conclusione che conviene utilizzare soltanto le uova emesse nei primi due giorni, che, oltretutto, rappresentano i due terzi dell'intero quantitativo deposto nel corso della decina di giorni di vita delle femmine. Inoltre, poichè uno dei dati più frequentemente rilevati è il peso delle crisalidi, si è provveduto a misurarne il decremento ponderale giornaliero subito dal momento della loro formazione allo sfarfallamento degli adulti ovvero fino all'impupamento dell'antagonista se parassitizzate. Considerato poi che, a spese di *Galleria*, sono state finora allevate con successo oltre una settantina di nuove specie di parassitoidi (circa una cinquantina di Imenotteri Terebranti ed oltre una ventina di Ditteri Larvevoridi), si sono discusse le cause della sua eccezionale disponibilità a fungere come ospite di sostituzione, facendole risalire, almeno in parte, alla dieta artificiale con cui vengono nutrite le larve.

Ma la grande maggioranza delle ricerche si sono impemiate su *Pseudogonia* ed i suoi rapporti con la vittima.

Visto che nelle femmine l'ovidotto comune si trasforma in un lungo utero avvolto a spirale, contenente migliaia di uova in incubazione, e che le ghiandole accessorie sboccano in esso all'estremità opposta del gonotrema, ci si è chiesto in quale modo le uova potessero essere incollate tanto tenacemente alle foglie. Si è così veduto che l'uovo stesso è dotato di un eccezionale apparato di fissazione, costituito dal corion ventrale pianeggiante che, a differenza di quello dorsale, convesso e rigido ma sottile, è molle, spesso e colloso. Per impedire il reciproco incollamento delle uova immagazzinate nell'utero, tali apparati vengono momentaneamente neutralizzati da un secreto elaborato da grosse cellule ghiandolari disposte attorno all'epitelio di questo stesso organo.

L'ovideposizione avviene esclusivamente durante la fotofase, nel cui ambito ha un costante andamento parabolico, anche se il numero delle uova emesse ogni giorno decresce rapidamente con l'invecchiamento delle femmine.

Premesso che nell'uovo, al momento della deposizione, l'embriogenesi è generalmente completata, è di grande interesse conoscere per quanto tempo le larvette si mantengano vitali entro i suoi involucri. Si è così accertato che, a 20-22°C, le percentuali di schiusa sono ancora apprezzabili dopo una ventina di giorni, mentre a 4°C la conservabilità quasi si triplica. Ciò ha consentito la formazione di una banca di uova, in costante rinnovamento, cui ricorrere secondo necessità.

Una fase di importanza basilare, per l'allevamento del parassitoide, è la contaminazione del-

l'ospite in laboratorio. La tecnica inizialmente adottata è stata quella di somministrare alle larve, di solito negli ultimi due stadi, masserelle di dieta artificiale, appositamente inquinata con uova microtipiche, prelevate dall'utero di femmine morte da non più di 24 ore. Questo metodo grossolano, incompatibile con la sperimentazione, è stato ben presto sostituito con quello degli zimbelli. Accertate, con modellini di carta, le caratteristiche del substrato preferite dalle femmine per l'ovideposizione, sono state confezionate e adeguatamente collocate nelle gabbie foglioline di cera, materiale questo abbastanza appetito dalle larve. Su tali zimbelli vengono deposte, elettivamente, le uova lungo piste subperiferiche fittamente stipate.

Un'approfondita ricerca ha dimostrato che i fattori inducenti la schiusa delle uova, dopo la loro ingestione, sono essenzialmente di ordine chimico e riferibili all'azione degli enzimi, in particolare pepsina e tripsina. Tuttavia, volendo disporre di larve neonate in grande numero e in tempi brevissimi, conviene sottoporre le uova, immerse in acqua, alla forza centrifuga, per una decina di secondi ad una velocità di rotazione di 1000 giri al minuto. È anche possibile utilizzare uova, non completamente embrionate, di femmine morte da non oltre le 24 ore, sottoponendole ad incubazione extrauterina in soluzione fisiologica per qualche giorno, realizzando così il recupero di quantità notevoli di materiale biologico.

Una volta parassitizzate, le larve debbono essere rifornite di quantitativi di dieta ben superiori alle loro necessità, per consentire una certa diluizione degli escrementi che, sebbene solidi e pressochè anidri, sono risultati nocivi. Parimenti da evitare è la manipolazione delle larve, che porta ad uno scadimento generale dei parametri biologici, sia a livello ponderale che di sopravvivenza, particolarmente se effettuata su larve di ultima età. Tali effetti, puntualmente, si ripercuotono in modo negativo sul parassita.

I fattori che influiscono sulle percentuali di parassitizzazione sono numerosi e di varia natura. Innanzitutto il numero di uova pro capite, che peraltro non deve eccedere per non provocare la morte prematura dell'ospite e, di conseguenza, una caduta nella resa dei parassiti. Segue il livello di dispersione delle uova sugli zimbelli; infatti più esso è elevato, maggiori sono le probabilità che gran parte o tutte le larve coinquiline possano ingerirne qualcuna rimanendo infestate. Comunque la tecnica migliore resta quella di procedere ad una contaminazione individuale, isolando le larve singolarmente, ciascuna con la propria razione di uova. Per l'aggravio di lavoro richiesto, essa è però riservata a indagini di carattere sperimentale. Importante è anche l'età delle uova. Le «migliori» sono quelle deposte da 2 giorni: prima non tutte schiudono, dopo si verifica un graduale, seppure lento, calo nella vitalità delle larvette contenute entro gli involucri ovulari.

Nei casi di parassitizzazione collettiva, al fine di migliorare la distribuzione delle uova tra le larve coinquiline, e di conseguenza innalzare il tasso di parassitizzazione, può essere utile aumentare l'appetibilità degli zimbelli di cera immergendoli, ad ovideposizione avvenuta, in soluzioni di miele.

Una volta insediatesi nei muscoli, il ritmo di accrescimento delle larvette endofaghe è largamente influenzato dallo stadio dell'ospite, risultando massimo se la penetrazione ha interessato larve pressochè mature. In ogni caso il ritmo dipende anche da caratteristiche proprie dei singoli parassiti, com'è dimostrato dalle notevoli variazioni ponderali delle L_1 coinquiline in vittime sottoposte a superparassitizzazione una tantum.

La distribuzione delle L_1 intramuscolari, nei vari segmenti del corpo dell'ospite, non sembra regolata da particolari fattori, ma rispecchia, grosso modo, la localizzazione dei loro punti di fuoriuscita dal canale alimentare. La distribuzione delle L_{II} , nello spazio esuviale, cambia nel corso della decina di ore di durata della fase eopupale, dato che le larvette tendono a migrare sia in direzione cefalica che caudale, anche se quest'ultima posizione le compromette irrimediabilmente, favorendone l'espulsione assieme all'esuvia della vittima in fase di ecdisi.

Le larve, com'è regola tra gli endofagi, non defecano durante l'accrescimento. In quelle della III età, il deflusso del materiale intestinale verso l'esterno è impedito da un cospicuo tampone di cellule epiteliali, che ostruisce completamente la valvola pilorica, nonchè dal grande turgore dell'epitelio, nel tratto terminale del proctodeo, che ne rende puramente virtuale il lume e l'apertura anale.

Per quanto concerne l'azione dei fattori ambientali sul sistema, è stata presa in considerazione, in primo luogo, la temperatura. Essa non è solo determinante per la rapidità dei cicli, ma influisce altresì sulla qualità dei due simbionti. Peraltro i loro livelli termici ottimali sono diversi: 35° C per *Galleria* e 27° C per *Pseudogonia*. In laboratorio, al fine di conciliare le differenti esigenze, le larve parassitizzate sono allevate a 30° C, ma poi le relative crisalidi sono trasferite in cella a 27° C, per evitare una flessione nella resa in pupari.

L'esposizione a basse temperature (4° C), mentre è utile per la conservazione delle uova dell'entomofago, è del tutto negativa per le larve della vittima: con un raffreddamento protratto, per soli 4 giorni, si dimezzano le percentuali di incrisalidamento e si riducono quelle di parassitizzazione sulle crisalidi superstiti.

La densità di popolazione favorisce l'ospite permettendone, entro certi limiti, un progressivo incremento ponderale e un più alto tasso d'incrisalidamento; tutto ciò va a vantaggio del parassita che migliora, rispettivamente, la resa qualitativa e quella quantitativa. I benefici ricavati dall'ospite, a densità relativamente elevate, non dipendono da effetti di gruppo ma da un rialzo termico, nel contenitore, di alcuni gradi rispetto alla cella climatizzata; esso peraltro si riduce gradatamente, fino a livellarsi con la temperatura ambiente al raggiungimento della maturità larvale.

Il fotoperiodo più favorevole a *Galleria*, in concordanza con il suo ambiente naturale di vita, è, in realtà, rappresentato da una scotofase permanente; in tale situazione essa raggiunge pesi superiori in tempi significativamente minori, rispetto alle altre condizioni fotoperiodiche sperimentate, con le immancabili ripercussioni positive sull'antagonista. Quest'ultimo però, almeno dallo sfarfallamento in poi, deve essere allevato col solito fotoperiodo 16:8, che consente una normale attività trofica e sessuale, seguita da ovideposizione e regolare schiusura delle uova una volta che siano ingerite dall'ospite.

Con riferimento al pabulum, vengono indicati i quantitativi necessari per un normale accrescimento delle larve di *Galleria*; eventuali carenze si traducono in pesi minori e in tempi di sviluppo più lunghi, soprattutto per le femmine che, essendo le più esigenti, sono anche le più sensibili. Particolarmente nocivi risultano i periodi di digiuno, pure se di breve durata e seguiti da un abbondante approvvigionamento; non solo restano allungati i tempi per giungere all'impupamento, ma si incrementa la mortalità larvale ed inoltre il peso delle crisalidi resta significativamente sotto la norma. La qualità della dieta, propinata all'ospite, può apparentemente non influire su di esso, ma influenzare indirettamente il parassita. L'aggiunta di farina integrale di soia, infatti, può portare ad un incremento ponderale delle pupe dell'entomofago, senza modificare quello della vittima. La cera, poi, si è rivelata un ingrediente necessario; volendola eliminare, in quanto componente più costoso della dieta, si sono rilevati cali di peso nelle crisalidi e nel tasso di impupamento. Regolarmente queste modificazioni si riflettono sul parassita, nella medesima direzione e con la stessa intensità.

Sono stati studiati anche gli effetti dell'applicazione, per contatto e per os, di alcuni iuvenoidi (triprene, idroprene, metoprene, e un derivato del benzossatiolo) su vari stadi di sviluppo dell'ospite. Su larve all'inizio dell'ultima età provocano un prolungamento, anche notevole, della vita larvale, che almeno inizialmente si mantiene attiva, un incremento ponderale delle crisalidi e un aumento della mortalità. Gli effetti sul parassita sono quasi esclusivamente indiretti, e cioè mediati da quelli verificatisi nella vittima. Comunque i mimetici dell'ormone giovanile sono apparso selettivi verso gli stadi preimmaginali dell'endofago, com'è inequivocabilmente dimostrato nei casi di applicazione sulle eopupe; mentre, infatti, nelle tesi non parassitizzate gli ospiti soccombono tutti allo stadio di crisalide, in quelle contaminate i parassiti sfarfallano normalmente.

Fra gli antiormoni giovanili è stato saggiato il fluoromevalonato. Applicato topicamente in penultima età larvale, oltre a nanizzare l'ospite, induce varie anomalie nel suo sviluppo, fra cui la formazione di intermedi larva-pupa, ed un leggero aumento della mortalità larvale. Corrispondentemente il parassita subisce un calo ponderale e nella resa in pupari. Comunque, anche in questo caso, gli effetti delle molecole biologicamente attive sono, sull'endofago, esclusivamente indiretti, cioè derivati dalle vittime trattate.

Infine applicazioni topiche dirette, ovvero orali, di ecdisteroidi sono risultate indispensabili per la muta delle larve endofaghe di I età, qualora allevate su diete artificiali prive di materiali provenienti dall'ospite.

Tra gli effetti normalmente indotti dal parassita nell'ospite sono stati costatati: a) una prematura mortalità larvale, per parassitizzazioni collettive, specialmente su stadi precedenti l'ultima età e con dosi di uova medio-alte; b) un incremento nella formazione di crisalidi farate, inidonee per lo sviluppo del parassitoide; c) un'intensificazione significativa delle tendenze cannibalistiche esibite dalle larve dell'ospite a scapito delle crisalidi; tale adelfofagia è apparsa più accentuata con l'aumentare del carico di uova e qualora la contaminazione sia condotta su larve in età giovanile; si esalta inoltre se la popolazione parassitizzata viene sottoposta a periodi di digiuno; d) modesta influenza sui pesi finali delle crisalidi, chiaramente evidente, in senso negativo, solo per carichi parassitari elevati.

Un'analisi della mortalità complessiva dell'ospite, causata dall'antagonista, ha portato ad una constatazione sorprendente: il tasso è infatti risultato 2-3 volte superiore a quello della sola parassitizzazione, calcolata in base al rapporto numerico pupari/crisalidi.

Gli effetti indotti dall'ospite sul parassita sono stati rilevati da varie angolazioni:

I) In funzione dello stadio contaminato; essi riguardano: a) la durata dello sviluppo larvale, che è tanto più breve quanto più avanzato è lo stadio contaminato; b) il peso, che diminuisce di concerto col parametro precedente; c) il tasso di parassitizzazione che invece cresce con l'avanzare dello stadio contaminato; nell'ambito dell'ultima età si verifica, però, una flessione progressiva con l'avvicinarsi della maturità.

II) In funzione del sesso; essi coinvolgono: a) innanzitutto il peso dei pupari, che in crisalidi femminili è di circa il 30% maggiore; b) le percentuali di parassitizzazione, che sono significativamente più alte nelle femmine; c) la sex ratio che, largamente a favore dei maschi in vittime dello stesso sesso, arriva a sfiorare il rapporto 1:1 in quelle femminili. La decisa superiorità degli ospiti femminili non è imputabile soltanto al maggior peso, ma altresì a loro qualità fisiologiche peculiari.

III) In funzione della mole, che condiziona largamente il peso del parassita, anche se tale parametro non dipende esclusivamente dalla massa della vittima, in cui l'endofago si è sviluppato, ma anche da proprie capacità intrinseche di crescita, com'è dimostrato dal variare dell'indice di trasferimento (rapporto ponderale tra pupario e crisalide) tra le varie coppie, a parità di sesso e di peso delle vittime.

Il potenziale di accrescimento del parassita è stato saggiato in classi ponderali dell'ospite progressivamente crescenti; il peso dei pupari continua ad aumentare in crisalidi di mole sempre maggiore, però in misura proporzionale solo fino alla classe attorno ai 200 mg (dopo, l'indice di trasferimento si flette progressivamente), rivelando pertanto che *Galleria*, poichè ha pesi medi inferiori, è in realtà un ospite sottodimensionato per *Pseudogonia*.

In riguardo alle influenze reciproche tra i due simbiotici a livello endocrino, sembra che la L_1 del parassita eserciti un effetto iuvenilizzante, provocando un ritardo nella muta dello stadio che ha subito la contaminazione. Più vistose sono le influenze esercitate dall'ospite sul parassita; si è dimostrato infatti che quest'ultimo, per passare alla II età larvale, deve essere stimolato dagli eventi fisiologici che condizionano la muta dell'ospite; peraltro la sensibilità delle L_1 agli ecdisteroidi esogeni, varia, anche in relazione al loro ritmo di accrescimento, a livello individuale. Così per contaminazioni in stadi precoci, o con valori termici che consentano la crescita del parassita ma non quella dell'ospite, una certa aliquota di L_1 può entrare in II età precocemente e cioè in occasione di una semplice muta larvale della vittima. Resta tuttavia una parte di L_1 che compie la muta solo nella eopupa, garantendo così la sopravvivenza del parassita che soltanto entro la crisalide può procedere nello sviluppo.

Sono state compiute anche prove per allevare *Pseudogonia* su diete artificiali, tenendo conto che, trattandosi di parassita larva-pupale obbligato, la sua fisiologia in I e II età iniziale è strettamente dipendente dalla vittima. Le prime ricerche, effettuate su dieta subnaturale, hanno indicato

che l'entomofago è in grado di svilupparsi fuori dall'ambiente vivente. In seguito si sono allevate larve neonate (fatte sgusciare mediante centrifugazione), L_1 intramuscolari a vario sviluppo (estratte da larve ospiti in ultima età) e L_{11} intercuticolari (prelevate da eopupe) su omogeneizzato di crisalidi, su diete meridiche e olidiche, su siero bovino integrato da emolinfa dell'ospite e da piccole quantità di glucidi e lipidi, ottenendo una crescita più o meno cospicua, secondo il tipo di dieta e lo stadio impiegato, e giungendo, in certi casi, fino allo sfarfallamento di qualche adulto. Condizioni indispensabili per il successo sono una rigorosa asepsi, la presenza di ecdisteroidi nel pabulum delle L_1 nonché la possibilità per le L_{11} e le L_{111} , che sono anfipneustiche, di mettere gli stigmi posteriori in comunicazione con l'aria; ciò è ottenuto imbibendo la dieta liquida in cotone idrofilo, ovvero gelificandola con agar o con gelatine di origine animale.

The Host-Parasite System *Galleria mellonella* L.- *Pseudogonia rufifrons* Wied.: A Decade's Research and Findings

SUMMARY

This experimental system was developed to study a number of the main theoretical issues related to parasitoidism as well as to improve practical rearing techniques designed to increase parasite production. *Galleria* was selected both because of its proven laboratory usefulness in a range of physiology studies and because it is a factitious host for numerous parasitoids. The choice of *Pseudogonia* was dictated on the other hand because it was the most compatible to *Galleria* of the Tachinids we tested; moreover its modes of contamination via microtype eggs proved highly suitable to artificial parasitization. As the literature on this species is limited to but a few hosts among Noctuid Lepidoptera, it was first necessary to examine, albeit in broad outline, the parasite's biology.

The next step was to upgrade the properties of *Galleria* as a host by eliminating through selection the marked tendency of mature larvae to diapause and by increasing their weight until it approached that of natural hosts. One of the approaches taken in seeking to reduce the pronounced irregularity of larval development concerned the variations in the biological parameters of progeny in relation to the mother's age. The inferences drawn from the resulting data suggested that it was better to use only the eggs laid over the first two days, which comprise two-thirds of the total deposited throughout the females' ten-day life span. As the most frequent parameter recorded in experimental studies is chrysalis weight, we measured its daily weight decrease from pupation to adult emergence. Moreover, the fact that thus far more than seventy new parasitoid species (about fifty Hymenoptera Terebrantia and over twenty Diptera Tachinidae) have been successfully reared at the expense of *Galleria*, the reasons for its exceptional willingness to act as factitious host are discussed, being in part ascribed to the artificial diet on which it is reared.

Yet most of the reasearch concerned *Pseudogonia* and its relationship to the host. Given that in this species the common oviduct is transformed into a long spiral-shaped uterus containing thousands of incubating eggs, and that the accessory glands run into it from the end opposite the genital opening, we wondered how the eggs could become so tenaciously fixed to the leaves. It was discovered that each egg has an extraordinary attachment apparatus featuring a flat ventral chorion which, unlike the convex, rigid but thin dorsal one, is soft, thick and gluey. To prevent the eggs sticking to each other in the uterus, the system is momentarily neutralized by a secretion from the large glandular cells arranged about the epithelium of this organ.

Egg-laying occurs only during the photophase, exhibiting a parabolic curve even though the number of eggs deposited daily decreases rapidly as the female ages.

Whereas embryogenesis within the egg is usually complete by oviposition, an important concern is how long the larvae remain vital in the egg-shells. It was found that at 20-22°C the

percentage of hatchings was still appreciable after twenty days or so, while at 4°C their storage life almost tripled. This led to the formation of a continuously renewable 'egg bank' which could be resorted to whenever necessary.

One fundamentally crucial step in parasitoid rearing is host contamination in laboratory. We initially employed the technique of giving the larvae usually in the last two stages small amounts of artificial pabulum deliberately contaminated with microtype eggs taken from the uterus of lately dead females. This rather awkward method was found to be incompatible with experimental procedures and was soon replaced by the decoy approach. Here, once the egg-laying characteristics preferred by the females were ascertained using paper models, small leaves of wax, a material found to be fairly appealing to the larvae's appetite, were fashioned and placed in the cages. The eggs were then laid, electively and densely clustered, on them in sub-periferal grooves.

Detailed analyses showed that the factors most conducive to hatching after egg ingestion were essentially of a chemical nature, being traceable to the action of enzymes, especially pepsin and tripsin. However, as we wanted to have newly hatched larvae quickly, it proved more effective to centrifuge the water-immersed eggs for about ten seconds at 1000 rpm.

Another way to procure a notable supply of biological material is to use incompletely embryonated eggs from females not more than 24 hours dead by subjecting them to extra - uterine incubation in saline solution for some days.

Once parasitized, the larvae have to be supplied with amounts of diet far greater than necessary so as to enable a certain dilution of the feces, which were found to be harmful. Similarly, handling of the larvae is to be avoided, especially in regard to the last-instar larva, for it results in an overall decline of the biological parameters, especially pupal weight and survival. These effects in turn have negative repercussions on the parasite.

The factors influencing the parasitization rate are numerous and of diverse nature. Of primary importance is the number of eggs per larva; nevertheless if excessive, it can cause the premature death of the host and, consequently, a drop in parasite pupal yield. Next is egg distribution on the decoys: the greater the extent of spread, the better the chances that most or all of the larvae will ingest them and become infested. The best method is, of course, individual contamination by isolating the larvae one at a time, each with its own egg ration. Yet the amount of work required is such that this approach is only feasible in experimental investigations.

Egg age is another crucial parameter. The best are the two day-old eggs: prior to that time not all the eggs hatch and thereafter a slow yet gradual drop in vitality of the maggots inside the egg-shells sets in. To improve egg distribution over the assembled larvae with collective parasitization methods, and thus to raise the parasitization rate itself, it may prove useful to enhance the appeal of the decoys by dipping them after egg-laying in honey solution.

Once the first-instar larvae are established in the muscles, their rate of growth is largely dependent on the host's stage, the maximum results coinciding with penetration of practically mature larvae. Obviously it depends too on the individual traits of the parasite, as shown by the marked weight variations of L_1 (first-instar larvae) in victims superparasitized at the same time.

The distribution of the 'intramuscular' L_1 throughout the host's body segments does not appear to be controlled by any particular factors; it roughly coincides with outlets along the alimentary canal. L_{II} (second-instar larvae) distribution in the exuvial space changes over the approximately ten-hour duration of the eopupal stage: the L_{II} tend to migrate towards both the cephalic and caudal extremities, although the latter direction irremediably compromises them by facilitating their expulsion along with the victim's exuvia.

As is to the custom of endoparasitic larvae, the maggots do not defecate during growth. In third-instar larvae defecation is impeded by a buffer of epithelial cells, which completely obstructs the piloric valve, as well as by the swelling of the epithelium in the posterior tract of the proctodæum, which renders inactive the lumen and anal aperture.

Of the environmental factors affecting the system temperature was the first to be considered.

Not only does it determine the speed of life cycles but it also affects the quality of the partners. The latter differ as to optimum temperature: 35°C for *Galleria* and 27°C for *Pseudogonia*. In laboratory these conflicting demands are mediated by rearing the parasitized larvae at 30°C whereas, to prevent a drop in parasite pupal yield, the parasitised chrysalises are kept in a chamber at 27°C.

Although exposure to low temperature (4°C) is useful in storing the parasitoid eggs, it adversely affects the host larvae: a mere four-day cold storage cut pupation by one-half and notably decreased the parasitization rate of the surviving chrysalises.

Population density benefits the host by affording it within certain limits a progressive weight increase and a higher pupation rate. All of this works to the advantage of the parasite too, which improves both qualitatively and quantitatively. The benefits accruing to the host at relatively high densities do not depend on group effects but on the several degrees' higher temperature in the container than in the climatized chamber (though it gradually falls until reaching room temperature at larval maturity).

For *Galleria* the best photoperiod matching its natural environment, is permanent darkness. It enabled the host to attain higher weight in significantly shorter time than other photoperiods tested, with the inevitable positive repercussions on the parasite. The latter, however, is to be reared at least from emergence on at the usual 16:8 h photoperiod so as to ensure normal trophic and sexual activity followed by oviposition and the normal hatching of the eggs after ingestion by the host.

Host diet too is discussed. Indications include the amounts required for proper growth of *Galleria* larvae, for nutritional deficits lead to lower weight and longer development time. This is especially true for the females which, being more demanding, are also more susceptible to unbalanced diet. Particularly harmful are periods of starvation, even if short and followed by plentiful supply, for not only do they result in delayed pupation but also in higher larval mortality rates as well as significantly lower pupal weights.

The quality of the diet fed to the host may have no direct apparent effect on it yet indirectly influences the parasite. The addition of whole-soybean meal can indeed increase the weight of the parasite's pupae without altering the host's. Wax was found to be a necessary ingredient, and its elimination for reasons of cost resulted in a decline of chrysalis weight and the pupation rate. These alterations were promptly registered by the parasite, both in the same direction and to the same extent.

Also investigated were the effects of treatments with juvenoids (triprene, hydroprene, methoprene and a benzoxathiol derivate), applied either topically or by ingestion, on host developmental stages. In last-instar larvae they induce a prolongation, sometimes considerable, of larval life, which at least initially remains active, as well as an increase in pupal weight and in mortality rate. The effects on the parasite are almost wholly indirect, i.e. mediated by those on the host. At any rate the juvenile hormone mimics appeared selective towards the larval stages of the parasite, as is unequivocally shown by treatments of the eopupae. Here the hosts in the non-parasitized control all died as pupae whereas in the contaminated groups parasite emergence was normal.

Fluoromevalonate was the one anti-juvenile hormone tested. Applied topically at the penultimate larval stage, it had a dwarfing effect on the host and induced both anomalies in its development, including the formation of larval-pupal intermediates, and a slight increase in larval mortality. Correspondingly, the parasite registered a decline in both weight and pupal yield. Here, again, the effects of the biologically active molecules on the parasite are wholly indirect, deriving solely from the treated host.

The effects normally induced in the host by the parasite included: a) larval premature mortality resulting from collective parasitization, especially on stages preceding the last instar and at medium-high egg concentrations; b) increase in the number of pharate pupae, unsuitable for parasitoid development; c) a significantly greater trend towards cannibalism of the host larvae at the

expense of the pupae; this intraspecific predation appeared more marked as the egg load increased and whenever there was contamination of young larvae, and was more pronounced in starved parasitized population; d) moderate influence on final chrysalis weight, clearly and negatively shown only at high parasite loads.

Analysis of overall parasite-induced host mortality yielded an unexpected finding: the rate was two-threefold greater than that induced by successful parasitization alone, as calculated on the basis of the numerical ratio puparia/ chrysalids.

Host-induced effects on the parasite were recorded from several view points:

I) Host age at parasitization, including: a) duration of larval development, which is all the shorter the more advanced the stage contaminated; b) weight, which drops in concert with the preceding parameter; and c) parasitization rate, which instead rises along with the advancement of the stage contaminated, although a progressive diminution was recorded as maturity approached in the last instar.

II) Sex of host, including: a) parasite pupal weight, which is about 30% higher in female hosts; b) parasitization percentages, significantly higher in female pupae; c) sex ratio, in which males far outnumber females in male hosts and which approaches 1:1 in female victims. The marked superiority of female hosts resides as much in their peculiar physiological traits as in their higher weight.

III) Size: it largely affects parasite weight, albeit this parameter does not depend entirely on the bulk of the victim inside which the parasite develops but also on its own intrinsic growth capacity, as shown by the variations on the transfer index (parasite pupa/chrysalis weight ratio) among different couples, host sex and weight being equal.

Parasite growth potential was assessed through progressively increasing host weight classes: the weight of the parasite's pupae kept increasing proportionately in ever larger chrysalises only up to the 200 mg class (thereafter the transfer index gradually declines), thereby indicating that because of its lower average weight *Galleria* is actually an undersized host for *Pseudogonia*.

Both partners also displayed reciprocal endocrine effects. The first instar parasite larvae probably had a juvenilizing influence, inducing a moulting delay in the stage contaminated. More pronounced still were the host-induced effects on the parasite. It was found that the latter, in order to develop to second instar, needs the stimuli produced by the physiological events controlling the host's moulting, and that, individually, the susceptibility of L_1 to exogenous ecdysteroids varies even in relation to their growth rate. Thus, by contamination in early stages or at temperature levels that promote the parasite's but not the host's growth, certain L_1 will precociously moult to second instar simply by virtue of host larva-larval moulting. However, a number of L_1 only moult in the eopupa, thereby ensuring survival of the parasite as it can continue developing only in the chrysalis.

The rearing of *Pseudogonia* - an obligate larval-pupal parasite whose physiology in first and initial second instars is closely linked to the host - on artificial diets was also tested. The first tests, which employed a sub-natural diet, indicated that the parasite can develop outside its living environment. This led to the rearing of newly hatched larvae (centrifuge-induced hatching), of intramuscular L_1 in varying steps of development (extracted from last-instar host larvae) and intercuticular L_{II} (taken from eopupae) on host-pupal homogenate, meridic and olidic diets, bovine serum supplemented with hemolymph of the host and small amounts of glucids and lipids. The resulting growth rates were more or less marked depending on diet and stage employed, and in a few cases adult emergence was even achieved. The conditions essential for success are strict asepsis, the presence of ecdysteroids in the pabulum of L_1 and the chance for the amphypneustic L_{II} and L_{III} to place the posterior tracheal spiracles in contact with the air. This is attained by soaking the liquid diet in cotton or else by gelling it with agar or animal gelatine.

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.
- BARONIO P., VANCINI D., CAMPADELLI G., CAVICCHI S., 1981. - Variabilità megetica intraspecifica di *Gonia cinerascens* Rond. (Diptera Tachinidae) in relazione allo stadio di contaminazione dell'ospite *Galleria mellonella* L. (Lep. Galleriidae). - *Boll. Ist. Ent. Univ. Bologna*, 36: 27-35.
- BRATTI A., 1985. - Relazioni tra densità di popolazione dell'ospite e percentuali di parassitizzazione nella coppia ospite - parassita *Galleria mellonella* L. - *Gonia cinerascens* Rond. - *Boll. Ist. Ent. «G. Grandi» Univ. Bologna*, 39: 127-139.
- 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.
- 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.
- CAMPADELLI G., 1973. - Allevamento di *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera Galleriidae) con dieta semiarificiale. - *Boll. Ist. Ent. Univ. Bologna*, 32: 11-25.
- CAMPADELLI G., 1975. - *Galleria mellonella* L. quale ospite di sostituzione per i Ditteri Larvevoridi. - *Boll. Ist. Ent. Univ. Bologna*, 32: 203-213.
- CAMPADELLI G., BARONIO P., 1978. - Indagine sulla capacità di sviluppo in laboratorio di un gruppo di Ditteri Tachinidi sull'ospite di sostituzione *Galleria mellonella* L. (Lep. Galleriidae). - *Boll. Ist. Ent. Univ. Bologna*, 34: 27-33.
- CAMPADELLI G., 1980. - Decremento ponderale nel tempo delle crisalidi di *Galleria mellonella* L. indenni e parassitizzate da *Gonia cinerascens* Rond. - *Boll. Ist. Ent. Univ. Bologna*, 35: 267-273.
- CAMPADELLI G., 1981. - Sui limiti della capacità parassitaria di *Gonia cinerascens* Rond. (Dipt. Tachinidae). - *Boll. Ist. Ent. Univ. Bologna*, 36: 83-90.
- CAMPADELLI G., 1982. - Sulla conservabilità delle uova microtipiche di *Gonia cinerascens* Rond. (Dipt. Tachinidae). - *Boll. Ist. Ent. Univ. Bologna*, 37: 91-100.
- CAMPADELLI G., 1983. - Relazioni tra l'età della madre e alcuni caratteri della prole in *Galleria mellonella* L. (Lep. Galleriidae). - *Boll. Ist. Ent. Univ. Bologna*, 37: 193-207.
- CAMPADELLI G., GARDENCHI G., 1984. - Le papille rettali in *Gonia cinerascens* Rond. e in altri Ditteri Larvevoridi. - *Boll. Ist. Ent. «Guido Grandi» Univ. Bologna*, 39: 83-100.
- CAMPADELLI G., TOSI C., 1984. - Ricerca della temperatura ottimale per l'allevamento di *Gonia cinerascens* Rond. (Diptera: Larvaevoridae). - *Boll. Ist. Ent. «Guido Grandi» Univ. Bologna*, 39: 101-111.
- CAMPADELLI G., BARLOTTI T., 1985. - Importanza della cera nella dieta artificiale di *Galleria mellonella* L., ospite di sostituzione per il parassita *Pseudogonia rufifrons* Wied. - *Boll. Ist. Ent. «G. Grandi» Univ. Bologna*, 40: 1-12.
- CAMPADELLI G., 1986. - Effetti della bassa temperatura sulla coppia ospite-parassita *Galleria mellonella* L. - *Pseudogonia rufifrons* Wied. - *Boll. Ist. Ent. «G. Grandi» Univ. Bologna*, 41: 29-49.
- CAMPADELLI G., 1987. - *Galleria mellonella* L. quale ospite di sostituzione per i parassitoidi. - *Boll. Ist. Ent. «G. Grandi» Univ. Bologna*, 42: 47-65.
- CAMPADELLI G., FANTI P., 1987. - Livelli di parassitizzazione in relazione allo stadio di contaminazione della vittima nella coppia ospite - parassita *Galleria mellonella* L. - *Pseudogonia rufifrons* Wied. - *Boll. Ist. Ent. «G. Grandi» Univ. Bologna*, 42: 67-74.
- CAMPADELLI G., ZANOTTI M., 1990. - Effetti delle tecniche di parassitizzazione collettiva e individuale nel sistema *Galleria mellonella* L. - *Pseudogonia rufifrons* Wied. - *Boll. Ist. Ent. «G. Grandi» Univ. Bologna*, 45: 101-108.
- COULIBALY A.K., 1991. - Relazione tra l'età delle uova microtipiche nei primi giorni dell'emissione e percentuali di parassitizzazione nel sistema *Galleria mellonella* L. - *Pseudogonia rufifrons* Wied. - *Boll. Ist. Ent. «G. Grandi» Univ. Bologna*, 46 (in corso di stampa).

- DINDO M.L., 1983. - Effetti indotti dai Ditteri Tachinidi nei loro ospiti. Il caso della coppia *Galleria mellonella* L. - *Gonia cinerascens* Rond. - *Boll. Ist. Ent. Univ. Bologna*, 37: 137-155.
- DINDO M.L., CESARI R., 1985. - Effetti del parassitoide sul cannibalismo dell'ospite nella coppia *Galleria mellonella* L. (Lep. Galleriidae) - *Pseudogonia rufifrons* Wied. (Dipt. Tachinidae). - *Att. XIV Congr. Naz. Ital. Entom.*, Palermo, pp. 401-407.
- DINDO M.L., MONTI M., 1986. - Effetti della densità di popolazione nei Lepidotteri: il caso di *Galleria mellonella* L. - *Boll. Ist. Ent. «G. Grandi» Univ. Bologna*, 40: 111-120.
- DINDO M.L., 1986. - Pupal premature mortality as a host mortality factor in the system *Galleria mellonella* L. - *Pseudogonia rufifrons* Wied. (Lep. Galleriidae - Dipt. Tachinidae). - *Boll. Ist. Ent. «G. Grandi» Univ. Bologna*, 40: 215-220.
- DINDO M.L., 1987. - Effetti indotti da *Pseudogonia rufifrons* Wied. (Dipt. Tachinidae) sul cannibalismo e sulla mortalità di *Galleria mellonella* L. (Lep. Galleriidae) posta in condizioni di digiuno parziale. - *Boll. Ist. Ent. «G. Grandi» Univ. Bologna*, 41: 315-324.
- DINDO M.L., MONTI M., 1988. - Necessità trofiche della vittima nel sistema *Galleria mellonella* - *Pseudogonia rufifrons*. - *Atti XV Congr. Naz. Ital. Ent.*, L'Aquila, pp. 795-800.
- DINDO M.L., 1988. - Effetti dell'età di parassitizzazione sul cannibalismo e sulla mortalità dell'ospite nel sistema *Galleria mellonella* L. - *Pseudogonia rufifrons* Wied. (Lep. Galleriidae - Dipt. Tachinidae). - *Boll. Ist. Ent. «G. Grandi» Univ. Bologna*, 43: 37-42.
- FANTI P., 1983. - Effetti del digiuno dell'ospite sulla coppia ospite-parassita *Galleria mellonella* L. - *Gonia cinerascens* Rond. - *Boll. Ist. Ent. «G. Grandi» Univ. Bologna*, 38:37-50.
- FANTI P., 1984. - Ovideposizione di *Gonia cinerascens* Rond. (Diptera: Tachinidae) in condizioni sperimentali: variazioni nel tempo e ritmi giornalieri. - *Boll. Ist. Ent. «G. Grandi» Univ. Bologna*, 38: 167-179.
- FANTI P., BRATTI A., 1986. - Effetti del fluoromevalonato, un composto anti-ormone giovanile, sulla coppia ospite - parassita *Galleria mellonella* L. - *Pseudogonia rufifrons* Wied. - *Boll. Ist. Ent. «G. Grandi» Univ. Bologna*, 41: 65-78.
- FANTI P., BRATTI A., MELLINI E., 1987. - Precocious activation of the larval-pupal parasitoid *Pseudogonia rufifrons* Wied. (Diptera Tachinidae) during the larval stage of its substitute host *Galleria mellonella* L. - *Parasitoid Insects*, Lyon, pp. 85-86.
- 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.
- FANTI P., BIONDI R., 1988. - Variazioni dell'idoneità al rapporto parassitario nella coppia *Galleria mellonella* L. - *Pseudogonia rufifrons* Wied. in funzione del sesso e delle dimensioni dell'ospite. - *Boll. Ist. Ent. «G. Grandi» Univ. Bologna*, 43: 223-232.
- FANTI P., 1990. - Fattori ormonali inducenti la prima muta larvale del parassitoide *Pseudogonia rufifrons* Wied. (Diptera Tachinidae) in substrati di crescita in vivo e in vitro. - *Boll. Ist. Ent. «G. Grandi» Univ. Bologna*, 45: 47-59.
- FANTI P., BRATTI A., 1991. - In vitro rearing of the parasitoid *Pseudogonia rufifrons* Wied. (Diptera Tachinidae) larval stages: preliminary results. - *Insect parasitoids, 6th European Workshop*, Perugia, (in corso di stampa).
- GARDENGI G., MELLINI E., 1980. - Sulla formazione dell'uovo microtipico e del relativo apparato di fissazione in *Gonia cinerascens* Rond. (Diptera Larvaevoridae). - *Boll. Ist. Ent. Univ. Bologna*, 35: 215-230.
- GARDENGI G., MELLINI E., 1990. - Note anatomo-istologiche sul canale alimentare delle larve di ultima età del parassitoide *Pseudogonia rufifrons* Wied. - *Boll. Ist. Ent. «G. Grandi» Univ. Bologna*, 44: 233-248.
- MARINI A.G., CAMPADELLI G., 1974. - Prove di selezione di popolazioni non soggette a diapausa del Lepidottero *Galleria mellonella* L. - *Boll. Ist. Ent. Univ. Bologna*, 32: 153-168.
- MELLINI E., 1975. - Studi sui Ditteri Larvaevoridi. XXV. Sul determinismo ormonale delle influenze esercitate dagli ospiti sui loro parassiti. - *Boll. Ist. Ent. Univ. Bologna*, 31: 165-203.
- MELLINI E., TESTA I., CAMPADELLI G., CAVICCHI S., 1978. - Influenze del sesso dell'ospite sullo

- sviluppo del parassita nella coppia *Galleria mellonella* L. - *Gonia cinerascens* Rond. - *Boll. Ist. Ent. Univ. Bologna*, 34: 111-123.
- MELLINI E., CAMPADELLI G., 1978. - Sulla schiusura delle uova microtipiche di *Gonia cinerascens* Rond. in condizioni sperimentali. - *Boll. Ist. Ent. Univ. Bologna*, 34: 153-189.
- MELLINI E., RAPISARDA V., BRIOLINI G., 1979. - Effetti indiretti della densità dell'ospite (*Galleria mellonella* L.) sullo sviluppo del parassita (*Gonia cinerascens* Rond.) in condizioni sperimentali. - *Boll. Ist. Ent. Univ. Bologna*, 35: 1-12.
- MELLINI E., GALASSI L., BRIOLINI G., 1979. - Effetti della temperatura sulla coppia ospite-parassita *Galleria mellonella* L. - *Gonia cinerascens* Rond. - *Boll. Ist. Ent. Univ. Bologna*, 35: 13-28.
- MELLINI E., CAMPADELLI G., 1980. - Confronto ponderale tra individui parassitizzati e indenni nella coppia ospite-parassita *Galleria mellonella* L. - *Gonia cinerascens* Rond. - *Boll. Ist. Ent. Univ. Bologna*, 35: 109-125.
- MELLINI E., MALAGOLI M., RUGGERI L., 1980. - Substrati artificiali per l'ovideposizione dell'entomoparassita *Gonia cinerascens* Rond. (Diptera Larvaevoridae) in cattività. - *Boll. Ist. Ent. Univ. Bologna*, 35: 127-156.
- MELLINI E., GIRONI R., 1980. - Effetti di uno iuvenoide sulla coppia ospite-parassita *Galleria mellonella* L. - *Gonia cinerascens* Rond. - *Boll. Ist. Ent. Univ. Bologna*, 35: 189-213.
- MELLINI E., GIRONI R., 1981. - Effetti della superparassitizzazione nella coppia ospite-parassita *Galleria mellonella* L. - *Gonia cinerascens* Rond. - *Boll. Ist. Ent. Univ. Bologna*, 36: 49-68.
- MELLINI E., DINDO M.L., 1982. - Effetti del fotoperiodo sugli stadi preimmaginali della coppia ospite-parassita *Galleria mellonella* L. - *Gonia cinerascens* Rond. - *Boll. Ist. Ent. Univ. Bologna*, 36: 115-131.
- MELLINI E., CESARI R., 1982. - Effetti dello iuvenoide ZR 512 4E (Idroprene) sulla coppia ospite-parassita *Galleria mellonella* L. - *Gonia cinerascens* Rond. - *Boll. Ist. Ent. Univ. Bologna*, 36: 141-158.
- MELLINI E., CAMPADELLI G., 1982. - Potenziale megetico del parassitoide *Gonia cinerascens* Rond. misurato sull'ospite di sostituzione *Galleria mellonella* L. - *Mem. Soc. Ent. Ital.*, 60: 239-252.
- MELLINI E., BRAGA C., 1982. - Importanza del livello di dispersione delle uova microtipiche per la moltiplicazione del parassita *Gonia cinerascens* Rond. - *Boll. Ist. Ent. Univ. Bologna*, 37: 75-90.
- MELLINI E., BONINSEGGNI G., 1983. - Ripercussioni sul parassita *Gonia cinerascens* Rond. di trattamenti con idroprene effettuati su ospiti nelle fasi finali dello sviluppo preimmaginale. - *Boll. Ist. Ent. Univ. Bologna*, 37: 171-191.
- MELLINI E., BRATTI A., 1983. - Effetti delle deiezioni e della manipolazione sullo sviluppo di *Galleria mellonella* L. e ripercussioni sul parassita *Gonia cinerascens* Rond. - *Boll. Ist. Ent. «G. Grandi» Univ. Bologna*, 38: 51-69.
- MELLINI E., BECCARI G., 1983. - Relazioni tra dimensioni degli ospiti e percentuali di parassitizzazione nella coppia ospite-parassita *Galleria mellonella* L. - *Gonia cinerascens* Rond. - *Boll. Ist. Ent. «G. Grandi» Univ. Bologna*, 38: 71-88.
- 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., BORGATTI M., BRATTI A., 1985. - Sulla idoneità di *Galleria mellonella* L. nei confronti del parassitoide *Pseudogonia rufifrons* Wied., penetrato durante le ultime fasi della vita larvale dell'ospite. - *Boll. Ist. Ent. «G. Grandi» Univ. Bologna*, 39: 161-186.
- MELLINI E., 1986. - Importanza dello stadio dell'ospite, al momento della parassitizzazione, per la biologia dei Ditteri Larvevoridi. - *Frustula Ent., Nuova Serie*, 7-8: 395-419.
- MELLINI E., CAMPADELLI G., 1986. - Sulla distribuzione delle larve di prima e seconda età di *Pseudogonia rufifrons* Wied., rispettivamente nelle larve e nelle eopupe di *Galleria mellonella* L. - *Boll. Ist. Ent. «G. Grandi» Univ. Bologna*, 40: 151-166.
- MELLINI E., CAMPADELLI G., DINDO M.L., 1986. - Ritmo di accrescimento delle larve di I età

- del parassita in relazione allo stadio dell'ospite al momento della contaminazione nel sistema *Galleria mellonella* L. - *Pseudogonia rufifrons* Wied. - *Boll. Ist. Ent. «G. Grandi» Univ. Bologna*, 40: 221-237.
- 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.
- MELLINI E., 1990. - Sinossi di biologia dei Ditteri Larvevoridi. - *Boll. Ist. Ent. «G. Grandi» Univ. Bologna*, 45: 1-38.
- MELLINI E., BORGATTI M., 1991. - La diapausa nei parassiti a ritmo di sviluppo dipendente dall'ospite: il caso di *Pseudogonia rufifrons* Wied. - *Mem. Soc. Ent. Ital.*, 71 (in corso di stampa).
- MELLINI E., 1991. - Ditteri entomofagi, occasionali determinatori di miasi nell'uomo. - *Natura e montagna*, 38 (in corso di stampa).
- MELLINI E., CAMPADELLI G., 1991. - Sul possibile uso di siero bovino quale principale ingrediente nelle diete artificiali per le larve del parassitoide *Pseudogonia rufifrons* Wied. - *Boll. Ist. Ent. «G. Grandi» Univ. Bologna*, 46 (in corso di stampa).
- TURCHETTI M., 1987. - Importanza dell'età dell'ospite al momento della contaminazione nella coppia ospite-parassita *Galleria mellonella* L. - *Pseudogonia rufifrons* Wied. - *Boll. Ist. Ent. «G. Grandi» Univ. Bologna*, 42: 231-240.
- VERENINI M., 1983. - Effetti dello ijuvenoide ZR 515 4E (Methoprene) sulla coppia ospite-parassita *Galleria mellonella* L. - *Gonia cinerascens* Rond. - *Boll. Ist. Ent. «G. Grandi» Univ. Bologna*, 38: 95-115.
- VERENINI M., BALBONI M., DOLCI M., MAZZOLDI D., 1985. - Effetti di un prodotto ijuvenilizzante di sintesi italiano sulla coppia ospite-parassita *Galleria mellonella* L. - *Gonia cinerascens* Rond. - *Boll. Ist. Ent. «G. Grandi» Univ. Bologna*, 39: 141-151.