

ALESSANDRO BRATTI, STEFANO BENINI

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

Allevamento «in vitro» delle larve di *Pseudogonia rufifrons* Wied. (Dipt. Tachinidae). Prove su diete subnaturali e meridiche^(*)^(†).

INTRODUZIONE

Pseudogonia rufifrons Wied., parassitoide di *Helicoverpa* spp. (Lep. Noctuidae), è stato allevato per la prima volta *in vitro* fino allo stadio adulto, sopra un substrato composto da un omogeneizzato di pupe dell'ospite di sostituzione *Galleria mellonella* L. addizionato con agar (1.0%) e solfato di gentamicina (0.006%) (Bratti e Monti, 1988).

Nella prima parte del presente lavoro, utilizzando la medesima dieta, abbiamo studiato quanto il tempo di permanenza delle larve di prima età nell'ospite incidesse sullo sviluppo completo del parassita.

Nella seconda parte, sempre per le L₁, si sono confrontati tre tipi di liquidi di natura emolinfatica provenienti rispettivamente dalle pupe di *G. mellonella*, dalle larve di ultima età di *Manduca sexta* L. e dalle pupe di Ditteri Calliforidi. Lo scopo è stato quello di verificare quali di questi liquidi permettesse la percentuale più elevata di muta da L₁ ad L₂. Questa fase ontogenetica è quella più legata allo sviluppo dell'ospite e di conseguenza, dal punto di vista teorico, la più ardua da ottenere fuori dall'ambiente vivente.

In seguito, data la validità del succo emolinfatico delle crisalidi del Galleriide, abbiamo analizzato la percentuale delle proteine e degli aminoacidi presenti nel liquido che, come dimostrato per altri parassitoidi (Nettles, 1986; Grenier *et al.*, 1986; Thompson, 1983, 1986; Bonnot *et al.*, 1984), si è rivelato un parametro molto importante per la predisposizione di diete artificiali meridiche.

Per finire si sono sperimentate diete con una base olidica cui abbiamo addizionato, in varia proporzione, succo emolinfatico di *G. mellonella*.

(*) Lavoro accettato il 4 settembre 1991.

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

MATERIALI E METODI

SUBSTRATI A BASE DI OMOGENEIZZATO DI CRISALIDI DI *G. MELLONELLA*

Le larve di I età di *P. rufifrons*, utilizzate nella sperimentazione, provengono da larve di ultima età dell'ospite di sostituzione *G. mellonella* e sono state poste sulla dieta artificiale secondo la metodologia adottata da Bratti e Monti (1988).

Le L₁ sono state prelevate dalla larva ospite dopo 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 ore dal momento della parassitizzazione. Esse presentavano una notevole variabilità nelle dimensioni e, soprattutto quelle rimaste più a lungo all'interno della larva ospite erano, in alcuni casi, prossime alla muta. Il numero di parassitoidi presenti all'interno di un singolo ospite è variato da uno ad una cinquantina. Successivamente le giovani larvette sono state trasferite, tramite pipette Pasteur, nei singoli pozzetti di scatole sterili Microwell 96 F (Nunclon) contenenti la dieta previamente versata.

Il substrato trofico, utilizzato nel corso dell'intera sperimentazione, è stato ottenuto da crisalidi di *G. mellonella* di età non superiore alle 48 ore (Bratti e Monti, 1988).

Sono state formate 7 tesi in base alle ore di permanenza del parassitoide nella larva ospite (24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 ore). Abbiamo eseguito 3 repliche per ogni tesi con un numero di 35-40 individui per tesi.

SUBSTRATI A BASE DI EMOLINFA DI CRISALIDI DI *G. MELLONELLA*, DI LARVE DI *M. SEXTA* E DI PUPE DI DITTERI CALLIFORIDI

Le larve di I età di *P. rufifrons* sono state prelevate, mediante dissezione, da larve di VII età di *G. mellonella* dopo 48 ore dalla parassitizzazione.

Abbiamo quindi dispensato la dieta, tramite microdispenser Gilson, in modo da immergervi completamente le larve del parassita. Queste sono state poste individualmente nelle cellette di contenitori Microwell 96 F (Nunclon), provviste di 10 µl di emolinfa ognuna.

Succo emolinfatico di *G. mellonella*. Il liquido nutritizio a base di emolinfa è stato ottenuto secondo il procedimento adottato da Bratti (1989 a). Poichè il succo si è dimostrato il più idoneo per il parassitoide, è stata eseguita l'analisi dello spettro aminoacidico per poter conoscere sia la concentrazione totale degli aminoacidi che il loro rapporto. Per l'analisi sono stati prelevati 100 mg di liquido, a cui si sono addizionati 5 ml di HCl 6N; il tutto è stato mantenuto ad una temperatura di 110 °C per 16 ore. Dopo avere effettuata una filtrazione, si è portato a volume di 25 ml aggiungendo acqua distillata. Da questa soluzione si è prelevato 1 ml, che è stato portato a secco all'interno di un essiccatore sottovuoto contenente pastiglie di NaOH. Infine si è diluito il campione con 4 ml di un tampone a pH 2.20 e si è provveduto ad iniettarlo in ragione di 250 µl nell'Aminoanalyzer Beckman Unichrom.

Si sono analizzate la percentuale degli aminoacidi sulla sostanza totale e sulla frazione proteica.

Emolinfa di larve mature di *M. sexta*. È stata trattata secondo il procedimento messo a punto da Xie *et al.* (1986), e sottoposta a centrifugazione a 12000 giri/min. per la durata di 12 minuti. Quindi è stata sterilizzata tramite filtri Millex con porosità di 0.45 μ .

Succo emolinfatico di pupe di Ditteri Calliforidi. Questo substrato ha subito il medesimo trattamento termico delle crisalidi di *G. mellonella*. Le centrifugazioni sono state effettuate alla velocità di 12000 giri/min. per 15 minuti. Il maggior tempo di centrifugazione è dovuto al forte potere coagulante dell'estratto ed alla sua tendenza ad intasare i filtri Millex.

Si sono posti a confronto i tre succhi emolinfatici, mentre la soluzione salina di Ephrussi-Beadle è stata usata come testimone. Sono state eseguite tre repliche per tesi composte da 35-40 individui ognuna.

In tutti i substrati abbiamo addizionato solfato di gentamicina (0.01%).

DIETE MERIDICHE

Per le diete A e B si sono utilizzate larve di prima età di *P. rufifrons*, rimaste nell'ospite per circa 48-72 ore. Per le operazioni di dissezione si è proceduto come descritto in precedenza per gli altri substrati. Il trasferimento delle giovani L₁ sulla dieta è stato eseguito mediante un liquido transfer costituito dalla stessa dieta liquida priva dei lipidi e dei singoli aminoacidi. Per quanto riguarda la dieta C si sono impiegate L₂ provenienti da eopupe dell'ospite previamente superparassitizzate come larve dell'ultima età.

La composizione delle diete meridiche è riportata in tabella 1. Le diete A e B derivano da quella predisposta da Nettles (1986) per l'allevamento del Tachinide *Eucelatoria bryani* Sab. Infatti la dieta B è la A diluita con il 50% di acqua distillata. La dieta C, invece, presenta un rapporto tra gli aminoacidi uguale ma una concentrazione assoluta di 4 volte inferiore a quella rinvenuta nell'analisi dello spettro aminoacidico del succo delle crisalidi di *G. mellonella*. Questo per evitare innalzamenti della pressione osmotica che, da prove preliminari, si è dimostrata molto critica per il parassitoide.

Dalla dieta B se ne sono poi formate altre due, aggiungendo rispettivamente il 20 ed il 30% del solito estratto emolinfatico di *G. mellonella*.

I substrati sperimentati sono stati 5 di cui 3 privi di componenti dell'ospite.

Dopo la sterilizzazione le diete sono state versate in contenitori da 24 pozzetti Nunclon, rimanendo per circa 24 ore ad U.r. e temperatura ambiente.

A parte la dieta C, in cui si sono utilizzate larve di seconda età, in tutte le altre (A, B, B+20% di emolinfa, B+30% di emolinfa) sono state poste in allevamento larve di prima età. Si è eseguita una ripetizione per ciascuna tesi con 20-30 larve.

Tab. 1 - Composizione delle diete utilizzate nella sperimentazione: A e B (da Nettles, 1986).

Ingredienti	mg/100 ml		
	A*	B*	C**
Acido malico	30	15	30
Fenilalanina	100	50	100
Acido α -chetoglutarico	45	22.5	45
Acido fumarico	50	25	50
Acido citrico	25	12.5	25
Acetato di K	83	41.5	83
Succinato di Ca	67	33.5	67
Acido piruvico	30	15	30
NaCl	261	130.5	261
KCl	59	29.5	59
MgSO ₄ .7H ₂ O	123	61.5	123
MgCl ₂ .6H ₂ O	319	159.5	319
KH ₂ PO ₄	40	20	40
K ₂ HPO ₂	51	25.5	51
KI	0.02	0.01	0.02
Co(Ac.) ₂ .4H ₂ O	0.02	0.01	0.02
Mn(Ac.) ₂ .4H ₂ O	5.5	2.75	5.5
Cu(Ac.) ₂ .H ₂ O	0.02	0.01	0.02
Fe(NO ₃) ₃ .H ₂ O	8.9	4.45	8.9
Zn(Ac.) ₂ .2H ₂ O	2.0	1.0	2.0
Trealoso	1000	500	1000
Glucoso	50	25	50
Adenina	6.0	3.0	6.0
Timina	6.0	3.0	6.0
Guanina	6.0	3.0	6.0
Citosina	3.0	1.5	3.0
Uracile	6.0	3.0	6.0
ATP	20	10	20
Glutatione rid.	10	5	10
Cisteina	8	4	8
Metionina	40	20	38
Asparagina	200	100	127
Treonina	70	35	42
Serina	100	50	48
Glutammina	225	112.5	107
Prolina	75	37.5	5
Glicina	80	40	117
Alanina	125	62.5	51
Valina	100	50	41
Isoleucina	80	40	40
Leucina	130	65	90
Tirosina	70	35	70
Fenilalanina	100	50	28
Beta alanina	10	5	5
Lisina	150	75	92
Istidina	100	50	48
Arginina	125	62.5	24

segue Tab. 1 - Composizione delle diete utilizzate nella sperimentazione: A e B (da Nettles, 1986).

Ingredienti	mg/100 ml		
	A*	B*	C**
Triptofano	40	20	20
Acido gamma aminobutirrico	5	2.5	5
Fosfoetanolamina	5	2.5	5
Fosforilcolina di Ca	129	64.5	129
Tiamina	0.1	0.05	0.1
Riboflavina	1.0	0.5	1.0
Piridossina	0.1	0.05	0.1
Biotina	0.05	0.025	0.05
Niacinamide	2.0	1.0	2.0
Pantotenato di Ca	4.0	2.0	4.0
Acido ascorbico	5.0	2.5	5.0
Acido folico	1.0	0.5	1.0
Cianocobalamina	0.0035	0.00175	0.0035
Mioinositolo	5.0	2.5	5.0
Cannamicina	5.0	2.5	5.0
Penicillina	10.0	5.0	10.0
Distearil fosfatidilcolina	0.1	0.05	
Dimiristoil fosfatidilcolina	0.1	0.05	
Tween 80	150	75	
Colesterolo	10	5	
Acetato di retinolo	0.5	0.025	
Alfa tocoferolo	0.5	0.025	
Trioleina	50	25	
Miscela di Lipidi Sigma (1000X)(ml)			2.5
Tuorlo d'uovo	1600	1600	1600
Idrolizzato di lattalbumina	900	900	
Farina di soia			1300
Agar	1500	1500	1500
KOH, 6N (a ph)	6.75		

* Utilizzate per larve di prima età

** Utilizzata per larve di seconda età

Tutto il materiale utilizzato nella sperimentazione (pinze, forbici, etc.) è stato sterilizzato in autoclave per 12' a 125 °C.

Le operazioni relative al trasferimento delle larvette, alla preparazione della dieta ed ai controlli sono state eseguite all'interno di una cappa a flusso laminare orizzontale. I parametri biologici considerati sono stati, per tutte le prove, la percentuale di individui che sono mutati nello stadio successivo e i tempi di sviluppo dal momento in cui le L₁ sono state poste sulla dieta alle successive mute. Abbiamo inoltre rilevato i pesi dei pupari.

L'elaborazione statistica dei dati è stata eseguita, dove possibile, applicando l'analisi della varianza (Snedecor e Cochran, 1980) ed adottando il test della differenza minima significativa; le percentuali sono state trasformate nei rispettivi arcoseni della radice quadrata.

RISULTATI

SUBSTRATI A BASE DI OMOGENEIZZATO DI CRISALIDI DI *G. MELLONELLA*

Per quanto concerne la percentuale di L_2 , si nota una differenza significativa tra le 7 tesi confrontate ($gl=6, F=3.020, P=0.0488$). In particolare, come si evince dalla tabella 2, la percentuale di L_2 aumenta procedendo dalla tesi in cui le L_1 sono rimaste nell'ospite per sole 24 ore (56.6%) fino a quelle in cui esse si sono accresciute per 96, 120, 144 e 168 ore (dal 91.8 al 95.9%). E' interessante notare che, mentre la variabilità fra le medie delle tre ripetizioni relative alle prime tre tesi (24, 48, 72 ore) è molto elevata, la stessa si abbassa notevolmente nelle ultime quattro (96, 120, 144, 168 ore).

I valori relativi alle percentuali di L_3 sono stati in ogni tesi estremamente bassi (dal 2.0% per quelle rimaste 72 ore nell'ospite all' 11.6% per quelle rimaste 168 ore). Non si sono comunque rilevate differenze significative ($gl=6, F=0.581, P=0.7396$). Un andamento analogo si è riscontrato sia per quanto riguarda le percentuali di pupe ($gl=6, F=0.200, P=0.9702$) che quelle di adulti ($gl=6, F=0.681, P=0.6683$). In quest'ultimo caso, tra l'altro, i valori non hanno mai superato il 2.1% (tesi in cui le L_1 sono rimaste nell'ospite 144 ore).

Tab. 2 - Sviluppo delle larve di prima età di *P. rufifrons*, in funzione del tempo di permanenza nell'ospite, su omogeneizzato

Ore di permanenza nell'ospite	% L_2	% L_3	% Pupa	% Adulti
24	56.6 ± 25.0 a	6.2 ± 3.4 a	1.0 ± 1.0 a	0.0 ± 0.0 a
48	62.4 ± 22.6 ab	11.1 ± 8.1 a	5.0 ± 5.0 a	1.0 ± 1.0 a
72	72.3 ± 11.3 abc	2.0 ± 2.0 a	0.6 ± 0.6 a	0.0 ± 0.0 a
96	93.7 ± 3.9 c	7.5 ± 2.6 a	0.8 ± 0.8 a	0.8 ± 0.8 a
120	91.9 ± 3.6 bc	6.3 ± 4.9 a	1.0 ± 1.0 a	1.0 ± 1.0 a
144	95.9 ± 2.2 c	6.2 ± 6.2 a	2.1 ± 2.1 a	2.1 ± 2.1 a
168	96.0 ± 1.2 c	11.6 ± 5.9 a	1.4 ± 0.7 a	1.4 ± 0.7 a

Le medie nelle colonne seguite dalla stessa lettera non differiscono statisticamente ($P \leq 0.05$; L.S.D. multiple range test).

I tempi di sviluppo, calcolati dal momento in cui le larvette sono state poste sulla dieta al passaggio allo stadio successivo, hanno un andamento inversamente proporzionale al periodo di permanenza nell'ospite (tab. 3). Le larve di prima età impiegano da 5.8 giorni, per quelle rimaste 24 ore, a 2.4 giorni per quelle rimaste 168 ore. Le differenze fra le varie tesi risultano statisticamente significative ($gl=6, F=13.96, P=0.0001$).

Tab. 3 - Tempi di sviluppo da L₁ ad L₂ per *P. rufifrons*, in funzione del tempo di permanenza nell'ospite, su omogeneizzato

Ore di permanenza nell'ospite	Tempo di sviluppo da L ₁ ad L ₂ (gg)
24	5.8 ± 0.4 a
48	3.9 ± 0.3 b
72	3.8 ± 0.5 bc
96	2.9 ± 0.3 cd
120	3.1 ± 0.4 bcd
144	2.5 ± 0.2 d
168	2.4 ± 0.4 d

Le medie nelle colonne seguite dalla stessa lettera non differiscono statisticamente (P≤0.05; L.S.D. multiple range test).

Per giungere allo stadio adulto le larvette hanno impiegato circa 25 giorni per la tesi 48 ore contro i 20-22 delle altre, raggiungendo pesi dei pupari variabili tra 40 e 60 mg circa.

SUBSTRATI A BASE DI EMOLINFA

Nella tabella 4 si nota, riguardo alla percentuale di L₂, una differenza significativa fra le 4 tesi messe a confronto (gl=3, F=15.853, P=0.001). La tesi costituita dall'estratto di *G. mellonella* è stata quella che ha permesso di raggiungere i valori più elevati: 86.5% contro il 46.8% dell'emolinfa di *M. sexta* ed il 20.2% del succo di pupae di Ditteri Calliforidi. Nessuna L₁ è mutata nella soluzione fisiologica anche se le giovani larvette sono sopravvissute per più di 72 ore. Nel succo emolinfatico di *G. mellonella*, solo in una ripetizione 11 L₂ sono mutate in terza età impiegando circa 4-5 giorni, in seguito esse sono morte per asfissia a causa dell'eccessivo liquido.

I tempi di sviluppo, dal momento in cui le L₁ sono state poste nei diversi liquidi al passaggio all'età successiva, non hanno registrato differenze significa-

Tab. 4 - Percentuali di L₂ * di *P. rufifrons* rilevate nei substrati liquidi a base di emolinfa e nella soluzione fisiologica

Substrato	% L ₂
Soluzione fisiologica Ephrussi-Beaddle	0.0 ± 0.0 a
Estratto di pupae di Calliforidi	20.2 ± 11.9 ab
Estratto di larve di <i>M. sexta</i>	46.9 ± 6.7 b
Estratto di pupae di <i>G. mellonella</i>	86.5 ± 11.0 c

Le medie nelle colonne seguite dalla stessa lettera non differiscono statisticamente (P≤0.05; L.S.D. multiple range test).

* Le L₁ utilizzate nella sperimentazione sono rimaste 24-48 ore nell'ospite.

tive fra le diverse tesi ($gl=3$, $F=0.392$, $P=0.6950$) anche se, come si nota dalla tabella 5, le L_1 cresciute nell'estratto di pupe di *G. mellonella* sono quelle che hanno impiegato il minor tempo (3.7 gg).

I dati relativi all'analisi della frazione proteica ed alla sua composizione aminoacidica indicano una quantità di proteina grezza pari all'11.28% di cui 7.86% di proteina pura (somma dei vari aminoacidi) e 3.42% di amonia. Calcolando invece le percentuali di aa sulla proteina risulta un valore del 69.7%,

Tab. 5 - Tempi di sviluppo da L_1 ad L_2^* per *P. rufifrons* nei diversi substrati a base di emolinfa

Substrato	Tempo di sviluppo (gg)
Estratto di pupe di Calliforidi **	4.5 ± 1.5 a
Estratto di larve di <i>M. sexta</i>	4.1 ± 0.2 a
Estratto di pupe di <i>G. mellonella</i>	3.7 ± 0.2 a

Le medie nelle colonne seguite dalla stessa lettera non differiscono statisticamente ($P \leq 0.05$; L.S.D. multiple range test).

* Le L_1 utilizzate nella sperimentazione sono rimaste 24-48 ore nell'ospite.

** Dati relativi a due ripetizioni.

Tab. 6 - Percentuale di aminoacidi, calcolata sulla sostanza totale e sulla frazione proteica, nel succo emolinfatico di pupe di *G. mellonella*

Aminoacidi	% sulla proteina	% sul totale
Acido aspartico	9.00	1.02
Treonina	3.04	0.34
Serina	3.46	0.39
Acido glutammico	7.6	0.86
Prolina	0.37	0.04
Glicina	8.35	0.94
Alanina	3.66	0.41
Cistina	0.63	0.07
Valina	2.93	0.33
Metionina	2.75	0.31
Isoleucina	2.85	0.32
Leucina	6.37	0.72
Tirosina	4.98	0.56
Fenilalanina	2.00	0.23
Istidina	3.50	0.39
Lisina	6.55	0.74
Arginina	1.66	0.19
Amonia	(30.30)	(3.42)
% AA totale	69.70	7.86
% di Proteina grezza	11.28	
% di proteina pura	7.86	

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

Dieta	I ₂	Tempo di sviluppo (gg)	L ₃	Tempo di sviluppo (gg)	Pupe	Tempo di sviluppo (gg)	Pesi (mg)
A	0/30 0.0 %	-	-	-	-	-	-
B	0/20 0.0 %	-	-	-	-	-	-
B + 20 % Emolinfa	8/30 26.7 %	4.1 ± 0.7	5/30 16.7 %	7.4 ± 0.1	4/30 13.3 %	11.7 ± 0.4	22.5 ± 1.3
B + 30 % Emolinfa	17/30 56.7 %	4.2 ± 0.2	12/30 40.0 %	7.8 ± 0.4	7/30 23.3 %	11.6 ± 0.3	29 ± 2.9
C*	-	-	2/38	16.0 ± 1.4	-	-	-

* Si sono messe in allevamento larve di seconda età.

mentre il restante 30.3% è rappresentato da amonia. Come si può notare dalla tabella 6 le quantità di aminoacidi più elevate sono date dall'acido aspartico 9.0%, la glicina 8.35%, l'acido glutammico 7.6%, la lisina 6.55% e la leucina 6.37%, mentre la prolina 0.37% e la cistina 0.63% sono le meno rappresentate (calcolate sulla proteina).

DIETE MERIDICHE

Come descritto in precedenza per tutte le diete saggiate è stata eseguita un'unica ripetizione. Nonostante questo, poichè non si sono verificate contaminazioni nè batteriche nè fungine, i dati possono essere considerati sufficientemente attendibili fermo restando che un'ulteriore sperimentazione sarà necessaria per chiarire meglio il ruolo di alcuni fattori.

Premesso quanto sopra, dalla tabella 7 si nota come l'addizione di succo emolinfatico sia fondamentale per lo sviluppo delle L_1 . I risultati migliori sono stati raggiunti nella tesi con il 30% di emolinfa che ha permesso di ottenere percentuali del 60% circa di L_2 , doppie rispetto alla dieta con il 20% del medesimo liquido. Un andamento analogo lo si riscontra per le percentuali di L_3 e pupe che, sempre per la tesi con la concentrazione maggiore, hanno raggiunto rispettivamente il 40% ed il 23.3%. Il peso medio di quest'ultime si è aggirato attorno ai 29 mg e, pur formandosi l'adulto al loro interno questo non è successivamente sfarfallato.

I tempi di sviluppo, sia per la tesi con il 20% che per quella con il 30%, non differiscono tra di loro aggirandosi intorno ai 24 giorni (da L_1 estratta dopo 24 ore dall'ospite alla formazione della pupa), tempo tra l'altro molto simile a quello impiegato in laboratorio nelle medesime condizioni su *G. mellonella*.

Per quanto riguarda le diete A e B nessuna L_1 , pur vivendo 5-6 giorni, è mutata in L_2 .

La dieta C ha consentito di ottenere la muta di solo due L_2 , su 38, in L_3 ; queste presentavano un aspetto poco vitale caratterizzato da una scarsissima produzione di corpo adiposo e da un rigonfiamento generalizzato del corpo.

CONCLUSIONI

L'adozione del substrato a base di omogeneizzato di pupe di *G. mellonella*, per lo studio dell'influenza del tempo di permanenza delle L_1 di *P. rufifrons* nell'ospite sullo sviluppo del parassita, è dovuta al fatto che, a tutt'oggi, questo tipo di dieta è quella che consente di ottenere i risultati migliori.

Abbiamo stabilito definitivamente, almeno per il Tachinide considerato, che il tempo di permanenza della larva nell'ospite riveste una notevole importanza per lo sviluppo nello stadio successivo. Infatti più le larvette rimangono nel corpo dell'ospite (da 96 a 168 ore) più le percentuali di L_2 sono elevate.

Anche i tempi di sviluppo hanno risentito delle diverse condizioni sperimentali.

tali risultando, come descritto in precedenza, inversamente proporzionali al tempo di permanenza.

Le cause di questi risultati possono essere molte, tra le più probabili si menzionano:

a) l'entomofago ha la necessità di nutrirsi per qualche tempo nell'ospite vivo, dal quale mutuerebbe dei metaboliti fondamentali per il suo sviluppo;

b) le larve durante le prime fasi di crescita sono molto delicate e la loro manipolazione potrebbe causare uno «stress» che le danneggerebbe irrimediabilmente;

c) le larvette molto giovani non sono in grado di «aggredire» il nuovo substrato per cui subiscono una sorta di crisi di adattamento;

d) l'elevata sensibilità delle giovani larvette alle colonie batteriche ed ai loro metaboliti. Infatti non sterilizzando il substrato, la presenza di microrganismi appartenenti ai generi *Styptococcus* e *Bacillus* è risultata frequente.

Un comportamento simile, a quello riscontrato per *P. rufifrons*, era già stato evidenziato da Nettles *et al.* (1980) per le larve di prima età di *E. bryani* che, se prelevate dall'ospite dopo sole 6-8 ore e poste su dieta artificiale meridica, presentavano una forte mortalità che invece non si riscontrava se erano estratte dopo 24 ore. Se il risultato conseguito ha una sua validità in funzione dello sviluppo da L₁ ad L₂, non altrettanto si può affermare riguardo agli altri stadi larvali. Infatti nè il numero di L₃, nè quello di pupe e di adulti pare risentire delle diverse condizioni di partenza delle larvette.

A differenza di *P. rufifrons*, *E. bryani* e *Palexorista laxa* (Curran) hanno manifestato una forte correlazione fra il tempo di permanenza delle larve nell'ospite e le percentuali di pupe ed adulti ottenuti su dieta artificiale (Bratti e Nettles, in corso di stampa). Lo stesso dicasi per un altro Tachinide, *Lydella thompsoni* (Hert.), il cui accrescimento su dieta meridica si è avuto solamente partendo da larve rimaste almeno 96 ore nelle larve di *Ostrinia nubilalis* Hübner (Bratti, 1989 b).

La scelta dei vari substrati a base di emolinfa messi a confronto è stata fatta per la facilità di preparazione, i buoni risultati conseguiti per altri entomofagi (Strand e Vinson, 1985; Strand *et al.*, 1988; Xie *et al.*, 1986; Bratti e Nettles, 1988; Bratti, 1989 b) e l'elevato contenuto di ecdisteroidi (Sehnal *et al.*, 1981; Thompson *et al.*, 1969) che, come ipotizzato da Mellini (1975) e dimostrato da Fanti (1990), sono fondamentali per il passaggio da L₁ a L₂ di *P. rufifrons*.

Il succo pupale di *G. mellonella* è di gran lunga il più idoneo, anche se le larvette cresciute in emolinfa di *M. sexta* hanno mostrato caratteristiche vitali soddisfacenti. Quest'ultima, per un altro Tachinide *P. laxa*, addizionata a farina di soia, ha consentito di ottenere lo sviluppo da L₁ fino allo stato adulto (Bratti e Nettles, 1988).

Un risultato negativo si è avuto con l'estratto emolinfatico di pupe di Ditteri Calliforidi che non si è rivelato particolarmente funzionale per lo sviluppo delle L₁, poichè, dopo pochi giorni, manifestava una forte coagulazione che ne causava la morte.

L'analisi effettuata sul liquido estratto dalle pupe di *G. mellonella* indica un profilo aminoacidico caratterizzato da una elevata concentrazione di acido glutammico e lisina, riscontrata anche da Florkin e Jeuniaux (1974) per l'analisi dell'emolinfa di pupe di Sfingidi e Saturnidi e da Mitsuashi (1978)⁽²⁾ per quella dell'emolinfa delle larve di ultima età di *G. mellonella*. Un dato invece contrastante, rispetto a quello rilevato dai predetti Autori, è la concentrazione di prolina la quale è, nel succo sperimentato, presente in concentrazioni estremamente basse.

Le diete meridiche saggiate, che hanno permesso lo sviluppo fino allo stadio pupale con la relativa formazione interna dell'adulto, sono quelle costituite dal 20 e 30% di estratto di *G. mellonella*. Soprattutto l'ultima ha mostrato di essere particolarmente gradita alle larvette del Tachinide e una valida dimostrazione è data dal fatto che i tempi di sviluppo, per raggiungere i vari stadi, sono stati molto simili a quelli *in vivo*. In queste diete è stata impiegata, come base, quella olidica predisposta da Nettles (1986) diluita del 50%. Il motivo della diluizione deriva dal fatto che, da prove preliminari, l'utilizzazione della dieta non diluita, addizionata al succo emolinfatico, provocava la fuga ed una elevata mortalità delle larvette, molto probabilmente dovuta ad una concentrazione eccessiva di alcuni costituenti. Il contenuto elevato di aminoacidi liberi presenti potrebbe innalzare eccessivamente la pressione osmotica che, come riportato da Grenier *et al.* (1986), è un parametro molto critico per i Tachinidi.

Altri entomofagi sono stati allevati con successo su diete di questo genere. *Pteromalus puparum* L. è stato allevato fino allo stadio adulto in emolinfa di *Heliothis zea* (Boddie) trattata con calore e diluita con acqua distillata sterile (Hoffman e Ignoffo, 1974). *Trichogramma pretiosum* Riley si è sviluppato fino allo stadio adulto sopra una dieta costituita da una percentuale oscillante tra il 30 e il 40 % di emolinfa proveniente da larve di *M. sexta* (Xie *et al.*, 1986; Strand e Vinson, 1985). *P. laxa*, è stata allevata fino allo stadio adulto con una dieta costituita per l'80% da emolinfa dello stesso Sfingide (Bratti e Nettles, 1988).

Gli effetti positivi, esercitati su numerose specie di parassitoidi da componenti dell'ospite come l'emolinfa, quando vengono addizionati a diete contenenti la maggior parte delle sostanze indispensabili per la loro crescita e sviluppo, sembra indicare, almeno per alcune specie, una dipendenza da «fattori di crescita» presenti nell'ospite stesso (Nettles, 1990). Per *P. rufifrons*, sicuramente un fattore fondamentale è dato dall'ecdisione, senza il quale, come dimostrato dalle due diete prive di componenti dell'ospite (A e B), non si assiste a nessuno sviluppo. Di conseguenza, dal punto di vista pratico, per allevare con successo questo parassitoide su diete artificiali è necessario, oltre all'individuazione della

⁽²⁾ È importante ricordare che questi Autori hanno eseguito l'analisi calcolando la percentuale di aa liberi dell'emolinfa, mentre l'analisi da noi effettuata si riferisce agli aminoacidi liberi più quelli contenuti nelle varie proteine.

concentrazione ottimale dei componenti nutrizionali, l'aggiunta di ecdisteroidi. Questi possono essere somministrati come prodotto chimico puro (Fanti, 1990) ovvero tramite estratti di pupe o di larve, che anche se impiegati in quantità non eccessive appaiono sufficienti per l'allevamento massale di *P. rufifrons*.

RIASSUNTO

La ricerca è stata svolta sul parassitoide larva-pupale *Pseudogonia rufifrons* Wied. ed è articolata in tre parti. Nella prima, utilizzando un omogeneizzato di pupe (Bratti e Monti, 1988), abbiamo studiato quanto il tempo di permanenza delle larvette di I età del parassita, nelle larve dell'ospite, incidesse sul suo successivo sviluppo. Dai risultati è emerso che, per ottenere elevate percentuali di L₂ (≈ 95%), le L₁ devono nutrirsi per almeno 96 ore nella larva ospite, mentre non si è trovata nessuna correlazione tra tempo di permanenza delle L₁ e percentuali di L₃, pupe ed adulti.

Nella seconda parte, sempre per le larve di prima età, abbiamo confrontato tre succhi emolin-fatici (da pupe di *Galleria mellonella* L., da pupe di Ditteri Calliforidi, da larve mature di *Manduca sexta* L.), al fine di individuare quello che permettesse la percentuale di muta più elevata nello stadio seguente. Il liquido che ha consentito di ottenere la percentuale di L₂ più elevata è stato quello di *G. mellonella* (≈90%). Dall'analisi del suo spettro aminoacidico, effettuata con un Aminoanalyzer Beckman Unicrom, risulta una concentrazione elevata di acido aspartico 1.02%, glicina 0.94%, acido glutammico 0.86%, e lisina 0.74%, (percentuali calcolate sul totale). Questi dati risultano importanti in quanto consentono di formulare diete meridiche in grado di soddisfare le esigenze nutrizionali del parassitoide.

Infine abbiamo sperimentato alcune diete meridiche, basate su quella predisposta da Nettles per *Eucelatoria bryani* Sab. (1986). Due di queste contenevano il 20 ed il 30% del succo emolin-fatico delle pupe di *G. mellonella*. Quest'ultima ha consentito di ottenere una produzione di L₃ e di pupe rispettivamente del 40 e del 23.3%. Alcuni adulti si sono formati all'interno dei pupari senza in seguito sfarfallare.

Il fatto che solo nelle diete addizionate di componenti dell'ospite si sia ottenuto un certo grado di sviluppo sembra dimostrare, almeno per alcune specie di parassitoidi, una dipendenza da «fattori di crescita» presenti nell'ospite stesso (Nettles, 1990).

Per *P. rufifrons* sicuramente uno di questi è rappresentato dall'ecdisione senza il quale, come ipotizzato da Mellini (1975) e dimostrato da Fanti (1990), il parassitoide non muta da L₁ a L₂.

L'ormone può essere somministrato come prodotto chimico puro, ovvero tramite estratti di pupe o di larve che, se impiegati in quantità modeste, risultano idonei per un eventuale allevamento massale.

In vitro rearing of *Pseudogonia rufifrons* Wied. Trials on meridic and host component diets

SUMMARY

The research concerns the larval-pupal parasitoid *Pseudogonia rufifrons* Wied.

We divided the work in three parts. In the first, using a pupal homogenate diet (Bratti e Monti, 1988), we studied the influence of the first instar maggots stay in the host on the following parasitoid development «in vitro».

The results show that for reaching a high percentage of second instar, the maggots have to feed in the host at least 96 hrs. No relationship has been found between first instar maggots stay in the host and adult yields.

In the second part we compared three different kinds of haemolymph (from *Galleria mellonella* L. and Calliphoridae pupae, and from *Manduca sexta* L. full-grown larvae). The goal was to find out the most suitable of them for the first instar maggot development. We had the better results using *G. mellonella* haemolymph (i.e. 90% of second instar maggots). The aminoacid analysis of the latter haemolymph, made by Aminoanalyzer Beckman Unichrom, shows a high concentration of aspartic acid 1.02%, glycine 0.94%, glutamic acid 0.86%, and lysine 0.74% (percentages on the total liquid amount). These data might be useful to prepare diets satisfying parasitoid nutritional needs.

Then we tested some meridic diets based on Nettles' diet (1986): two of them containing 20 and 30% of *G. mellonella* haemolymph. On the last mentioned, we achieved a percentage of third instar maggots and pupae respectively of 40 and 23.3%. Pharate adults are formed but no emergence occurred. We only obtained third instar maggots and pupae on diets with host components. This result points out, at least for some species, a strong influence of «host growth factors» on parasitoid development (Nettles, 1990).

Ecdysone could be considered an host factor for *P. rufifrons*; as thought by Mellini (1975) and proved by Fanti (1990), the maggots molt in the second instar only in the presence of this hormone. We can obtain the same second instar maggot yields adding in diets both ecdysone, like a pure chemical product and, as we reported in this research, by using small amounts of pupae and larvae haemolymph.

KEY WORDS: Pupal homogenate
Parasitoid
Aminoacids
Tachinidae
Haemolymph
Artificial medium

BIBLIOGRAFIA CITATA

- BONNOT G., DELOBEL B., GRENIER S., 1984.- Elevage, croissance et développement de *Phryxe caudata* Rond. (Diptera: Tachinidae), sur son hôte de substitution *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera) et sur milieux artificiels. - *Bull. mens. Soc. Linn. Lyon*, 53(9): 313-320.
- BRATTI A., 1989 a. - Allevamento *in vitro* degli stadi larvali dei Ditteri Tachinidi. - Tesi di Dottorato di ricerca in Entomologia Agraria. Univ. di Bologna 233 pp.
- BRATTI A., 1989 b. - Allevamento *in vitro* di *Pseudogonia rufifrons* Wied. in estratti di omogeneizzato di crisalidi di *Galleria mellonella* L. e su diete meridiche. - *Boll. Ist. Ent. "Guido Grandi" Univ. Bologna.*, 44: 11-22.
- 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. "Guido Grandi" Univ. Bologna.*, 43: 115-126.
- BRATTI A., NETTLES W.C., 1988. - *In vitro* rearing of *Palexorista laxa* (Curran) (Diptera: Tachinidae) on haemolymph-based diets. - *Boll. Ist. Ent. "Guido Grandi" Univ. Bologna*, 43: 25-30.
- FANTI P., 1990. - Fattori inducenti la prima muta larvale del parassitoide *Pseudogonia cinerascens* Wied. in substrati di crescita *in vivo* e *in vitro*. - *Boll. Ist. Ent. "Guido Grandi" Univ. Bologna*, 45: 47-59.
- FLORKIN M. JEUNIAUX C., 1974. - Haemolymph: composition. - In: Rockstein M. - The physiology of insecta. Vol. 5, II ed., 255-307, Academic Press N.Y..
- GRENIER S., DELOBEL B., BONNOT G., 1986. - Physiological considerations of importance to the success of *in vitro* culture: an overview. - *J. Insect Physiol.*, 32: 403-408.
- HOFFMAN J. D., IGNOFFO C. M., 1974. - Growth of *Pteromalus puparum* in a semisynthetic medium. - *Ann. Ent. Soc. Am.*, 67: 524-525.
- MELLINI E., 1975. - Studi sui Ditteri Larvevoridi. XXV. Sul determinismo ormonale delle influenze esercitate dagli ospiti sui loro parassiti. - *Boll. Ist. Ent. Univ. Bologna*, 31: 165-203.

- MITSUHASHI J., 1978. Free amino acids in the haemolymph of some Lepidopterous insects, II. - *Ent. Zool.*, 13: 318-320.
- NETTLES W. C. JR., 1986. - Effects of soy flour, bovine serum albumin, and three amino acid mixtures on growth and development of *Eucelatoria bryani* (Diptera: Tachinidae) reared on artificial diets. - *Environ. Entomol.*, 15: 1111- 1115.
- NETTLES W. C. JR., 1990. - *In vitro* rearing of parasitoids: role of host factors in nutrition. - *Arch. Insect Physiol.*, 13: 167-175.
- NETTLES W. C. JR., WILSON C. M., ZISER S. W., 1980. - A diet and methods for the *in vitro* rearing of the tachinid, *Eucelatoria* spp. - *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 73: 180-184.
- SEHNAL F., MAROY P., MALA J., 1981. - Regulation and significance of ecdysteroid titre fluctuations in lepidopterous larvae and pupae. - *J. Insect. Physiol.*, 27: 535-544
- SNEDECOR G. W., COCHRAN W. G., 1980. - Statistical Methods. - *Iowa State University Press, Ames.*
- STRAND M. R., VINSON S. B., 1985. - *In vitro* culture of *Trichogramma pretiosum* on an artificial medium. - *Entomol. exp. appl.*, 39: 203-209.
- STRAND M. R., VINSON S. B., NETTLES W. C. JR., XIE Z. N., 1988. - *In vitro* culture of egg parasitoid *Telenomus heliothidis*: the role of teratocytes and medium consumption in development. - *Entomol. exp. appl.*, 46: 71-78.
- THOMPSON S. N., 1983. - *Brachymeria lasus*: effects of nutrient level on *in vitro* larval growth of a chalcidoid insect parasite. - *Environ. Parasitol.*, 55: 312-319.
- THOMPSON S. N., 1986. - Nutrition and *in vitro* culture of insects parasitoids. - *Ann. Rev. Entomol.*, 31: 197-219.
- THOMSON J. A., SIDDALL J. B., GALBRAITH M. N., HORN D. H. S., MIDDLETON E. J. (1969). - The biosynthesis of ecdysones in the blowfly *Calliphora stygia*. - *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 669-670.
- XIE Z. N., NETTLES W. C. JR., MORRISON R. K., IRIE K., VINSON S. B., 1986. - Three methods for the *in vitro* culture of *Trichogramma pretiosum* Riley. - *J. Entomol. Sci.*, 21: 133-138.