

EGIDIO MELLINI, GUIDO CAMPADELLI, GIUSEPPE GARDENGHI  
Istituto di Entomologia "G. Grandi", Università di Bologna

## Sulle tecniche di inoculazione del pabulum per l'allevamento "in vitro" del parassitoide *Exorista larvarum* (L.). (\*) (1)

(Ricerche eseguite col contributo del M.U.R.S.T. 40%)

### INTRODUZIONE

Nel tentativo di ottimizzare ulteriormente la produzione di *Exorista larvarum* (L.) su diete artificiali, abbiamo voluto verificare se le modalità di deposizione delle uova sul pabulum, e cioè la loro positura e la loro distribuzione all'interno dei contenitori, nonché le dimensioni di questi ultimi potessero influire sulle rese in pupari. In genere le suddette operazioni non comportano aggravii sensibili nella gestione degli allevamenti per cui potrebbero essere adottate le soluzioni migliori in termini di produttività.

Si è voluto inoltre controllare, ancora una volta, gli effetti dell'aggiunta alla dieta di modeste percentuali di omogeneizzato larvale autoclavato dell'ospite di sostituzione *Galleria mellonella* L., confrontandone le rese in pupari con le diete cui è stato invece addizionato estratto larvale della stessa *Galleria* nonché con quelle, di pari composizione, però del tutto prive di materiali provenienti dall'ospite.

### MATERIALE E METODO

La dieta usata in tutte le prove, esclusa l'ultima, è la seguente:

Latte magro	Omogeneiz. larve <i>Galleria</i>	Lievito birra	Tuorlo uovo fresco	Saccarosio
75%	5%	6%	12%	2%

(\*) Lavoro accettato il 2 gennaio 1997.

(1) Studi sui Ditteri Tachinidi. LXXIII contributo.

Le diete, inizialmente liquide, sono state al solito gelificate mediante l'aggiunta di agar in ragione dell' 1,5%; ad esse è stato inoltre addizionato solfato di gentamicina (0,006%) in funzione antimicrobica.

Per ogni prova sono sempre stati tenuti i controlli "in vivo", al fine di verificare la vitalità delle uova impiegate nella sperimentazione, ed inoltre sono state effettuate 4 ripetizioni.

A proposito delle uova, va precisato che in molte di esse l'embriogenesi può trovarsi in fasi più o meno avanzate, visto che le femmine, qualora lasciate prive di ospiti, le trattengono a lungo nella grossa vagina piriforme (Mellini et alii, 1993) prima di abbandonarle su substrati inerti.

Nel corso della sperimentazione si sono verificati solo sporadici casi di inquinamento delle diete, peraltro lievi, ad opera di colonie batteriche che non hanno patentemente influito sulla produzione dei pupari. Va ricordato infatti che *Exorista larvarum* dimostra *in vitro* una buona resistenza alla contaminazione del pabulum, così come sopporta bene, *in vivo*, la morte precoce dell'ospite in seguito a batteriosi ed a virosi.

Sono stati sottoposti ad indagine i seguenti punti.

#### 1. Importanza della positura delle uova sul pabulum.

Premesso che le uova macrotipiche sono asimmetriche sull'asse dorso-ventrale, esse vengono deposte in modo che la superficie ventrale, leggermente concava ed a corion molle e coloso, aderisca al tegumento dell'ospite. È pertanto ovvio chiedersi se, nel collocare le uova sul pabulum, positura diverse da quella naturale possano influire sulle prime fasi dell'ontogenesi del nostro parassitoide e di conseguenza sulla resa finale dell'allevamento.

Allo scopo sono state saggiate le positura più comuni, come prospettato nello schema sottostante.

Tesi A. Uova deposte con il corion ventrale aderente al pabulum, come accade *in vivo*.

Tesi B. Uova deposte con il corion dorsale a contatto del pabulum, perciò capovolte rispetto alla posizione naturale.

Tesi C. Uova coricate su un fianco, anche se tale positura non è sempre bene realizzabile.

Tesi D. Uova imbrattate mediante loro rotolamento sul pabulum molliccio.

Va osservato che le differenze tra le tesi C e D risultano in definitiva piuttosto modeste, dato che la collocazione di cui al punto C viene spesso ottenuta, essendo il substrato assai tenero, con manovre che finiscono con l'impiastricciare le uova di pabulum.

Le prove sono state al solito condotte entro capsule Petri del diametro di 5 cm, rifornite con 6,5 cc di pabulum e con 30 uova. Queste ultime sono state distribuite in maniera standard nelle 4 tesi, e cioè disseminate isolatamente in tutto il contenitore, esclusa la fascia periferica.

#### 2. Importanza della distribuzione, in gruppo od isolate, delle uova sul pabulum.

Allo scopo di verificare se questo aspetto delle tecniche di inoculazione abbia qualche influenza sulla resa in pupari, sono state impostate 4 tesi. Ricerche

recenti (Mellini e Campadelli, 1996 b) hanno infatti dimostrato che *E. larvarum* è un parassitoide a comportamento intermedio tra quello proprio delle forme gregarie e quello delle solitarie; è pertanto verosimile che un affollamento iniziale delle larve sgusciate da uova contigue possa incrementarne la tendenza ad abbandonare il contenitore d'allevamento.

Il carico di 32 uova, per ciascuna capsula Petri del diametro di 5 cm, è stato collocato sul pabulum nel seguente modo:

Tesi A: in un unico gruppo posto al centro della capsula.

Tesi B: in 4 gruppi, di 8 elementi ciascuno, posti in circolo a circa 1,5 cm dal centro.

Tesi C: in 8 gruppi, di 4 elementi ciascuno, sparsi per tutta la capsula esclusa la fascia periferica.

Tesi D: uova distribuite isolatamente su tutto il pabulum con esclusione dell'area marginale.

### 3. Importanza della dislocazione centrale o periferica delle uova.

Dato che le larvette neosgusciate migrano più o meno a lungo sul pabulum, prima di infossarsi, e che varie si arrampicano sulle pareti della capsula Petri fino a raggiungere il coperchio, ove nel giro di qualche giorno muoiono di inedia, si è voluto verificare se tale esodo possa essere favorito da una localizzazione delle uova alla periferia del contenitore.

Allo scopo sono state predisposte le seguenti 4 tesi in altrettante capsule Petri del diametro di 5 cm.

A. Uova sparse nella fascia periferica della capsula.

B. Uova sparse nell'area centrale.

C. Uova riunite in 4 gruppi, di 8 elementi ciascuno, dislocati alla periferia.

D. Uova riunite in 4 gruppi, di 8 elementi ciascuno, localizzati nell'area centrale.

Le tesi C e D, con uova disposte in piccoli gruppi, sono state inserite, in sintonia con la prova precedente, nell'ipotesi che la fuga delle larve neonate possa essere favorita, oltre che dalla localizzazione periferica, anche da condizioni di affollamento.

In ogni capsula sono stati versati 6,5 cc di pabulum e collocate 32 uova.

### 4. Importanza dell'ampiezza del contenitore.

Si è voluto accertare se allargando la superficie del pabulum, aumenta, a parità di numero di uova introdotte, la produzione dei pupari. Le larve infatti, come già riferito, tendono a migrare a lungo sul substrato fino a portarsi spesso ai margini del contenitore, ove finiscono per infossarsi proprio a ridosso delle pareti. Parrebbe quindi logico supporre che, ampliando la superficie del substrato, sia possibile limitare tale dispersione.

Sono stati perciò messi a confronto contenitori con diametro variante da 7 a 90 mm, secondo il seguente schema sperimentale.

Tesi A. Piastre multicellari con pozzetti del diametro di 7 mm (superficie 0,384 cm<sup>2</sup>): 20 uova in altrettante celle.

Tesi B. Piastre multicellari con pozzetti del diametro di 17 mm (superficie 2,268 cm<sup>2</sup>): 20 uova in altrettante celle.

Tesi C. Capsule Petri del diametro di 5 cm (superficie 19,625 cm<sup>2</sup>): 20 uova disseminate nell'area centrale.

Tesi D. Capsule Petri del diametro di 9 cm (superficie 63,58 cm<sup>2</sup>): 20 uova disseminate nell'area centrale.

La quantità di pabulum è variata nelle diverse tesi allo scopo di garantirne uno spessore sufficiente anche nei contenitori più ampi. Così si è passati da uno spessore massimo, pari a 6 mm nella tesi A, ad un minimo di mm 2,5 nella tesi D. Le larve di *Exorista* crescono infatti abbastanza bene pure in strati sottili di pabulum, anche se possono manifestarsi inconvenienti (Mellini e Campadelli, 1996 a). Quello più comune consiste nel suo progressivo disseccamento; quello più grave si manifesta quando esso è precocemente e fortemente contaminato da batteri o muffe, poichè le larve, non avendo la possibilità di nutrirsi in strati profondi non inquinati, finiscono col soccombere o restare fortemente nanizzate.

##### 5. Effetti dei materiali provenienti dall'ospite.

Poichè riteniamo che tali componenti, pur non essendo indispensabili, siano utili in quanto possibile "ponte biochimico" tra i due simbionti (Mellini et alii, 1996), si è voluto individuare quali siano preferibili. In precedenti ricerche, intese a migliorare la resa delle colture *in vitro*, si è constatato che le diete arricchite con piccoli quantitativi di omogeneizzato autoclavato (5-10%), sia di larve che di crisalidi di *Galleria mellonella*, danno rese in pupari sensibilmente inferiori a quelle che ne sono del tutto prive (Mellini e Campadelli, 1996 a). Nella presente indagine si è perciò voluto sperimentare, comparativamente, l'uso dei relativi estratti, da noi abbandonati da qualche tempo per l'alto costo della loro preparazione. Tra l'altro gli estratti, la cui resa in termini quantitativi è minima rispetto al materiale di partenza, vengono sterilizzati mediante microfiltrazione, mentre gli omogeneizzati lo sono stati, almeno finora, mediante autoclave a 120 °C per 10 minuti.

Le diete utilizzate compaiono nella sottostante tabella (i quantitativi dei vari ingredienti sono espressi in percentuale).

Tesi	Omogen. larve <i>Galleria</i>	Omogen. crisal. <i>Galleria</i>	Estratto larve <i>Galleria</i>	Estratto crisal. <i>Galleria</i>	Latte magro	Lievito birra	Tuorlo uovo	Saccarosio
A	-	-	-	-	80	6	12	2
B	10	-	-	-	70	6	12	2
C	-	10	-	-	70	6	12	2
D	-	-	10	-	70	6	12	2
E	-	-	-	10	70	6	12	2

Le prove sono state condotte in capsule Petri del diametro di 5 cm, rifornite con soli 6,5 cc di pabulum e con 30 uova ciascuna. Per la collocazione delle uova sul pabulum, si è tenuto conto dei risultati della prova precedente, adottando in tutte le tesi una distribuzione sparsa, con l'esclusione di una fascia periferica larga circa 1 cm.

## RISULTATI

### 1. Importanza della positura delle uova sul pabulum.

In pratica, come mostra la sottostante tabella, non si notano differenze apprezzabili, nei parametri rilevati, tra le varie tesi. La resa in pupari si è infatti mantenuta sullo stesso livello medio, alquanto al di sotto del 50%. Pure i pesi dei pupari non differiscono, collocandosi su una media generale di 46 mg, con scarto di appena 3 mg fra le tesi estreme. Anche le percentuali di sfarfallamento, aggirantisi sull' 80%, non mostrano variazioni apprezzabili.

Tesi	N° pupari	Resa pupari/ uova (%)	Peso medio pupari (mg)	Sfarfallamento (%)
A	47	39,16	45,27	82,97
B	51	42,50	46,12	80,39
C	55	45,83	46,72	80,00
D	49	40,83	48,49	79,59

Si è poi rilevato che nelle tesi C e D la fuga delle larve neonate, verso il coperchio delle capsule Petri, è minima in confronto a quanto registrato nelle altre due tesi. Ciò pareva rappresentare un vantaggio che però non si è tradotto in una significativa maggiore produzione di pupari.

Tutti i dati soprariportati sono utili ai fini di un allevamento massale *in vitro* di questo Tachinide. Non è infatti necessario, durante le operazioni di inoculo, impiegare tempo per curare la positura delle uova sul substrato trofico, dal momento che le varie posizioni si equivalgono nei riguardi della produzione finale di adulti.

### 2. Importanza della distribuzione, a gruppi o isolate, delle uova sul pabulum.

Considerata la decisa tendenza delle larve neonate a migrare sul pabulum fino, non di rado, a disperdersi sulle pareti e sul coperchio delle capsule Petri, si è voluto accertare se su tale comportamento potessero influire le modalità di inoculazione con uova riunite in gruppo ovvero isolate. In ogni caso in tutte le tesi, per quanto in misura variabile, una consistente aliquota di larve forma gli imbuti respiratori alla periferia delle capsule, in prossimità delle pareti o addirittura alla loro base.

Come si può rilevare dalla sottostante tabella, la produzione dei pupari appare alquanto più elevata nelle tesi C e D, dove le uova sono sparse in gruppi minimi (C) o addirittura disseminate ad una ad una (D) su tutta la superficie del pabulum, esclusa una stretta fascia periferica. Tale risultato sembra indicare un effetto tendenzialmente negativo dell'affollamento per le larve che sguscieranno. La resa in pupari, riferita al numero delle uova, è infatti salita da un minimo del 43,75% nella tesi B ad un massimo del 67,96% nella tesi D, cioè quella con le uova maggiormente disperse.

Tesi	N° pupari	Resa pupari/uova (%)	Peso medio pupari (mg)	Sfarfallamento (%)
A	64	50,00	46,93	57,81
B	56	43,75	48,22	85,71
C	74	57,81	45,78	63,51
D	87	67,96	48,46	58,62

Per quanto riguarda il peso medio dei pupari, non vi sono differenze tra le varie tesi, come peraltro c'era da attendersi considerato che la dieta era uguale per tutte. Per quanto concerne gli sfarfallamenti, si nota una percentuale sensibilmente più elevata per la tesi B ove si è avuta una minore produzione di pupari. Anche nel corso di altre sperimentazioni si è notata una simile relazione. Essa potrebbe essere spiegata in base alle seguenti considerazioni. L'affollamento delle larve mature ed il loro conseguente protratto girovagare alla ricerca di un posto idoneo ove impuparsi, nello spazio relativamente ristretto della capsula Petri, porta alla formazione di una miscela melmosa costituita da feci e da pabulum residuo, che imbratta i pupari nonché pareti e coperchio della capsula, riducendo verosimilmente gli scambi gassosi per le pupe. Ciò è apparso particolarmente evidente nella III e IV replica in cui era stato dimezzato il quantitativo di pabulum per contenitore, mentre la produzione dei pupari si è conservata su buoni livelli.

L'esame dei 98 pupari, da cui non sono sfarfallati gli adulti, ha evidenziato che essi contenevano in alta percentuale eopupe o pupe morte in fasi giovanili, ovvero apparivano collassati, mentre una modesta aliquota presentava adulti morti perfettamente formati e pigmentati ma incapaci di sfondare la calotta cefalica del pupario.

Tutto sommato, si conclude che le modalità di inoculazione del substrato trofico non hanno avuto soverchia importanza agli effetti della produzione di adulti. Tuttavia se le uova sono disseminate isolatamente si ha una tendenziale maggiore produzione di pupari che però resta inficiata, almeno nelle condizioni sperimentali adottate, da più basse percentuali di sfarfallamento.

Comunque, in generale, appare consigliabile sparpagliare le uova sul pabulum il più possibile e, per impedire un eccessivo affollamento, pregiudizievole per gli sfarfallamenti, basta diminuire il carico di uova per capsula.

### 3. Importanza della dislocazione centrale o periferica delle uova sul pabulum. I dati ottenuti nelle 4 ripetizioni sono riuniti nella sottostante tabella.

Tesi	N° pupari	Resa pupari/uova (%)	Peso medio pupari (mg)	Sfarfallamento (%)
A	54	42,18	52,59	57,40
B	56	43,75	51,09	58,92
C	60	46,87	53,03	51,66
D	63	49,21	52,00	41,26

Come si può rilevare, la resa in pupari praticamente si equivale in tutte le tesi. Ciò sembra significare che non ha alcuna importanza se le uova sono depositate nell'area centrale ovvero nella fascia periferica delle capsule Petri, nè se vengono distribuite singolarmente ovvero in 4 gruppi di 8 elementi ciascuno. Nella prova di cui al punto 2, per il vero impostata in modo alquanto diverso, erano invece emerse rese alquanto superiori nelle tesi a uova sparse.

Anche le medie ponderali dei pupari non differiscono nelle varie condizioni sperimentali, presumibilmente per il fatto che la dieta è uguale in tutte. Neppure le percentuali di sfarfallamento mostrano sensibili scarti, quando se ne escluda la tesi D che ha dato risultati decisamente inferiori. Pertanto la produzione del parassita non appare influenzata dal modello di dislocazione delle uova sul pabulum, sebbene quella periferica sembrasse, almeno logicamente, favorire l'esodo delle larvette dal substrato trofico.

Più in generale va rilevato che le percentuali di sfarfallamento sono insolitamente basse, superando di poco, nelle tesi A-B-C, il 50% e collocandosi addirittura sul 41% nella tesi D. Si è notato inoltre che la fuoriuscita degli adulti si è protratta, in tutte le tesi, per almeno 3-4 giorni, in relazione, in parte, alle differenti fasi raggiunte dall'embriogenesi al momento dell'inoculazione delle uova nel pabulum ed, in parte, all'imbrattamento dei pupari.

Se si analizzano le percentuali di sfarfallamento non cumulativamente, bensì nelle singole ripetizioni, si nota che esse sono tendenzialmente tanto più basse quanto più elevato è il numero dei pupari. Come si è già avuto occasione di rilevare, le condizioni di affollamento dei pupari sono pregiudizievoli per l'ulteriore corso dell'ontogenesi. Tali fenomeni si rendono molto evidenti allorquando le capsule Petri del diametro di 5 cm, da noi solitamente usate, vengono rifornite con soli 6,5 cc di pabulum, anzichè con l'usuale dose di 13 cc, mantenendo invece pressochè invariato il numero di uova (30/capsula). Considerando anche i dati precedenti a questo riguardo, emerge che con la stessa razione di 400 mg di pabulum per ogni pupario formatosi, quantitativo che è largamente abbondante per lo sviluppo larvale, si hanno elevate percentuali di adulti in condizioni di isolamento o di scarso affollamento, mentre se ne hanno di basse se questo è forte. In tale caso, come si è detto, i pupari risultano come intonacati da una vischiosa poltiglia costituita da una miscela omogenea di feci e di pabulum che, ricoprendo anche i corni respiratori della pupa sporgenti all'esterno, limitano gravemente il rifornimento di ossigeno. Per di più gli scambi gassosi fra le capsule e l'ambiente circostante, già modesto causa la discreta tenuta del coperchio, restano ulteriormente ostacolati dall'imbrattamento con il suddetto materiale. Ora, volendo quantificare, pare ragionevole non superare la soglia di una decina di pupari per capsula da 5 cm, qualora rifornita con soli 6,5 cc di pabulum, se si vuole ottenere una buona resa in adulti.

#### 4. Importanza dell'ampiezza del contenitore.

I dati sono compendati nella sottostante tabella.

Tesi	Diametro contenitore (mm)	N° pupari	Resa pupari/uova (%)	Peso medio pupari (mg)	Sfarfallamento (%)
A	7	37	46,25	37,97	45,94
B	17	36	45,00	42,67	88,88
C	50	46	57,50	56,83	60,87
D	90	33	41,25	59,51	87,87

Il numero dei pupari non è variato in funzione della superficie del contenitore, salvo che nella tesi C ove ha raggiunto il valore più alto, con una resa, rispetto alle uova impiegate (complessivamente 80 per ciascuna tesi), che supera largamente il 50%. Pertanto le capsule Petri del diametro di 50 mm, cioè quelle di gran lunga più utilizzate nel corso delle precedenti sperimentazioni, si dimostrano le più valide. Per il vero sorprende la brusca caduta nella resa registrata per la tesi D, ove la superficie del pabulum era massima.

I pesi medi dei pupari risultano, come ci si attendeva, nettamente più elevati nelle capsule Petri (tesi C e D) rispetto alle piastre multicellari, ove le razioni alimentari sono meno abbondanti (tesi B) o addirittura modeste (tesi A). Non si rilevano però differenze, a questo riguardo, tra le capsule del diametro di 50 mm e quelle di 90 mm, come del resto sono poco apprezzabili gli scarti ponderali tra i pupari formati singolarmente in cellette del diametro di 7 mm e quelli nelle celle di 17 mm. Nei pozzetti più esigui si nota un evidente disagio delle larve ad impuparsi con notevole allungamento dei tempi. I pupari inoltre si formano necessariamente in posizione verticale, mentre nelle altre tesi sono praticamente orizzontali.

Per quanto concerne le percentuali di sfarfallamento, i valori più bassi si riscontrano nelle cellette più piccole, in accordo con le difficoltà di impupamento, e nelle capsule di 50 mm in relazione all'affollamento; i valori più alti si sono registrati nei contenitori di 17 mm ove le larve erano isolate (tesi B) nonchè nelle grandi capsule Petri ove si trovavano disperse su una vasta superficie (tesi D). Tutto ciò costituisce una riprova dei danni derivati dall'affollamento in questo delicato periodo della vita dell'insetto.

In conclusione, dunque, non resta suffragata l'ipotesi di partenza, e cioè che la resa in pupari potesse aumentare con la ampiezza dei contenitori, in quanto fattore ostacolante l'esodo delle larve neonate. In pratica essa si equivale nelle celle più piccole di soli 7 mm di diametro e nelle capsule Petri di ben 90 mm dove la distanza delle uova, poste in posizione subcentrale, dalle pareti è di circa 40 mm contro i 3 mm soltanto delle esigue cellette. Ciò che varia è invece, come si è detto, il peso dei pupari che è decisamente superiore nelle capsule Petri rispetto alle piastre multicellari, nonchè i tempi di impupamento che sono invece più brevi nei larghi spazi.

5.- Effetti del materiale proveniente dall'ospite.

I dati ottenuti dalle varie prove sono riuniti nella sottostante tabella.

Tesi	N° pupari	Resa pupari/uova (%)	Peso medio pupari (mg)	Sfarfallamento (%)
A	65	54,16	57,59	80,00
B	42	35,00	59,23	71,42
C	33	27,50	61,74	81,81
D	83	69,16	61,28	53,01
E	78	65,00	59,17	66,66

Come si può rilevare, la resa in pupari è quasi dimezzata nelle diete con omogeneizzato, sia di larve (B) che di crisalidi (C), rispetto a quelle contenenti i relativi estratti (D e E). La dieta priva di materiali dell'ospite (A) si pone in posizione intermedia, avendo fornito una produzione decisamente superiore a quella con gli omogeneizzati dell'ospite. La produzione dei pupari, rapportata al numero delle uova messe in coltura, scende infatti dal 65-69% registrato per gli estratti, al 54% in assenza di materiali dell'ospite, per precipitare al 27,50-35,00 con gli omogeneizzati. Si ritiene che la bassa resa di questi ultimi ingredienti, fenomeno già notato in prove precedenti (Mellini e Campadelli, 1996 a), dipenda dalle modalità della loro sterilizzazione e cioè in autoclave a 120 °C per 10 minuti primi. Simili livelli termici alterano certamente gli omogeneizzati rendendoli addirittura negativi per la produttività, com'è dimostrato dal confronto con i dati ottenuti dalle diete che ne sono prive. Va anche rilevato che gli omogeneizzati ritardano di un paio di giorni il raggiungimento della maturità larvale, rispetto alle diete con estratti dell'ospite. Attualmente sono in corso ricerche per verificare se la pastorizzazione possa renderli efficaci quanto gli estratti che però sono enormemente più costosi.

Per quanto riguarda i pesi medi, i pupari si mantengono sugli stessi alti livelli in tutte le tesi, con valori di circa il 50% superiori a quelli realizzati *in vivo*: estratti ed omogeneizzati, sia di larve che di crisalidi, si equivalgono in riguardo a questo parametro, così come l'assenza di materiale proveniente dall'ospite. Va inoltre precisato che i pupari sono di taglia abbastanza uniforme, mancando, in tutte le tesi, individui nani e/o giganti.

Per quanto concerne le percentuali di sfarfallamento, si nota invece una netta caduta nelle tesi con gli estratti sia di larve che di crisalidi. Si ritiene che tale fenomeno non dipenda da questi materiali di per sè, bensì, dalla resa di pupari nelle relative tesi, resa ancora più accentuata dal fatto che tutte le capsule sono state rifornite con 6,5 cc di pabulum soltanto, anzichè con gli usuali 13 cc. Come si è già avuto occasione di rilevare, ciò comporta l'imbrattamento pressochè totale di molti pupari col vischioso amalgama di escrementi e di pabulum residuo, rimestati dalle larve mature durante la protratta ricerca di un posto idoneo per impuparsi. Le feci vengono emesse in parte alla superficie del pabulum, ove si presentano come larghe scie giallo-brunastre, dalle larve mature, ed in parte in masserelle irregolari nelle cavernosità del substrato scavate durante l'attività trofica; ma quando le larve sono numerose tutto il contenuto della capsula viene rimescolato in una massa quasi omogenea. Specialmente in tali situazioni vari

pupari risultano imperfetti ovvero depigmentati nell'area a contatto con siffatta poltiglia, con ricaduta negativa sugli sfarfallamenti. Dei 96 pupari da cui non sono fuoriusciti gli adulti, 26 apparivano collassati, 57 contenevano eopupe o, meno comunemente, pupe morte e 13 racchiudevano adulti completamente formati e pigmentati ma privi di vita.

## CONCLUSIONI

Alcuni aspetti tecnici, qui esaminati, dell'allevamento *in vitro* di *Exorista larvarum* su diete oligidiche molto semplificate, messe a punto nel corso di precedenti sperimentazioni, si sono rivelate, in contrasto con le ipotesi iniziali, di modesta o nessuna importanza pratica agli effetti della resa in pupari del parassitoide, rapportata al numero di uova messe in coltura.

1. La positura delle uova sul pabulum è apparsa un fattore indifferente. Anche la posizione con corion dorsale a contatto col substrato trofico, e quindi capovolta rispetto a quella naturale, ha fornito gli stessi risultati di quest'ultima sia nei riguardi della resa in pupari che dei tempi di sviluppo.

Ciò si spiega con la particolare dislocazione degli aeropili al margine anteriore e posteriore dell'uovo (cfr. Gapanov, 1995), per cui essi, anche nelle uova adagiate sul dorso, non restano occlusi dal substrato trofico. Qualora, invece, l'intero uovo venga imbrattato ad arte col pabulum, si manifestano ritardi (di circa 2 giorni) nei tempi di impupamento ma non una flessione nella produzione dei pupari. Che la occlusione dell'aeropilo non si riveli fatale dipende forse anche dal fatto che nelle uova da noi utilizzate lo sviluppo embrionale si trovava spesso in fasi più o meno avanzate. È vero che *E. larvarum* è una specie francamente ovipara ma, in mancanza degli ospiti, le femmine trattengono anche a lungo le uova entro la grossa vagina piriforme prima di scaricarle su substrati inerti. Poichè nelle gabbie di allevamento contenenti gli adulti del tachinide, le larve di *Galleria* vengono immerse ad intervalli di 2-3 giorni, ne consegue che le uova sono deposte ad embriogenesi già avviata. Certo è che le femmine si avventano immediatamente sugli ospiti appena introdotti, tanto che basta una esposizione variante da mezz'ora ad un'ora, conforme il numero di femmine presenti, perchè si realizzi una generale superparassitizzazione di grado elevato. Abbiamo anche constatato che tali uova possono schiudere pure se immerse in acqua sterile, ove le larvette neosgusciate si mantengono vive per diverse ore.

In conclusione quindi, dal punto di vista pratico, la traslazione delle uova sul substrato trofico risulta facilitata, visto che non occorrono particolari accorgimenti in riguardo alla loro positura.

Per inciso facciamo rilevare che questa plasticità di comportamento delle femmine verso una tendenziale ovoviviparità consente, almeno in laboratorio, di parassitizzare efficacemente anche larve non lontane dalla muta, la quale provoca il rigetto delle uova non schiuse. A tale variabilità nel comportamento degli adulti si aggiunge quello proprio delle larve che, fondamentalmente gregarie, possono, attraverso meccanismi fisiologici, decimare le consorelle fino a comportarsi addirittura come parassiti solitari (Mellini e Campadelli, 1996 b).

2. Importanza della distribuzione, in gruppo o isolate delle uova sul pabulum. Si è notata, a parità di numero di uova impiegate, una tendenziale maggiore resa in pupari nelle tesi in cui esse erano distribuite isolatamente ovvero in piccoli gruppi, rispetto a quelle con le uova strettamente contigue.

Che l'affollamento rappresenti un fattore negativo era del resto già emerso in ricerche precedenti nelle quali, all'aumento del numero delle uova, era corrisposta una produzione di pupari proporzionalmente minore (Mellini e Campadelli, 1996 a). Tali risultati sembrano in accordo con le caratteristiche di imperfetta gregarietà, esibita *in vivo* dalle larve della nostra *Exorista* (Mellini e Campadelli, 1996 b), che porta all'eliminazione di una parte più o meno cospicua delle larve coinquiline.

I pesi dei pupari sono pressochè uguali in tutte le tesi, non solo di questa prova ma pure della precedente, dato anche che la composizione della dieta ed i quantitativi somministrati sono identici.

Le percentuali di sfarfallamento degli adulti sono risultate alquanto minori nelle tesi con la più alta produzione di pupari. Ciò va posto in relazione con le maggiori difficoltà incontrate dalle larve mature per impuparsi in condizioni di più denso affollamento. Esse infatti si spostano a lungo, finendo con l'impastare il pabulum residuo e gli abbondanti escrementi semifluidi in una poltiglia vischiosa che imbratta i pupari, ostacolandone gli scambi gassosi nonché una normale sclerificazione e pigmentazione. Che l'affollamento porti ad un cattivo impupamento, e quindi ad una flessione negli sfarfallamenti, è stato rilevato anche in altre prove ed in particolare nelle capsule Petri ove, con un carico standard di uova (di solito una trentina), le razioni di pabulum erano dimezzate (6,5 cc) e purtuttavia più che abbondanti per le necessità delle larve in accrescimento.

3. Importanza della dislocazione centrale o periferica delle uova nei contenitori. Contro ad ogni aspettativa, la resa in pupari non è variata nelle diverse condizioni sperimentali. Ciò significa che la fuga delle larve neonate dal pabulum non è favorita dalla localizzazione delle uova nella fascia periferica delle capsule Petri.

Come era naturale attendersi, i pesi dei pupari hanno raggiunto lo stesso alto livello, attorno ai 50 mg, in tutte le tesi. Le percentuali di sfarfallamento sono invece apparse decisamente più basse della norma, in conseguenza del forte affollamento di larve mature in contenitori a pabulum dimezzato (6,5 cc). È interessante notare come in tali condizioni non si sia verificata una caduta nel peso medio dei pupari, ma solo nelle percentuali di sfarfallamento, a riprova che la razione alimentare era più che sufficiente e che la ressa di larve mature nuoce soprattutto all'espletamento delle metamorfosi.

4. Importanza dell'ampiezza del contenitore. In riguardo alla resa in pupari, il diametro delle celle (variante da 7 a 90 mm) è apparso pressochè ininfluenza; si sono notati infatti valori tendenzialmente più alti solo nelle capsule Petri di 50 mm, che sono i contenitori più largamente utilizzati nelle nostre ricerche presenti e passate. Poichè le uova erano state collocate, per tutte le tesi, nell'area centrale dei vari recipienti, i risultati confermano quelli della prova

precedente, sottolineando che la lontananza delle uova, dall'area periferica del pabulum, non limita l'intensità dell'esodo delle larve neonate.

Il peso medio dei pupari è aumentato considerevolmente, passando dalle strette celle delle piastre multicellari alle larghe capsule Petri; non presenta invece variazioni nell'ambito di ciascuna di queste due categorie di contenitori. Premesso che anche nelle celle più piccole le razioni di pabulum, pari a 250 mg, sono congrue per i bisogni delle singole larve, si ritiene che gli incrementi ponderali, registrati nei contenitori più ampi, non dipendano tanto dalle loro dimensioni, di per sé, quanto piuttosto dai ben più elevati quantitativi di pabulum introdotti al fine di ottenere uno spessore idoneo per la vita delle larve. In questo modo le feci, emesse durante tutto l'accrescimento, restano molto diluite e quindi in condizioni da non ostacolare l'attività trofica delle larve medesime.

Risultati del tutto simili erano stati ottenuti in precedenza (Mellini e Campadelli, 1996 a) dimezzando la quantità di pabulum, in contenitori standard, con numero di uova costante: la resa in pupari non è variata, mentre il loro peso è apparso minore in presenza di razioni alimentari decurtate, ma pur sempre di gran lunga superiori alle loro reali necessità.

5. Effetti del materiale proveniente dall'ospite. Si riconfermano le conseguenze negative dell'aggiunta alla dieta, in misura del 10%, degli omogeneizzati, sia di larve che di crisalidi, sterilizzati in autoclave a 120 °C. Le rese in pupari, rapportate al numero di uova impiegate, scendono infatti a circa la metà (27-35%) rispetto alle diete contenenti un pari quantitativo di estratto (65-69%), mentre si colloca su valori intermedi quella nelle diete del tutto prive di materiale dell'ospite (54%). Anche la durata dello sviluppo larvale ne risente, risultando sensibilmente allungata nelle diete contenenti omogeneizzati (di circa 2 giorni a 25 °C). Si ritiene che gli effetti negativi degli omogeneizzati dipendano dall'alterazione dei suoi componenti in seguito al trattamento termico subìto.

I pesi dei pupari si collocano invece sugli stessi alti livelli in tutte le tesi (57-61 mg). Le percentuali di sfarfallamento, all'opposto delle rese in pupari, sono assai più alte nelle tesi con omogeneizzati ed in quella che è priva di materiali dell'ospite, rispetto alle diete contenenti gli estratti. Tale caduta non dipende però dal tipo di materiali dell'ospite impiegati, bensì, come rilevato in precedenza, dal livello di affollamento delle larve mature che, se eccessivo, ostacola una regolare formazione dei pupari e una normale formazione degli adulti al loro interno. Pertanto in capsule Petri del diametro di 5 cm, e rifornite con soli 6,5 cc di pabulum, il numero dei pupari non dovrebbe superare la decina. Ciò significa, considerato che le rese in pupari su dieta priva di materiali dell'ospite si aggirano sul 50%, che il quantitativo di uova da introdurre in ciascuna capsula dovrebbe aggirarsi sulla ventina.

Va da ultimo considerato che una resa in pupari pari alla metà delle uova impiegate non è poi tanto modesta e comunque uguale, se non addirittura superiore, a quella *in vivo*. In questo caso, infatti, una discreta aliquota di uova si distacca dagli ospiti ed inoltre varie larve vanno perdute nelle vittime superparassitizzate a causa della imperfetta gregarietà del nostro parassitoide.

#### RIASSUNTO

Migliorate, semplificate, rese più economiche e di facile preparazione, nel corso di precedenti ricerche, le diete oligidiche per *Exorista larvarum*, vengono curati, in questo lavoro, soprattutto gli accorgimenti tecnici, nell'intento di incrementare, a parità di dieta, la produzione del parassitoide. Durante la presente sperimentazione sono stati ottenuti 1169 pupari dai quali sono sfarfallati 778 adulti. In particolare sono stati sondati i seguenti punti.

I. La positura delle uova sulla dieta non riveste importanza nei riguardi della resa in pupari. Pertanto resta facilitata, nella pratica, la loro traslazione sul pabulum. La posizione prona e quella supina delle uova si equivalgono per il fatto che l'aeropilo, sdoppiato, è localizzato al margine anteriore e a quello posteriore dell'uovo, per cui non viene comunque a contatto con il pabulum. Se l'aeropilo viene invece volutamente imbrattato con dieta, si nota soltanto un deciso ritardo nei tempi di impupamento delle larve sgusciate da tali uova.

II. La distribuzione delle uova sul pabulum, se isolate o in piccoli gruppi, porta ad una tendenziale maggiore produzione di pupari rispetto alle tesi con uova fortemente raggruppate. Ciò sembra indicare un possibile effetto negativo dell'affollamento per le larve di *Exorista* che, come si è accertato *in vivo*, si comportano solo in parte quali parassiti gregari. Alla maggiore resa in pupari si accompagna però una sensibile caduta nelle percentuali di sfarfallamento degli adulti cui, peraltro, può essere posto rimedio alleggerendo il carico di parassiti per capsula.

III. Non si sono rilevate differenze apprezzabili, nella resa in pupari, tra le tesi con uova dislocate nella zona centrale delle capsule Petri e quelle con uova distribuite nella fascia periferica. Tale risultato è sorprendente perchè, considerata la spiccata tendenza delle larve neonate a migrare sul pabulum e ad allontanarsene, sembrava logico supporre che la collocazione delle uova verso i margini del contenitore favorisse l'esodo del parassita. Le percentuali di sfarfallamento, alquanto variabili attorno al 50%, sono risultate insolitamente basse. Ciò va posto in relazione ad una buona produzione di pupari, da un lato, ed a quantitativi dimezzati di pabulum dall'altro, con conseguente forte affollamento di larve mature. Si è venuta così a formare, in seguito ai loro incessanti spostamenti, una poltiglia omogenea costituita da feci e da scarsi residui di dieta, che ha finito con l'intralcio l'impupamento e con l'imbrattare i pupari ostacolandone gli scambi gassosi.

IV. La resa in pupari, riferita al numero di uova impiegate, varia in misura modesta in funzione della superficie del contenitore (larghezze comprese tra i 7 e i 90 mm). Tuttavia le capsule Petri del diametro di 50 mm, da noi solitamente usate anche nelle passate sperimentazioni, hanno fornito risultati alquanto migliori. Viene pertanto a cadere, come del resto si è rilevato al punto precedente, l'ipotesi che il forte scarto tra il numero di uova utilizzate ed il numero dei pupari ottenuti, di solito aggirantesi attorno al 50%, sia in larga misura dovuto all'esodo delle larve neonate dai contenitori. Il parametro che varia decisamente è invece il peso dei pupari, caratterizzato da un forte incremento passando dai piccoli pozzetti delle piastre multicellari "alle ampie" capsule Petri. Tale fatto sembra in gran parte dovuto alla maggiore quantità di pabulum pro capite introdotto in queste ultime, al fine di mantenere uno spessore sufficiente; ciò ha consentito una forte diluizione delle feci emesse nella dieta dalle larve durante tutto il loro accrescimento. Per contro i tempi di impupamento si sono abbreviati, probabilmente anche in rapporto coi maggiori spazi disponibili per le larve mature pronte ad impuparsi.

V. Viene da ultimo confermato che nelle diete contenenti omogeneizzato, sia larvale che pupale dell'ospite di sostituzione *Galleria mellonella*, in ragione del 10% e sterilizzato in autoclave (120 °C), la resa in pupari, rapportata al numero di uova introdotte, risulta quasi dimezzata (27-35%) rispetto alle diete contenenti i relativi estratti (65-69%), mentre le diete del tutto prive di materiali provenienti dall'ospite si sono collocate in posizione intermedia (54%). Non si sono invece verificate ripercussioni sul peso dei pupari mantenutosi sullo stesso alto livello in tutte le tesi (57-61 mg). Le percentuali di sfarfallamento hanno subito una brusca caduta nelle tesi arricchite con gli estratti; tale fenomeno è però semplicemente dovuto al forte affollamento dei pupari, talora difettosi, ed in ogni caso completamente, o quasi, lordati da un vischioso amalgama di feci e resti di pabulum, ad opera delle larve mature alla ricerca di un posto idoneo ove impuparsi.

Pabulum inoculation techniques for the *in vitro* rearing of the parasitoid  
*Exorista larvarum* (L.)

SUMMARY

After having in previous studies improved and simplified the oligidic diets for *Exorista larvarum* and made them more economical and easy to prepare, special attention was given in this study to further enhancing parasitoid production for the same diet by adopting special techniques. 1169 puparia were obtained, out of which 778 adults emerged. In particular, the study examined the following aspects.

1. Position of the eggs on the pabulum. Puparia yield is not affected by the orientation of the eggs on the pabulum. This means that transfer of the eggs on the pabulum is in practice much simpler. Whether turned downwards or upwards makes no difference as the double aeropylar area is located both along the anterior and posterior edges of the egg so that it does not come into contact with the pabulum. In case of the aeropylar areas being intentionally smeared with the pabulum, only a marked delay in the pupation of the larvae emerged from these eggs may be observed.

2. Distribution of the eggs on the pabulum. When the eggs are isolated or distributed in small clusters on the pabulum, puparia yield tends to be higher than when the egg density is markedly greater. This seems to suggest that overcrowding adversely affects the development of *Exorista* larvae which, as has been observed *in vivo*, only partially behave as gregarious parasitoids.

It should however be noted that the increase in puparia yield is accompanied by a sensible drop in adult emergence rates. This situation however can be remedied by diminishing the number of parasites per dish.

3. No appreciable difference was observed in puparia yield between pabula with eggs placed in the central area of the Petri dish and those with eggs placed around the edges. This result is quite surprising when it is considered that the new-born larvae exhibit a marked tendency to move away from the pabulum, so that it may have been expected that the eggs located around the edges of the Petri dishes would have favoured the exodus of the parasite. Emergence rates, which somewhat varied around 50%, were unusually low. This finding is probably ascribable to the fact that puparia yield was fairly high and, moreover, that the normal amount of pabulum had been halved, so that there was a considerable overcrowding of the mature larvae. This led to the larvae continuously moving about in the pabulum, which in turn led to the formation of a homogeneous mash consisting of faeces and scarce pabulum residues which smeared the puparia and inhibited gas exchange.

4. Puparia yield as a function of container surface area. The surface of the containers (7 to 90 mm in width) was not found to significantly affect puparia yield. Notwithstanding, best results were obtained with the 50-mm diameter Petri dishes usually employed by us also in previous experiments. The hypothesis that the considerable percent difference (usually around 50%) between the number of eggs employed and that of the puparia obtained is to a large extent due to the exodus of the newborn larvae from the containers is thus once more disproved, as already noted in point 3 above. The parameter which seems to be most affected by this factor is instead puparia weight, which increases considerably between the small wells of the multi-well dishes and the relatively large Petri dishes. Such a result may be largely accountable by the fact that in the latter a greater amount of pabulum per capita is available to the larvae, as more pabulum is initially introduced so as to maintain sufficient medium thickness. Moreover, this set up also permits the faeces released in the pabulum by the larvae to become considerably diluted throughout the entire period of larval development. Pupation times are also shortened probably owing to the greater space available for the mature larvae about to pupate.

5. Diet composition. Finally, the present study has once more confirmed that puparia yield, for the same amount of eggs introduced, is reduced by almost half (down to 27-35%) in diets containing 10% of both larval or pupal homogenate (autoclaved at 120 °C) of the factitious host *Galleria mellonella* L. as compared to diets containing the relevant extracts (where puparia yield is 65-69%). Moreover, puparia yield in diets totally deprived of host-derived material was confirmed to be at an intermediate rate (54%). No effects were observed on puparia weight, which was found to be quite high (57 to 61 mg) in all diets. Emergence rates were seen to drop sharply in the extract-enriched diets. This pattern can simply be accounted for by the considerable overcrowding of the puparia. Apart from the fact that some were defective, it should also be noted that the movement of the mature larvae seeking for a suitable place where to pupate led to the other puparia being completely or almost completely smeared with a sticky amalgam made up of the faeces and the remains of the pabulum.

BIBLIOGRAFIA CITATA

- GAPANOV S.P., 1996.- Morphology of the egg surface in tachinids from the tribes Exoristini and Winthemiini (Diptera, Tachinidae).-*Zoologicheskii Zhurnal*, 75: 468-474.
- MELLINI E., GARDENGI G., COULIBALY A.K., 1993.- Caratteristiche anatomiche ed istologiche dell'apparato genitale femminile di *Exorista larvarum* L., parassitoide deponente uova macrotipiche sull'ospite.- *Boll.Ist.Ent."G.Grandi"Univ.Bologna*, 48: 45-58.
- MELLINI E., CAMPADELLI G., 1996 a.- Latest results in the rearing of the parasitoid *Exorista larvarum* (L.) on oligidic diets.-*Boll.Ist.Ent."G.Grandi"Univ.Bologna*, 50: 143-153.
- MELLINI E., CAMPADELLI G., 1996 b.- Analisi del superparassitoidismo di *Exorista larvarum* (L.) nell'ospite di sostituzione *Galleria mellonella* L.- *Boll.Ist.Ent."G.Grandi"Univ.Bologna*, 51:1-11.
- MELLINI E., CAMPADELLI G., DINDO M.L., 1996.- Actual possibilities of mass production of the parasitoid *Exorista larvarum* (L.) (Diptera: Tachinidae) on oligidic diets.- *Boll.Ist.Ent."G. Grandi"Univ.Bologna*, 50: 233-241.