

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

Analisi comparata della mortalità preimmaginale  
negli allevamenti *in vitro* e *in vivo*  
del parassitoide *Exorista larvarum* (L.). (\*) (1)

(Ricerche eseguite col contributo del CNR)

## INTRODUZIONE

In un precedente lavoro (Mellini e Campadelli, 1996 b) abbiamo confrontato la produzione del Tachinide *Exorista larvarum* su una dieta oligidica estremamente semplificata e quella sull'ospite di sostituzione *Galleria mellonella* (L.). Particolare attenzione era stata posta sull'indice di utilizzazione dei due substrati da parte delle larve del parassitoide e nel determinare la razione ottimale di dieta da somministrare pro capite.

Nel corso del presente studio si sono volute allargare le indagini per analizzare le cause di morte incontrate dal nostro entomofago durante lo sviluppo preimmaginale, anche con lo scopo di porvi possibilmente rimedio al fine di aumentare le rese in adulti in rapporto al numero delle uova impiegate. Nel contempo sono stati rilevati comparativamente i tempi di sviluppo nonché vari altri parametri biologici nelle due condizioni sperimentali, per un confronto con i dati ottenuti nella sopra ricordata ricerca.

## MATERIALE E METODO

Tutta la sperimentazione è stata condotta in un piccolo armadio, di impiego recente, termostato a 26 °C con scarti termici minimi, dell'ordine di qualche decimo di grado soltanto.

### 1. Allevamenti *in vitro*.

Sono stati effettuati in piastre comprendenti 24 celle del diametro di 17 mm e di pari profondità. In ciascuna nicchia sono stati introdotti circa 700 mg di dieta ed un singolo uovo, collocato alla sua superficie. La quantità di cibo è di gran

---

(\*) Lavoro accettato il 26 febbraio 1998.

(1) Studi sui Ditteri Tachinidi. LXXIV contributo.

lunga superiore alle reali necessità trofiche, ma si è ritenuto consigliabile questo eccesso per raggiungere, in ciascuna cella, uno spessore di almeno 3 mm, tale da creare uno spazio vitale sufficiente per le larve e nel contempo ritardare l'essiccamento del substrato. È stato scartato l'impiego di celle del diametro di 7 mm, che avrebbero consentito un forte risparmio di dieta, per la constatata, in prove precedenti, difficoltà delle larve mature ad impuparsi in spazi tanto ristretti e per di più parzialmente occupati da residui di cibo ed escrementi.

Si è ricorso all'allevamento separato in singole celle allo scopo di potere seguire il destino di ciascun uovo, progetto impossibile da realizzare negli allevamenti collettivi in capsule Petri, anche se porta ad alcuni inconvenienti quali, soprattutto, una minore stabilità in certe caratteristiche della massa trofica propinata. Negli allevamenti di gruppo, infatti, le larve a crescita più rapida, giunte in fasi più o meno avanzate della III età, sconvolgono completamente il pabulum travolgendo uova e corion nonchè larve a lento sviluppo ancora in prima e II età.

Il pabulum, di formulazione già collaudata nel corso di precedenti prove, era così composto:

Tipo di dieta	Latte magro %	Estratto di crisalidi %	Estratto di lievito %	Tuorlo d'uovo %	Saccarosio %
A	80	-	6	12	2
B	70	10	6	12	2

Al solito è stato gelificato addizionando agar in misura dell'1,5 %, e protetto dalle muffe con solfato di gentamicina in ragione dello 0,03%. Nella dieta B è stato aggiunto, come componente derivato dall'ospite, il "costoso" estratto di crisalide, anzichè l'"economico" omogeneizzato larvale perchè quest'ultimo, sterilizzato in autoclave, provoca un forte calo nella resa dei pupari (Mellini e Campadelli, 1996a).

Nell'allestimento delle prove si sono seguite tutte le norme di asepsi più volte descritte nel corso della decina di precedenti lavori su *Exorista larvarum*.

La sperimentazione comprende 3 ripetizioni, coinvolgenti 96 uova ciascuna per un totale, quindi, di 288 elementi.

Dopo 5 giorni dall'allestimento delle piastre multicellari, viene effettuato un primo esame per rilevare il numero di larvette affondate nel pabulum nonchè di quelle "arrampicatesi" sulle pareti e sul soffitto delle celle. In questo modo si è potuto determinare, sia pure indirettamente, il numero di uova non schiuse. I dati sono stati poi confermati — dopo la formazione dei pupari per non inquinare, aprendola, la piastra nel corso dello sviluppo larvale — dal prelievo nelle celle "sterili", e dall'esame al binoculare stereoscopico, delle relative uova appositamente immerse in acqua distillata.

Il giorno seguente l'impupamento si è proceduto alla pesatura dei "pupari" ed al loro trasferimento in capsule Petri del diametro di 5 cm, per favorire un regolare sfarfallamento degli adulti in assenza di residui di pabulum e con spazio sufficiente per un loro corretto assestamento.

## 2. Allevamenti *in vivo*.

Sono iniziati il giorno successivo a quelli *in vitro*, al fine di garantire il più possibile l'omogeneità tra i gruppi di uova impiegati nelle due condizioni sperimentali. Le *Exorista* sono state infatti lasciate "riposare" per circa 24 ore affinché le femmine potessero ripristinare il carico di uova pronte per la deposizione.

Per ognuna delle 3 ripetizioni sono state introdotte e abbandonate in gabbia, per circa mezz'ora, una cinquantina di larve di *Galleria*. La permanenza è vigilata per seguire l'andamento dell'ovideposizione ed estrarre le larve prima che subiscano livelli di superparassitizzazione troppo elevati. Esse sopportavano, al momento del recupero, da due ad una decina di uova con una media pro capite di 4-5.

Le larve vengono quindi pesate e distribuite in altrettante capsule Petri di plastica atossica del diametro di 5 cm, senza aggiunta di cibo la cui presenza avrebbe reso impossibile il conteggio delle uova distaccatesi. D'altronde, essendo la nostra *Exorista* un idiobionte, non è necessario che le vittime raggiungano determinati stadi di sviluppo perchè resti attivato l'accrescimento dell'antagonista.

Per queste prove sono state scelte grosse larve vicine alla maturità. Il pericolo che esse, con l'incrisalidamento, potessero disinfestarsi rigettando le uova del tachinide (che a 26 °C impiegano 3 giorni per schiudere), è scongiurato perchè, date le condizioni di stress in cui vengono a trovarsi, causa il trasloco, l'isolamento, la mancanza di cibo e la temperatura inferiore a quella per loro ottimale (26 °C anzichè 30 °C), esse ritardano notevolmente la muta che, in verità, solo raramente potranno compiere perchè nel frattempo esautorate dall'endofago in rapido accrescimento. Infatti non è mai accaduto che le larve impupandosi abbiano rigettato, con l'esuvia, uova non ancora dischiuse.

Comunque tutte le larve, dopo un'abbondante emissione di fili sericei, hanno finito col tessere un bozzolo regolare. In esso le *Galleria* sono rimaste sacrificate generalmente allo stadio di larva, talora come eopupe, eccezionalmente come crisalidi più o meno imperfette.

Le medie ponderali delle 50 larve di *Galleria*, impiegate nelle tre ripetizioni, sono oscillate, al momento della parassitizzazione, alquanto al di sopra dei 250 mg, contro i 150 mg, o poco più, registrati in molte esperienze precedenti nelle quali venivano utilizzate, per un eccessivo scrupolo di sicurezza, larve da poco entrate nell'ultima età.

Nei relativi protocolli venivano indicati, per ogni larva, il peso ed il numero delle uova di *Exorista* inizialmente incollate sui tegumenti. Dopo un paio di ore si procedeva ad un primo conteggio delle uova nel frattempo distaccatesi e giacenti sul fondo della capsula o impigliate nei fili sericei emessi in grande quantità. Il controllo numerico veniva ripetuto il giorno successivo. Tali uova sono state isolate su carta bibula, posta entro vetrini da orologio, al fine di controllare le percentuali di schiusa. Sembrava infatti lecito supporre che il facile distacco potesse essere indice di difetti o comunque di scarsa vitalità delle uova coinvolte.

Lo sgusciamiento delle uova ovunque ubicate, sull'ospite o sul pabulum o lontane dal substrato trofico, avveniva, a 26 °C, dopo circa 3 giorni dalla loro emissione.

Due giorni dopo si procedeva al conteggio degli imbuti respiratori, di norma differenziati subito davanti al polo cefalico delle uova e rivelati dalla presenza

di vistose macchie nere. Si poteva così calcolare, indirettamente e con buona approssimazione, il numero delle uova da cui non erano sgusciate le larvette.

In seguito venivano effettuate osservazioni giornaliere al fine di rilevare i tempi d'impupamento ed il numero dei pupari per ospite, avendo cura di aprire tutti i bozzoli dato che una certa aliquota, sia pure modesta, si forma al loro interno ed eccezionalmente persino entro le spoglie della vittima.

Trascorsa una settimana, riprendevano le osservazioni giornaliere per cogliere i tempi dello sfarfallamento.

## RISULTATI

### 1. Allevamenti *in vitro*.

Nel giro di alcune ore dallo sgusciamiento, oltre la metà delle larvette neonate risulta già infossata in posizione subverticale nel pabulum, con l'ultimo urite sporgente in superficie. Le rimanenti restano a lungo sulla massa trofica ove si accrescono molto lentamente, ovvero continuano a spostarsi fino a salire lungo le pareti della cella, spesso raggiungendo il soffitto ove, dopo 2-3 giorni, muoiono disseccate. Tali spostamenti appaiono davvero eccezionali, considerato anche che non sono previsti dallo schema comportamentale di questo tachinide; infatti, sull'ospite, all'uscita dal corion la larvetta quasi immediatamente penetra nel corpo del medesimo.

Va precisato che delle 288 celle solo 7 sono apparse fortemente inquinate da muffe. Non rare invece piccole placche batteriche, peraltro circoscritte attorno ai corion e patentemente ininfluenti sullo sviluppo delle larve.

— Durata dell'accrescimento larvale. Si è aggirata mediamente sugli 11-12 giorni nelle piastre con dieta A e sui 9-10 giorni nella dieta B. Il vantaggio nel pabulum contenente estratto dell'ospite comincia ad essere chiaramente rilevabile già durante la II età larvale. I tempi, piuttosto lunghi, dipendono da un ritardo nell'inizio dell'attività trofica ma soprattutto dal lento accrescimento delle larve, in particolare durante la I età. Pervenute all'ultimo stadio esse si sviluppano invece rapidamente.

— Resa in pupari. Complessivamente, nelle tre prove, è risultata pari al 46,87 % rispetto alle uova impiegate (135 pupari da 288 uova inoculate, inserendo nel computo anche le sette celle inquinate). Essa si colloca su valori assai prossimi a quelli rilevati nel corso delle precedenti sperimentazioni.

— Analisi delle perdite e subite fino al raggiungimento della maturità larvale. È riportata nella sottostante tabella.

Perdite	N°	% sulla frazione soccumbente	% sul totale uova
a. Uova non embrionate	43	28,10	14,93
b. Uova con larvetta morta	16	10,45	5,55
c. Larve neonate fuggite dal pabulum	45	29,41	15,62
d. Larve morte durante l'accrescimento	49	32,02	17,01

Il conteggio è cumulativo per entrambi i tipi di dieta impiegata (tesi A e B) non essendosi notate differenze apprezzabili nemmeno in riguardo ai punti *c* e *d*.

Come si può rilevare dal prospetto sopra riportato, l'abbandono del pabulum da parte delle larvette neonate, ritenuto nei precedenti lavori la principale causa di perdite nell'allevamento *in vitro*, ne è responsabile solo per circa un terzo. Molto probabilmente questo calo può dipendere dalle condizioni di isolamento delle singole larvette; Mellini et alii (1997) hanno infatti evidenziato che l'affollamento favorisce la loro dispersione sulle pareti ed il coperchio dei contenitori.

Inaspettatamente, il più importante fattore negativo si è rivelato la mancata schiusura delle uova (quasi il 40% della frazione soccombente sommando i valori di cui ai punti *a* e *b*) mentre la morte durante l'accrescimento, coinvolgente soprattutto larve di I età, si è collocata in posizione intermedia. La morte è preceduta da un lungo periodo di crescita assai lenta per cui resta favorita dal progressivo disseccamento del substrato. Comunque va sottolineata la notevole percentuale di uova non schiuse che, attestandosi sul 20% del totale impiegato, appare in queste prove pressochè raddoppiata rispetto a precedenti sperimentazioni.

— La durata della vita pupale, alla solita temperatura di 26 °C, si mantiene sui valori abbastanza standardizzati di 9-10 giorni.

— Percentuali di sfarfallamento. Sono calcolate sulla base del numero di pupari formati. Esse hanno raggiunto l'81,25% nella dieta senza estratto di *Galleria* e l'80,28% in quella con l'estratto. Va precisato che il 13,76%, dei 109 adulti ottenuti globalmente, non è riuscito a distendere completamente le ali. Anche per questo parametro non sono emerse differenze in rapporto al tipo di dieta.

— Peso medio dei pupari. Sebbene non necessari ai fini della presente ricerca, riteniamo opportuno fornire questi dati, se non altro per un confronto con i risultati ottenuti nel nostro lavoro citato nella introduzione (Mellini e Campadelli, 1996 b).

Al solito la pesatura è stata effettuata entro le 24 ore dall'impupamento. Il peso medio dei 64 pupari formati sulla dieta A (priva di estratto dell'ospite) è risultato pari a mg 46,14, con sensibili variazioni tra una ripetizione e l'altra. Quella dei 71 pupari ottenuti nella dieta B (con estratto dell'ospite) è stato di 53,47 mg. Tutto sommato, sia le differenze quantitative che quelle ponderali tra i pupari formati nelle due condizioni sperimentali non appaiono rilevanti.

## 2. Allevamenti *in vivo*.

Dopo una incubazione di 3 giorni (rifornendo tutti i giorni le gabbie di *Exorista* con larve di *Galleria*) sgusciano le larvette che, sfruttando le condizioni di deiscenza delle uova, immediatamente penetrano nell'ospite, di solito subito davanti al corion.

In breve, nel giro di una giornata, si forma una vistosa macchia nerastra, vieppiù appariscente attorno al foro di penetrazione, testimoniante l'avvenuto possesso da parte della larva endofaga.

— Durata dell'accrescimento larvale. È decisamente breve, aggirandosi in media sui 6 giorni. Tale durata tende ad accorciarsi alquanto nei casi di superparassitismo effettivo. La morte della vittima è precoce, anche in presenza

di un solo endofago, sopravvenendo già nei primi tempi del suo passaggio alla III età larvale.

Di solito, poco dopo la fuoriuscita dai resti dell'ospite e dal suo bozzolo, le larve peregrinanti si impupano sul fondo delle capsule Petri. Raramente formano il pupario entro il bozzolo o addirittura entro le spoglie della vittima, in ogni caso imbozzolata.

— Resa in pupari rispetto alle uova sopportate. Partendo dalle 551 uova iniziali, deposte complessivamente su 3 gruppi di 50 larve ciascuno, si sono formati 207 pupari, con una resa pari al 37,56% delle uova presenti in partenza.

— Analisi delle perdite subite durante l'allevamento.

Premesso che in nessun caso le uova sono state rigettate in seguito ad una ecdisi dell'ospite, un così basso livello di produttività è dipeso dai fattori qui sotto considerati.

Perdite	N°	% sulla frazione soccombente	% sul totale uova
a. Uova distaccatesi dall'ospite	181	52,61	32,85
b. Uova non schiuse sull'ospite (embrionate o meno)	107	31,10	19,42
c. Larve morte durante la crescita in vittime superparassitizzate	56	16,27	10,16

Come si può rilevare, la causa principale delle perdite *in vivo* è costituita dal distacco delle uova dall'ospite, che ha coinvolto circa un terzo di quelle inizialmente presenti e che rappresenta oltre il 50% del totale delle perdite. Il fenomeno, che ovviamente è esclusivo di questa condizione sperimentale, comincia a manifestarsi già pochi minuti dopo l'ovideposizione, quando ancora le capsule Petri, ove le larve vengono isolate ad una ad una, sono quasi completamente sgombre da fili sericei, che in seguito *Galleria* emette in grande abbondanza; questi col loro intrico di certo facilitano il fenomeno, tanto più che le larve sono in continuo movimento.

Trascorse soltanto 2 ore dall'ovideposizione sono infatti risultate distaccate ben 112 uova pari al 61, 87% del totale di uova perdute, benchè le larve siano rimaste indisturbate nelle loro non piccole capsule. Il fenomeno non è grave se il carico di uova pro capite è cospicuo, visto che la superparassitizzazione spesso sfocia in una decimazione dei concorrenti (Mellini e Campadelli, 1996 c); può portare invece alla deparassitizzazione dell'ospite qualora il numero di uova sia basso. Dalle 150 larve latrici di uova si sono infatti formate ben 32 crisalidi da cui sono regolarmente sfarfallate le *Galleria* (21,33%).

Per il fattore "b", che può contribuire col precedente alla salvezza dell'ospite, non vi sono nette differenze rispetto alla situazione rilevata *in vitro*. In riguardo al fattore "c" si nota invece un sensibile scarto verso il basso. Inoltre le cause di morte nelle due situazioni sperimentali differiscono in misura radicale: mentre *in vivo* dipendono largamente da fenomeni di competizione in ospiti superparassitizzati, *in vitro* derivano soprattutto da una manifesta riluttanza da parte di certe larve a nutrirsi della dieta propinata.

In conclusione, mentre *in vivo* le principali cause di fallimento del processo parassitario dipendono dalle uova o perchè non vitali o perchè distaccatesi dall'ospite (complessivamente responsabili dell' 83,71% degli insuccessi), *in vitro* riguardano le giovanissime larve o perchè si allontanano dal pabulum o perchè muoiono in corso di accrescimento causando il 61,43 % dei fallimenti.

— Durata della vita pupale. A 26 °C costanti si aggira sui 9-10 giorni, com'è nella norma.

— Percentuali di sfarfallamento. Si è tenuto conto, nel loro calcolo, del livello di gregarietà del parassitoide, come evidenziato nella sottostante tabella.

Livello di gregarietà	N° pupari	% sfarfallamento	% adulti		% Pupa morte
			normali	difettosi	
1 Pupario/ospite	45	91,11	80,48	19,51	8,88
2 Pupari/ospite	102	87,25	79,77	20,22	12,74
3 Pupari/ospite	36	88,88	81,25	18,75	11,11
4 Pupari/ospite	24	87,50	71,42	28,57	12,50

Le percentuali di sfarfallamento, sul totale dei pupari ottenuti, sono state pari all'88,40%. Esse sono certamente elevate, però ben il 20,76 % degli adulti (cioè 38 su 183) sono apparsi difettosi in quanto incapaci di distendere le ali e soccombenti in tempi relativamente brevi. Considerando il livello di gregarietà si nota che questo è stato pressochè ininfluenza in riguardo alle percentuali totali di sfarfallamento, mentre appare tendenzialmente negativo rispetto alle percentuali di adulti normali che scendono alquanto, limitatamente però al caso estremo di 4 pupari/ospite. Per i pupari solitari i dati negativi coinvolgono soprattutto quelli più corpulenti.

— Peso medio dei pupari. È ovviamente condizionato dal livello di gregarietà, come evidenziato nell'annessa tabella. A causa del superparassitismo, infatti, le variazioni ponderali sono enormi, specie, poi, se paragonate a quanto si verifica *in vitro*.

N° pupari per ospite	N° complessivo pupari	Peso M pupari (mg)	Peso M larve <i>Galleria</i>	Indice di utilizzazione (%)
1	45	65,56	265,31	24,71
2	102	35,94	245,87	29,23
3	36	31,15	263,50	35,46
4	24	18,30	258,50	28,31

Il peso medio dei pupari solitari è risultato eccezionalmente alto, in relazione anche al notevole peso delle larve, e comunque si pone su un livello decisamente più elevato che *in vitro*. In qualche caso, poi, il peso dei singoli individui si è avvicinato o ha addirittura superato i 100 mg. Ma già con due soli pupari il loro peso quasi si dimezza e con quattro scende a poco meno di un quarto, nonostante l'eccezionale mole delle vittime. Così il peso medio calcolato su tutti i pupari si

assesta sui 39,50 mg, quindi su valori sensibilmente inferiori a quelli raggiunti *in vitro*.

L'indice di utilizzazione tende ad aumentare progressivamente col carico parassitario per poi flettersi in corrispondenza di quello massimo. In realtà i suddetti valori sarebbero alquanto più elevati se il calcolo fosse effettuato, anziché sul peso delle larve appena parassitizzate, su quello allo sgusciamiento delle uova dell'antagonista, cioè tre giorni dopo, quando si è avuta una sensibile flessione causa l'inanizione, l'espulsione di escrementi e la emissione di una considerevole quantità di fili sericei, culminata nella tessitura di un robusto bozzolo più o meno regolare. Senza considerare, poi, che l'indice può restare abbassato dalla presenza di larve endofaghe morte, anche in III età, che hanno lucrato invano parte delle risorse trofiche della vittima e di cui nel presente calcolo non si è tenuto conto.

— Vitalità delle uova distaccatesi dall'ospite. Le percentuali di schiusa di siffatte uova non si discostano da quelle delle uova rimaste incollate al tegumento degli ospiti. Pertanto la rimozione non dipende da eventuali caratteristiche specifiche negative, ed in particolare da una ipotetica loro mancanza di vitalità, ma semplicemente da un inadeguato incollamento sul corpo dell'ospite. Il corion ventrale è coloso (Mellini et alii, 1993) e suscettibile di debordare vistosamente rispetto alla rigida calotta dorsale, in modo da ampliare notevolmente la superficie di attacco. A tale fine è indispensabile che la femmina eserciti, al momento dell'emissione, un'adeguata pressione con l'apice dell'ovopositore di sostituzione sul tegumento dell'ospite. Ma in condizioni di cattività, causa il notevole affollamento degli adulti di *Exorista*, da un lato, e la introduzione delle larve di *Galleria* con ritmi lungamente intervallati, dall'altro, le manovre di deposizione si fanno frenetiche con mancata o insufficiente pressione delle uova. Infatti consistenti aliquote di queste, giacenti sul fondo dei contenitori, non presentavano affatto, o solo debolmente accennata, la fascia periferica di corion ventrale disseccato.

## CONCLUSIONI E DISCUSSIONE

Il presente lavoro va considerato come complementare a quello da noi recentemente pubblicato (Mellini e Campadelli, 1996 b) sul confronto tra la produzione *in vitro* e *in vivo* di questo Tachinide. In particolare vengono qui analizzate le cause di morte nelle due condizioni sperimentali, allevando le larvette del parassitoide separatamente entro piccole celle sterili, nel 1° caso, ed isolando, pure ad una ad una, le grosse larve di *Galleria* latrici di uova dell'entomofago in capsule Petri, nel secondo caso.

Nel corso di questa sperimentazione la produzione *in vitro*, valutata in base al rapporto numerico pupari ottenuti/ uova impiegate, è risultata addirittura alquanto superiore (46,87%) rispetto a quella *in vivo* (37,56%). Ciò dipende da situazioni contingenti, in parte controllabili, come emerge dall'analisi delle perdite, e non da una intrinseca superiorità della prima tecnica.

*In vitro*. La perdita più elevata è rappresentata dalla mancata schiusa delle uova (attorno al 20% del totale impiegato) o per mancata embriogenesi (grande maggioranza dei casi) o per la morte delle larvette entro i corion (evenienza poco

comune). Tali valori sono pressochè doppi rispetto a quelli registrati nel corso di passate sperimentazioni. Non si conoscono le cause di un siffatto incremento negativo, che pertanto richiede una attenta sorveglianza dopo 6 anni di allevamento continuato in laboratorio del nostro entomofago sull'ospite di sostituzione *Galleria*.

Seguono, in misura pressochè paritaria, l'abbandono del pabulum da parte delle larvette neonate, che in passato era stato sovrastimato, e la morte delle larve durante l'accrescimento, che in precedenza era stata sottovalutata, complessivamente per quasi un terzo degli individui sottoposti a sperimentazione. Si tratta soprattutto di larve di I età che permangono, spostandosi talora a lungo, in superficie al pabulum, ovvero che si affondano in esso mantenendo regolarmente l'ultimo urite all'esterno per respirare, ma che hanno tuttavia una crescita troppo lenta per cui finiscono col trovarsi in un substrato trofico che diviene progressivamente inidoneo causa la crescente disidratazione.

L'isolamento delle singole larve ha dunque consentito una valutazione esatta delle cause di morte, del tutto impossibile negli allevamenti collegiali ove le larve di III età, in rapida crescita, travolgono ed "amalgamano" nella massa trofica ed escrementizia uova e larvette a lenta crescita rendendole difficilmente reperibili.

*In vivo*. La causa principale di insuccesso è costituita dal distacco delle uova dal tegumento dell'ospite, che ha coinvolto circa 1/3 (32,85%) del totale deposto, e quindi da un fattore ovviamente non operante *in vitro*. Il processo prende inizio subito dopo l'ovideposizione e raggiunge valori molto elevati già soltanto un paio d'ore dal momento della parassitizzazione. Va sottolineato che l'intensità del fenomeno può variare notevolmente, da prova a prova, in funzione di vari fattori quali il numero delle femmine presenti nelle gabbie, il tempo trascorso in assenza di ospiti e, probabilmente, anche l'età delle stesse femmine.

Un ruolo importante, come del resto *in vitro*, è dato dall'aliquota (19,42%) di uova che non schiudono. Comparativamente modesta è invece la percentuale (10,16% rispetto al totale delle uova) di larve che soccombono in corso di accrescimento. Va precisato che quest'ultimo fenomeno dipende in larga misura dal livello di superparassitizzazione, essendo *Exorista* un parassita gregario imperfetto (cfr. Mellini e Campadelli, 1997 a) e non da scarsa adattabilità al substrato trofico (cioè all'ospite di sostituzione *Galleria*) come invece accade, in certa misura, *in vitro*.

Il distacco delle uova non dipende da loro particolari caratteristiche negative: le percentuali di schiusa si sono infatti rivelate uguali a quelle delle uova rimaste saldamente ancorate all'ospite. Esso deriva invece da imperfette manovre di ovideposizione. Di norma l'uovo macrotipico, all'uscita dal gonotrema, viene infatti premuto dalla femmina per un istante, col IX urite, sul corpo dell'ospite in modo che la molle e collosa superficie ventrale del corion si espande in una larga base di appoggio che rapidamente dissecca. Orbene le uova distaccate non presentano, o solo in misura modesta, il corion ventrale debordante la rigida callotta dorsale, indicando che esse non sono state premute sull'ospite. E' assai probabile che un siffatto comportamento aberrante derivi dal forte affollamento delle femmine nelle gabbie e da una immissione saltuaria delle larve di *Galleria*; in tale situazione viene indotta una ovideposizione affrettata, come denunciato dalla frenesia con

cui le femmine si scatenano subito in un attacco di massa contro gli individui appena introdotti. Durante le more, infatti, nella loro vagina piriforme può accumularsi fino a una mezza dozzina di uova, suscettibili di essere emesse in rapida sequenza (Mellini et alii, 1993).

È ovvio che i dati sulle rese in pupari qui presentati hanno un valore puramente indicativo. Bastano infatti variazioni anche modeste nelle caratteristiche fisiche del pabulum, da un lato, e nelle tecniche di parassitizzazione dell'ospite, dall'altro, per determinare notevoli differenze nella produzione quantitativa del parassita. Infatti, *in vitro*, se il pabulum è troppo consistente ovvero se è ricoperto da un film liquido anche molto esiguo, rimane ostacolata la crescita delle larve neonate; ed *in vivo*, se il numero di femmine nelle gabbie di parassitizzazione è troppo elevato ne scapita un corretto incollamento delle uova sugli ospiti, mentre livelli alti di superparassitizzazione portano alla decimazione degli endofagi in soprannumero.

Più in generale, mentre la decimazione del parassitoide *in vitro* coinvolge principalmente lo stadio di larva, soprattutto di I età, *in vivo* essa si manifesta ancora prima e cioè allo stadio di uovo.

Per quanto concerne l'accrescimento larvale nelle due condizioni sperimentali, le principali differenze riguardano la sua durata che è notevolmente più breve *in vivo* (6 giorni contro i 9-10 *in vitro*, con dieta arricchita di estratto dell'ospite, e addirittura 11-12 giorni se ne è priva). Praticamente uguale è invece la durata della vita pupale che si attesta sui 9-10 giorni, alla solita temperatura costante di 26 °C, e che non resta evidentemente influenzata in misura apprezzabile dai trascorsi larvali.

Il peso medio dei pupari *in vitro* è risultato di 46,14 mg sulla dieta A, priva di estratto crisalidale dell'ospite, e di 53,47 mg in quella che ne è provvista. *In vivo* il peso medio varia ovviamente col livello del superparassitismo; esso è piuttosto alto per i pupari solitari (65,56 mg) in larve di elevato peso medio iniziale (265,31 mg); precipita, quasi dimezzandosi, nel caso di pupari formati in coppia (mg 35,94), fino a raggiungere valori appena compatibili con la sopravvivenza se in gruppetti di 4 elementi (mg 18,30). Così la media generale si colloca sui 39,50 mg, cioè su valori alquanto inferiori a quelli conseguiti *in vitro*. Da notare che l'indice di utilizzazione aumenta sì, col crescere del grado di superparassitismo, ma resta pure sempre entro limiti non molto elevati (dal 24,71 al 35,46%).

Le percentuali di sfarfallamento, calcolate in base al numero dei pupari, sono state pari all'80,74% *in vitro* e all'88,40% *in vivo*. Peraltro questo tasso alquanto superiore è rimasto, per così dire, vanificato da una più elevata percentuale di adulti difettosi (20,76% contro il 13,76% registrato *in vitro*).

In conclusione oltre ad illustrare i fattori di mortalità diversamente operanti nelle due condizioni sperimentali ed a rilevare una tendenziale maggiore produttività nell'allevamento *in vitro* rispetto a quello *in vivo*, almeno nelle presenti prove, vengono confermati vari dati biologici già emersi nel precedente confronto (Mellini e Campadelli, 1996 b).

## RIASSUNTO

L'allevamento di singole larve di *Exorista larvarum* su dieta artificiale, in piastre multicellulari, e quello di larve parassitizzate di *Galleria mellonella*, isolate ad una ad una in capsule Petri, hanno consentito di analizzare comparativamente, con un buon livello di precisione, le cause di morte incontrate dal Tachinide *in vitro* ed *in vivo*.

*In vitro* le perdite, sempre calcolate sul totale delle uova impiegate, sono dovute, innanzitutto, alla mancata schiusa di una cospicua parte delle uova (20,48%), poi alla tendenza di non poche larve neonate (15,62%) ad abbandonare il pabulum, arrampicandosi in modo irreversibile sulle pareti del contenitore, ed infine ad una crescita stentata di varie larve giovanissime (17,01%), aggravata dal progressivo, anche se lento, disseccamento della dieta. Va infatti sottolineata una diversa adattabilità iniziale al pabulum da parte delle larve, che pure hanno una stessa provenienza e che inoltre, essendo isolate ad una ad una, non sono soggette ad eventuali fenomeni competitivi.

*In vivo* le perdite, oltre che ad una discreta presenza di uova non embrionate o che comunque non schiudono (circa il 20% come *in vitro*), dipendono in larghissima misura (32,85%) dal loro distacco in tempi brevi dall'ospite, fino a causare talora una completa deparassitizzazione. La morte delle larve in corso di sviluppo è invece modesta (10,16%) ed è attribuibile in gran parte a competizioni conseguenti a livelli elevati di superparassitizzazione.

La vitalità della grossa frazione di uova cadute dall'ospite è uguale a quella delle uova che restano ancorate ai suoi tegumenti. Il loro distacco è infatti, semplicemente, la conseguenza di una affrettata tecnica di deposizione in gabbie troppo affollate da femmine del parassitoide ed inoltre rifornite solo saltuariamente di larve dell'ospite, con conseguente generalizzato frenetico attacco. Infatti la collosa superficie ventrale dell'uovo non viene premuta dall'ovopositore di sostituzione contro il corpo dell'ospite fino ad aderire restando vistosamente dilatata.

Così la resa in pupari, calcolata sulle uova di partenza, è risultata alquanto più elevata *in vitro* (46,87%) che *in vivo* (37,56%). Tale risultato può tuttavia variare notevolmente da prova a prova, e addirittura capovolgersi, qualora si modificchino opportunamente le tecniche di parassitizzazione *in vivo*, ovvero alterando anche solo leggermente le caratteristiche fisiche del pabulum *in vitro*. La resa in pupari sarebbe comunque superiore a quella sopraindicata, se si tenesse conto che circa il 20% delle uova impiegate non è schiusa.

La durata dell'accrescimento larvale *in vitro* (mediante 11 giorni) è apparsa assai più lunga che *in vivo* (soltanto 6 giorni), sebbene l'aggiunta di estratto larvale dell'ospite la abbrevi di circa 2 giorni. Il divario dipende in gran parte dalle incertezze iniziali delle larvette neosgusciate peregrinanti a lungo sul pabulum, dalla lentezza con cui si svolge l'attività trofica soprattutto in I età e dalla mancanza di fenomeni competitivi essendo le larve allevate isolatamente; mentre sull'ospite le larvette neonate penetrano immediatamente al suo interno davanti al corion (l'uovo è deiscende), senza compiere di norma spostamenti ed inoltre si trovano spesso in condizioni di gregarità.

La durata della vita pupale è invece uguale nelle due condizioni sperimentali (9-10 giorni a temperatura costante sui 26 °C), come lo è quella dell'embriogenesi (sui tre giorni). Anche le percentuali di sfarfallamento coincidono nelle due situazioni qualora si considerino solo gli adulti normali che hanno compiutamente disteso le ali (attorno al 70% delle pupe).

Praticamente impossibile è il confronto tra i pesi dei "pupari" ottenuti *in vitro* e di quelli formati *in vivo*: le medie nel I caso sono state pari a mg 46,14, nella dieta senza estratto dell'ospite, e mg 53,47 in quella con estratto, mentre nel II caso sono variate, in rapporto col livello del superparassitismo, da un massimo di 65,56 mg per i pupari solitari ad un minimo di mg 18,30 nel caso di 4 pupari/ospite, con una media generale di 39,50 mg. Comunque l'indice di utilizzazione del substrato trofico è apparso sempre non elevato anche *in vivo*.

In definitiva, per una serie di fattori, peraltro variabili a piacere per lo meno *in vivo*, la produzione sia quantitativa che qualitativa del parassitoide, nelle condizioni in cui sono state condotte queste prove, è risultata, con riferimento ai parametri considerati, alquanto superiore *in vitro* ove non si hanno perdite di uova nè fenomeni competitivi.

Comparative analysis of pre-imaginal mortality rates in the *in vitro*  
and *in vivo* rearing of the parasitoid *Exorista larvarum* (L.)

ABSTRACT

The rearing of individual *Exorista larvarum* larvae on an artificial diet in multicell trays and that of parasitized larvae of *Galleria mellonella*, placed individually on Petri dishes, has permitted to make a comparative analysis, with a fairly reliable accuracy, of the causes of mortality of the *in vitro* and *in vivo* reared Tachinid.

*In vitro* mortality rates, determined over the total number of eggs employed, were ascribable primarily to the failure of a substantial number of eggs to hatch (20,48%), secondarily to the tendency of a good number of new-born larvae to abandon the pabulum (15,62%) irreversibly crawling up the walls of the container, and thirdly to the poor development of a number of very young larvae (17,01%), a condition aggravated by the progressive, albeit slow, drying out of the diet. A different initial adaptability of the larvae to the pabulum was observed despite the same origin of these larvae and the fact that, being individually reared, they were not subject to competition.

*In vivo* mortality rates were due, in addition to a fair number of eggs without embryo or in any case of eggs which failed to hatch (about 20% as *in vitro*), to a large extent to an early detachment of the eggs from the host (32,85%), in some cases leading to a complete deparasitization. Larvae mortality during their development was instead limited (10,16%) and chiefly ascribable to competition originating from high superparasitism levels.

The viability of the eggs which detached themselves from the host was the same as that of the eggs which remained attached to the host's integuments. Their detachment in fact is merely a consequence of hurried deposition in cages overcrowded by the females of the parasitoid as well as to the irregular supply of host larvae, which conditions generally gave rise to frantic attacks. More precisely, the females failed to properly press the sticky ventral chorion of the egg against the body of the host by means of their factitious ovipositor so as to make it fully adhere, leaving it visibly dilated.

Puparia yield calculated on the basis of the starting number of eggs was therefore quite higher *in vitro* (46,87%) than *in vivo* (37,56%). These figures, however, were seen to vary considerably from one trial to another and even to reverse themselves when *in vivo* parasitization techniques were appropriately modified or when *in vitro* even slight changes were made to the physical characteristics of the pabulum.

The development time of *in vitro* larvae (on average 11 days) was considerably longer than that of *in vivo* ones (only 6 days) but the addition of host larva extract was seen to reduce the former by about 2 days. This difference in growth rate was largely ascribable to the initial uncertain behaviour of the newly hatched *in vitro* larvae, characterised by lengthy wanderings on the pabulum and by a slow trophic activity, especially in the first-instar, while, *in vivo*, the new-born larvae immediately penetrated into the host in front of the chorion (the egg being dehiscent), generally without wandering about.

The duration of the pupa instar instead was the same under both experimental conditions (9-10 days at a constant temperature of around 26 °C) and that of embryogenesis was also the same (about 3 days). Emergence rates were also the same under both conditions if only the normal adults which fully unfolded their wings (about 70% of the pupae) are considered.

A comparison of the weights of *in vitro* and *in vivo* puparia is virtually impossible. *In vitro*, the average weight was found to be 46,14 mg on the diet without host extract and 53,47 mg on that with host extract. *In vivo*, average weights ranged, depending on the level of superparasitism, from a maximum of 65,56 mg for solitary puparia to a minimum of 18,30 mg in the case of 4 puparia per host, the overall average being 39,50 mg. In any case, the exploitation rate of the trophic substrate appeared to be not high even in *in vivo* rearing.

In conclusion, as a consequence of a number of factors, all of which subject to manipulation at least *in vivo*, quantitative and qualitative parasitoid yields under the conditions tested were found to be, for the parameters considered, higher and better *in vitro*, as no eggs were lost and no competition occurred in this case.

BIBLIOGRAFIA CITATA

- 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.- A first overall comparison between the *in vitro* and *in vivo* production of the parasitoid *Exorista larvarum* (L.). - *Boll. Ist. Ent. "G. Grandi" Univ. Bologna*, 50: 183-199.
- MELLINI E., CAMPADELLI G., 1996 c.- 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., GARDENGI G., 1997. - Sulle tecniche di inoculazione del pabulum per l'allevamento "*in vitro*" del parassitoide *Exorista larvarum* (L.). - *Boll. Ist. Ent. "G. Grandi" Univ. Bologna*, 51:37-51.