

Sulla schiusura delle uova microtipiche di
Gonia cinerascens Rond.
in condizioni sperimentali. (1)

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

INDICE

I. - Generalità	pag. 154
II. - Materiale e Metodo	» 157
III. - Prove preliminari di sgusciamiento con uova uterine provenienti da femmine di <i>Gonia</i> morte	» 158
I Prova	» 159
II Prova	» 161
IV. - Prove conclusive con uova uterine e uova deposte	» 162
1. Sull'importanza delle sollecitazioni meccaniche nella schiusa	» 162
A) Uova uterine	» 162
B) Uova deposte	» 165
2. Efficacia del pH del liquido di schiusa	» 169
A) Uova uterine	» 169
B) Uova deposte	» 171
3. Efficacia degli enzimi in generale nella schiusa	» 176
4. Efficacia degli enzimi del canale alimentare delle larve di <i>Galleria mellonella</i> L. sulla schiusa	» 181
5. Schiudibilità delle uova uterine estratte da femmine di <i>Gonia</i> vive	» 183
Riassunto	» 186
Summary	» 187
Bibliografia citata	» 188

(1) Studi sui Ditteri Larvevoridi, XXVII.

I - GENERALITÀ

Una caratteristica peculiare di un cospicuo gruppo di specie della tribù dei Goniini è quella di deporre uova microtipiche ⁽²⁾. Questi piccoli «germi» vengono incollati sul substrato trofico degli ospiti, così che, ingeriti assieme al cibo, finiscono in breve con lo schiudere nel canale alimentare, assicurando in tal modo, attraverso procedimenti del tutto insoliti per gli insetti entomofagi, la presa di possesso dell'ospite.

Le vittime sono, nella grande generalità, larve di Lepidotteri e di Imenotteri Sinfiti nonché, in misura estremamente modesta, adulti di Coleotteri (in particolare Scarabeidi) e Ortotteroidei, in ogni caso esapodi dotati di apparato boccale masticatore e quasi esclusivamente fillofagi ed ectofiti.

C'è da aggiungere che simile modalità di «contaminazione» dell'ospite non è esclusiva della suddetta tribù di Larvevoridi, ma si riscontra, per quanto eccezionalmente nell'ambito della classe degli entomi, anche in certi Imenotteri Terebranti della famiglia dei Trigonalidi.

L'uovo microtipico, oltre a dimensioni decisamente minute, presenta una costituzione particolare mirabilmente adattata al ruolo che gli compete. Si presenta infatti come un semiovoide: la parte dorsale è fortemente convessa e mostra un corion nero e molto robusto, la superficie ventrale è invece pianeggiante con corion esile e trasparente. Incollate alle foglie delle piante più varie tali uova si mantengono vitali per qualche settimana. All'atto della loro deposizione lo sviluppo embrionale è generalmente terminato; pure questa è una caratteristica eccezionale che le distingue da quelle emesse dalla generalità delle forme ovipare, nelle quali lo sviluppo embrionale si svolge interamente, o quasi, all'esterno delle vie genitali della madre. Si tratta però di un adattamento molto importante perché così anche le uova ingerite dall'ospite poco dopo la loro deposizione possono garantire il successo della parassitizzazione. Il tempo di cui dispone il «germe» per «attecchire» è infatti piuttosto breve, dell'ordine di qualche ora, cioè pari al tempo impiegato dagli alimenti per percorrere l'intero tubo digerente ⁽³⁾, per cui uova non ancora completamente embrionate sarebbero espulse come tali e l'ospite sfuggirebbe al parassita. D'altro canto le femmine ovi-depongono generalmente su piante in cui la infestazione è in atto e

(2) Solo per l'Europa Herting (1960) riporta dati biologici per una cinquantina di specie aventi siffatti costumi.

(3) In larve della VII età di *Galleria mellonella* L., che peraltro hanno un regime dietetico del tutto particolare, il tempo intercorrente tra l'introduzione del cibo e l'espulsione delle relative feci è di circa 4-5 ore (Baronio e Campadelli, 1978).

generalmente verso la periferia delle foglie, accorciando in tal modo i tempi del probabile impatto con l'ospite.

Una volta sgusciata, e di solito ciò avviene nella metà posteriore dello stomodeo, la minuscola larvetta perfora in breve le pareti del canale alimentare e va ad insediarsi, pro tempore, in questo o quel viscere (4), a seconda della specie parassita, ove si sviluppa fino a compiere, sovente, la I muta. L'entomofago si arresta quindi allo stadio di L_{II} iniziale in attesa, almeno in forme preimmaginali di insetti olometabolici (peraltro i più colpiti), che l'ospite si impupi.

Dall'uovo deposto nell'ambiente la larvettina dunque non sguscia fino a quando non sia raggiunta da appropriate stimolazioni; essa si mantiene vitale, in attesa, entro gli involucri dell'uovo, anche per tempi lunghissimi: Biliotti e Desmier de Chenon (1971) hanno constatato una sopravvivenza fino a 3 mesi per quelle di *Pales pavidus* Meig. deposte su foglie di bosso e conservate a $+ 8^{\circ}C$ e 60% U.R..

Gli stimoli che determinano la schiusa di siffatte uova sono, secondo i rari Autori che si sono occupati della questione, di duplice natura: fisici e chimici ad un tempo. I primi consisterebbero in una sorta di massaggio che l'uovo riceve ad opera delle appendici boccali durante la triturazione e l'ingestione del cibo; i secondi sono identificati nei liquidi contenuti nello stomodeo, ed in particolare nel loro pH.

La ricerca più approfondita sull'argomento è quella riportata in una vecchia pubblicazione di Severin et alii (1915) i quali discutono altresì i dati degli Autori che li hanno preceduti. Operando sperimentalmente su *Chaetogaedia monticola* Big., nemica di larve di Lepidotteri, e su *Plasmophaga antennalis* Towns., legata ai Fasmoidi, essi pervengono alla conclusione, in parte contestando e in parte sostenendo le opinioni correnti, che i fattori responsabili della schiusa sono di natura chimica e rappresentati dai succhi a reazione alcalina presenti nel mesentero, per quanto si osservi un certo numero di schiuse anche in liquidi decisamente acidi come il sangue di certi Nottuidi, e persino in acqua distillata.

Strickland (1923), studiando *Gonia capitata* De G., infeudata ai Nottuidi, rileva che uova raccolte in campo e immerse nei liquidi rigurgitati dalle larve ospiti non schiudono; ciò sembra significare che è necessario, almeno per questa specie, il preliminare intervento dei fat-

(4) È questo un comportamento tipico di tutte le L_I delle specie a uova microtipiche (in contrasto con la generalità delle L_I derivate da uova macro) e che avrebbe, secondo gli Autori, il significato di porre queste eccezionalmente minute larvette al riparo dalla reazione emocitaria delle loro, al confronto, mastodontiche vittime.

tori meccanici, visto che uova consimili ingerite dalle larve sono invece sgusciate. Peraltro in esperimenti successivi la schiusa è stata ottenuta con la sola immersione.

Moritoshi (1936), in riguardo a *Sturmia sericariae* Rond., parassita di *Bombyx mori* L., indica una stretta relazione tra il pH dei liquidi usati e l'entità della schiusa; egli infatti trova che le L_I sgusciano nei fluidi digestivi delle larve dei Lepidotteri per valori del pH compresi tra 8,8 e 9,8, con percentuali maggiori per i valori più alti, mentre non schiudono affatto nel canale alimentare delle larve dei Tentredinidi caratterizzato da un pH acido oscillante da 5,3 a 7,4.

In tempi più recenti Wishart (1945), riferendosi ad *Aplomyia caesar* (Ald.), constata che la schiusura delle uova microtipiche avviene nella maggioranza dei casi in due tempi: prima la fuoriuscita dal corion della larvetta ancora rivestita della membrana vitellina, in conseguenza della pressione esercitata dai pezzi boccali, e successivamente l'esodo da quest'ultima in presenza del contenuto intestinale. Tuttavia il meccanismo di schiusa dalla suddetta membrana non è chiarito, restando l'Autore in dubbio se vada riferito all'inturgidimento dell'uovo fino a scoppiare, per assorbimento di liquido dall'ambiente, ovvero all'azione diretta dell'uncino boccale della larvetta così sollecitata. In un lavoro successivo lo stesso Autore (Wishart, 1956) identifica nei pH 11,75-12,50 l'alcalinità ottimale per lo sgusciamiento delle uova; per valori minori la schiusa richiede tempi assai lunghi e interessa solo basse percentuali, cosicché proprio nel pH del canale alimentare viene identificato il primo fattore dell'idoneità dell'ospite per questo parassita.

Come si vede i dati dei vari Autori sono abbastanza contraddittori. C'è peraltro da osservare che, a parte il vecchio lavoro di Severin et alii (1915) e quello relativamente recente di Wishart (1956), espressamente dedicati allo studio del meccanismo di schiusa, le altre pubblicazioni includono a questo riguardo solo annotazioni marginali, essendo riservate all'analisi del ciclo biologico di singole specie.

A questo punto precisiamo che il nostro obiettivo di partenza era quello di ottenere lo sgusciamiento in massa di uova di *Gonia cinerascens* Rond. per procedere a tentativi di allevamento delle larvettine neonate su dieta artificiale. Valendoci delle indicazioni su riportate abbiamo ottenuto risultati del tutto insoddisfacenti e pertanto ci siamo trovati nella necessità di svolgere indagini personali. Il quantitativo pressoché illimitato di uova del suddetto larvevoride a nostra disposizione ci ha permesso di cogliere vari aspetti del problema che nella loro globalità riteniamo siano sfuggiti agli Autori che ci hanno preceduto e di renderci conto della estrema variabilità dei fenomeni almeno nelle condizioni sperimentali in cui abbiamo operato.

II - MATERIALE E METODO

Lo studio è stato condotto sulle uova di *Gonia cinerascens* Rond. È questo un larveoride parassita di larve di Lepidotteri Nottuidi pressoché ignorato dalla scienza e che noi da oltre due anni alleviamo con successo sull'ospite di sostituzione *Galleria mellonella* L. per studiare vari aspetti del rapporto parassitario tra insetti entomofagi e loro vittime. La biologia è stata illustrata solo di recente da Baronio e Campadelli (1978) che però non hanno approfondito l'aspetto concernente l'ovideposizione e la schiusa. L'uovo, che misura appena mm 0,086 in lunghezza e mm 0,052 nel diametro trasverso, rientra nella categoria degli « extrapiccoli » (lunghezza inferiore ai 100 μ) secondo la classificazione di Townsend (1934).

In cella climatica a 23-24 °C e 70% U.R. le femmine cominciano a deporre le primissime uova sulle foglie di rametti appositamente introdotti, ovvero su loro imitazioni in plastica, dopo circa 4-5 giorni dallo sfarfallamento ⁽⁵⁾; l'ovideposizione diviene però consistente solo dal 7° giorno in poi ed interessa entrambe le pagine fogliari, con una decisa preminenza per quella superiore ⁽⁶⁾, ed in particolare la loro fascia submarginale. Nella II settimana di vita qualche femmina comincia a soccombere con il lunghissimo utero avvolto a spirale ancora infarcito da qualche migliaio di uova nerastre. A questo momento, specialmente nella metà posteriore del gonodotto impari, esse mostrano per trasparenza, a livello degli involucri ventrali, la larvetta completamente formata, con scheletro cefalo-faringeo e spinule tegumentali bene pigmentate. Corrispondentemente anche nelle uova emesse naturalmente dalle femmine sui vari supporti lo sviluppo embrionale appare di norma terminato già al momento della deposizione, salvo non rare eccezioni per quelle abbandonate nelle prime fasi della proliferazione.

Sono state condotte 2 serie di esperienze immergendo le uova in svariate soluzioni e liquidi organici, con o senza l'apporto di stimolazioni meccaniche. Con la I serie abbiamo saggiato uova estratte dalle vie genitali delle femmine che man mano soccombevano nell'allevamento. Le prove sono state ripetute varie volte, in tempi successivi, utilizzando

(5) Da ricerche in corso è emerso che l'inizio della ovideposizione dipende in larga misura dalla densità della popolazione in gabbia, nel senso che essa è tanto più precoce quanto maggiore è l'affollamento. Notevolmente più lunghi sono gli intervalli indicati dagli Autori per altre specie: 14-21 giorni per *Leschenaultia exul* Town. (Bess, 1936), 20-25 giorni per *Pales pavidus* Meig. (Riviere, 1975).

(6) In generale gli Autori concordano nel ritenere assai più frequente la localizzazione sulla pagina inferiore delle foglie, ove le uova si conservano vitali più a lungo (cfr., ad es., Wylie, 1960).

numerosi individui ed avendo cura di prelevare i vari gruppi di uova da introdurre nei diversi liquidi dallo stesso tratto di utero, quello più vicino al gonotrema, viste le notevoli differenze nello sviluppo embrionale che si riscontrano ai vari livelli. Nella II serie si sono impiegate uova deposte direttamente sulle foglie di rametti collocati in vaso con acqua nelle gabbie di allevamento degli adulti, ovvero, e più frequentemente, su zimbelli di foglie in materiale plastico. In quest'ultimo caso le prove sono state ripetute con riferimento non alle varie femmine, avendo esse deposto tutte assieme, bensì al numero di giorni successivi all'ovideposizione nonché all'età delle medesime. Tali prove hanno la prerogativa di costituire un riferimento a procedimenti più naturali, mentre le prime consentono di utilizzare un materiale straordinariamente abbondante, destinato nella generalità dei casi ad andare perduto. Volendo poi utilizzare le larvette neosgusciate, questo procedimento oltre a permettere di sfruttare in larghissima misura il potenziale riproduttivo del parassita, è anche più sbrigativo.

C'è infine da precisare che mentre nel corso della I esperienza le stimolazioni meccaniche sono minime, poiché le uova sono prelevate dall'utero e traslate nei vari liquidi in gruppo, nel corso della seconda sono abbastanza accentuate perché le uova debbono essere distaccate dal supporto, cui sono tenacemente incollate, mediante un pennellino umido le cui setole in ogni caso finiscono col sollecitare le uova in vario modo.

III - PROVE PRELIMINARI DI SGUSCIAMENTO CON UOVA UTERINE PRELEVATE DA FEMMINE DI GONIA MORTE

Dopo una dozzina di giorni dallo sfarfallamento, nell'utero enormemente allungato (fino a 3 cm), alquanto dilatato (diametro 0,7-0,8 mm) ed avvolto a spirale si trovano ammassate alcune migliaia di minutissime uova con la callotta dorsale del corion nerastra e lucida, ad esclusione di quelle site in prossimità degli ovidutti pari che sono invece di colore nocciola o melleo ovvero addirittura biancastre. Le uova dislocate nel terzo verso il gonotrema contengono inoltre larvette perfettamente formate; la durata dello sviluppo embrionale è infatti stimata, con buona approssimazione, sui 4 giorni dopo la discesa dell'uovo nell'utero, la quale inizia 1-2 giorni dopo l'inseminazione. La presenza di embrioni completamente formati la si può agevolmente rilevare ponendo le uova in qualsivoglia fluido tra 2 vetrini; esercitando infatti brevi e ripetute pressioni l'uovo si libera del corion e la larvetta rivestita dalla membrana vitellina fuoriesce a livello della superficie ventrale, dove il guscio membranaceo ed elastico finisce col lacerarsi sotto la spinta del « germe ».

La larva avvolta da tale membrana, che è esile e trasparente ma

altresì alquanto rigida, conserva a un dipresso la stessa forma semi-ovoidale propria dell'uovo e si mantiene immobile. L'esodo definitivo si attua attraverso una lacerazione che essa pratica azionando vivacemente l'uncino boccale a livello della superficie ventrale verso il polo cefalico leggermente rastremato. Il pertugio così aperto nella membrana vitellina è oltremodo minuto e la fuoriuscita sembra avvenire con un certo sforzo, considerato che la larvetta si stira e si allunga vistosamente, come strozzata entro il taglio, al pari del resto di quelle emergenti dalle uova macrotipiche. Una volta completamente sgusciata, essa si presenta lunga ed affusolata come di norma, nonché assai vivace nei movimenti, mentre la m.v. conserva la sua forma di semiovoide.

In vivo lo sgusciamiento avviene, a quanto pare, secondo le modalità qui sopra illustrate in vitro, e cioè in 2 tempi: una prima fase passiva (ad opera dei gnatiti della vittima) dal corion, una seconda fase attiva (ad opera dei gnatiti del parassita) dalla membrana propria dell'uovo. Peraltro in molte condizioni sperimentali, che esamineremo in seguito, la larvetta fuoriesce in pratica contemporaneamente dai due involucri dell'uovo. Sottolineamo subito che tutto lo « sforzo » è impiegato per vincere la membrana vitellina, poiché il corion ventrale, incredibilmente disteso e gonfiato dai vari liquidi che lo hanno attraversato, si presenta esile e molle, tale da non offrire che una debole resistenza.

Verso la fine della II settimana, e nei giorni immediatamente successivi, varie femmine di *Gonia* soccombono col gonodotto comune infarcito di uova; orbene è simile materiale che è stato utilizzato in questa prima serie di prove.

Abbiamo impiegato sia femmine morte di recente che femmine morte da vari giorni e da tempo completamente disseccate. In ogni caso la dissezione è stata effettuata in acqua distillata, tentando poi, quando possibile, di distendere l'utero su carta bibula inumidita, ciò allo scopo di prelevare le uova soltanto dal tratto terminale ove l'embriogenesi è conclusa. In realtà ciò non è facile per cui non sempre le uova utilizzate nelle varie tesi a confronto sono da considerarsi perfettamente equivalenti. Anche gli uteri secchi in breve si rammolliscono e le uova, all'inizio cementate fra di loro, rapidamente si separano grazie al forte potere igroscopico dei secreti interstiziali e della porzione ventrale del corion.

I prova

Con un primo saggio a carattere orientativo, effettuato utilizzando le uova estratte dall'utero di varie femmine di *Gonia* e poste in gruppi di circa una cinquantina di elementi in vetrini da orologio, si è osservato un numero assai variabile di schiuse nelle prime 5 ore di immersione in ciascuno dei seguenti liquidi: acqua distillata, acqua di fonte,

KOH al 5‰ e 10‰, NaOH al 5‰ e 10‰, soluzione di Grenier et alii (1974), emolinfa di Galleria + soluzione satura di feniltiurea, omogeneizzato di canale alimentare in toto di Galleria + feniltiurea, soluzione fisiologica al 9‰ di NaCl, saliva umana e soluzione satura di feniltiurea. Quest'ultima è stata provata non come eventuale mezzo da utilizzare per la schiusa, ma solo per controllarne una possibile azione negativa, visto che il suo impiego appare indispensabile quando si voglia usare emolinfa od omogeneizzato di questo o quel viscere per impedire i processi ossidoriduttivi.

Mentre in alcuni di questi liquidi non si sono in seguito verificate schiuse, o solo in numero limitatissimo, come nei vari idrati, in altri invece sono incrementate col passare del tempo, come in soluzione fisiologica, in emolinfa, nei fluidi intestinali e nella soluzione di Grenier et alii.

C'è poi da aggiungere che mentre in alcuni mezzi di schiusa le larve neonate si mantengono vive ed attive anche per alcune ore (almeno una decina), in altri esse soccombono in breve tempo, divenendo piriformi per una eccezionale dilatazione dell'addome, ed in seguito addirittura scoppiando come succede negli alcali. Tali sostanze, almeno nelle suddette concentrazioni, sono pertanto da scartare laddove si voglia procedere alla utilizzazione sperimentale di queste minuscole larvette, che addirittura possono restare uccise da tali liquidi entro gli involucri dell'uovo, dal momento che, dopo qualche ora di immersione, non si verificano più schiuse, a differenza di quanto avviene negli altri fluidi. C'è da precisare ancora che in alcuni liquidi, ed in particolare nei suddetti idrati anche se molto diluiti (5‰), un certo numero di larve sguscia parzialmente fuoriuscendo soltanto con l'avancorpo e finendo poi col perire con gli ultimi uriti imprigionati entro gli involucri dell'uovo.

Non va infine sottaciuto che è talora possibile portare a termine l'incubazione delle uova in alcuni dei liquidi impiegati.

In conclusione i migliori risultati in questa prova sono stati ottenuti coi fluidi intestinali diluiti in acqua distillata, con emolinfa pure diluita e con la soluzione di NaCl 9‰. Tuttavia le risposte sono risultate assai diverse da femmina a femmina; in certi casi uova pure chiaramente embrionate non sono sgusciate nelle soluzioni che ci erano sembrate più efficaci, mentre in altri sono schiuse inaspettatamente in larga misura anche nella semplice acqua distillata. È difficile dunque, attraverso un semplice esame visivo, anche se accurato, prevedere con sicurezza se le uova uterine sgusciano nelle suddette condizioni sperimentali. Nella ipotesi che ai fini della schiusa possano essere determinanti le vicende subite dall'uovo prima della immersione si è proceduto all'esperimento che segue.

II prova

Con questo saggio si è indagato se un preventivo disseccamento dell'uovo fuori dalle vie genitali della madre potesse favorirne la schiusa allorché viene sommerso nelle varie soluzioni. In natura infatti l'uovo microtipico passa attraverso alterne vicende: nell'utero, per quanto strettamente stipato, è bagnato da un liquido (di cui stiamo attualmente ricercando la provenienza e la natura) che si insinua negli interstizi tra un germe e l'altro; poi, una volta depresso, si asciuga perfettamente a contatto con l'aria; ed infine, qualora ingerito da qualche larva, viene di nuovo a trovarsi in ambiente liquido.

Allo scopo sono state impiegate le seguenti soluzioni: NaOH 4,5‰ e 9‰, KOH 4,5‰, 20‰ e 30‰, HCl 0,5‰ e 1‰, NaCl 4,5, 9, 15, 20, 30‰, nonché acqua di fonte e acqua distillata.

Si sono messe a confronto le uova estratte da 5 femmine di *Gonia* separatamente; metà circa di tali uova, distinte per femmina, è stata posta su carta bibula inumidita con acqua distillata, mentre l'altra metà è stata collocata pure su carta ma a secco per un uguale periodo di circa 12 ore. Il confronto tra le due serie è stato fatto dopo 30 minuti, 2 ore, 17 e 24 ore dall'immersione. Orbene in tutto questo lasso di tempo non si sono rilevate differenze apprezzabili nella schiusa tra le uova conservate a secco e le altre. Se ne conclude pertanto che un preventivo disseccamento del «germe» (almeno fino ad una durata massima di 12 ore) non costituisce una condizione indispensabile o comunque facilitante la sua schiusa una volta che sia pervenuto nelle condizioni propizie allo sgusciamiento. Del resto il fatto che alcune uova sguscino spontaneamente entro l'utero indica che un contatto prolungato con l'aria, come avviene per le uova deposte in natura sulle foglie, non è un passaggio necessario nei meccanismi che consentono l'esodo della larvetta. Da notare infine che, limitatamente ad una femmina, le più alte percentuali di schiusa si sono osservate, in entrambe le tesi, per la serie immersa in soluzione di HCl 0,5‰, indicando con ciò che il pH della soluzione non è forse rilevante agli effetti dello sgusciamiento, come peraltro si osserva talora anche in natura, visto che ci sono specie a uova microtipiche, quali ad esempio *Eumea mitis* Meig. e *Pales pavida* Meig. (cfr. il manuale di Herting, 1960) che si evolvono tanto a spese di larve di Lepidotteri che di Imenotteri sinfiti, caratterizzati da un opposto pH dei fluidi presenti nel canale alimentare: a reazione alcalina nei primi, acida nei secondi.

Anche in questa prova i risultati sono apparsi assai discordanti da femmina a femmina. Abbiamo provvisoriamente ritenuto che la causa potesse risiedere, con riferimento alle singole ♀♀, in una non sufficientemente omogenea distribuzione delle uova nei vari liquidi di schiusa

(tale operazione è in effetti estremamente difficoltosa), e con riferimento a tutte le femmine nel loro complesso, al fatto di trovarsi queste, al momento del loro impiego, in stati fisiologici diversi.

Va peraltro precisato che certe partite di uova, dimostrate del tutto refrattarie alla schiusa nei vari liquidi sperimentali, schiudono invece una volta ingerite dalle larve di Galleria, che restano infatti regolarmente parassitizzate; questo diverso destino indica una ben maggiore efficienza dell'ospite naturale rispetto alle situazioni sperimentali da noi allestite. Tali migliori condizioni possono consistere nel fatto che nell'ospite le uova subiscono in realtà un duplice trattamento: meccanico prima, a livello dell'apparato boccale, e chimico poi, a livello del canale alimentare, oppure nella maggior efficacia dei fluidi naturali rispetto a quelli da noi offerti.

IV - PROVE CONCLUSIVE CON UOVA UTERINE E UOVA DEPOSTE

Dopo le indagini preliminari solo in parte sopradescritte e che, oltre a dimostrare la complessità di un problema in apparenza semplice, hanno consentito di escludere varie ipotesi, come quella di un gradiente di schiudibilità delle uova in funzione temporale (sia con riferimento all'età della madre che a quella delle uova stesse), si è impostata una nuova sperimentazione, condotta non più in vetrini da orologio ma con vetrini porta- e coprioggetto, intesa a saggiare volta per volta fattori specifici come le sollecitazioni meccaniche, il pH delle soluzioni, gli enzimi e il tutto con particolare riguardo alle uova deposte che rappresentano la situazione che si verifica in natura.

1. *Sull'importanza delle sollecitazioni meccaniche nella schiusa.*

A) Uova uterine

Con questa prova, che è stata la più complessa, si è voluto saggiare l'efficacia degli stimoli meccanici in aggiunta a quelli chimici dei liquidi di schiusa.

In ogni caso sono state usate uova di femmine morte nelle 12-18 ore precedenti la loro utilizzazione. Laddove possibile l'utero è stato disteso e constatata, mediante schiacciamento, la presenza di larvette entro le uova, sono state utilizzate quelle situate a valle fino al gonotremo.

Le uova, in gruppetti di 30-40 elementi, vengono poste tra due vetrini, porta- e coprioggetto, separati da un lato mediante uno spessore di un decimo di mm. In base ai risultati delle esperienze precedenti, abbiamo limitato l'analisi a un idrato, un acido, un sale, acqua distillata nonché emolinfa e liquido intestinale di L_{VII} di Galleria variamente diluiti; abbiamo aggiunto in più 2 enzimi, pepsina e pectinasi.

Le schiuse delle uova provenienti da 8 femmine sono indicate nella tabella I. Per ogni liquido la prova è stata fatta con e senza schiacciamento del vetrino coprioggetto e le schiuse registrate verso lo scadere della II e della VI ora dopo l'immersione. Controlli successivi non hanno rilevato situazioni molto diverse, ed inoltre i dati sono discutibili; infatti l'esile pellicola liquida tra i due vetrini tende ad evaporare abbastanza rapidamente per cui, senza un ripetuto apporto di acqua distillata, ben presto le uova restano a secco. Comunque due rilievi così intervallati sono sufficienti ad indicarci l'andamento del fenomeno. Data la non perfetta equivalenza delle uova, le difficoltà di un loro conteggio accurato, e soprattutto delle larvette neonate che tendono a disperdersi nel liquido, e in considerazione dello scopo perseguito ci è sembrato sufficiente segnalare le schiuse con le stime approssimative indicate in tabella. Da questa emerge quanto segue:

1) Innanzitutto una notevole variabilità nelle schiuse delle uova provenienti da femmine diverse, e ciò nonostante le uova risultassero sempre, nella quasi totalità embrionate all'esame preliminare. I motivi di questo comportamento non sono apparsi al momento del tutto chiari. Peraltro abbiamo notato una maggiore disponibilità alla schiusa per le uova estratte da individui in cui l'utero e gli altri visceri erano in dissoluzione, rispetto a quelle derivate da femmine i cui organi interni apparivano ancora integri. Si potrebbe pertanto supporre che in seguito a tale disfacimento le uova vengano a contatto con sostanze che in qualche modo finiscono con l'attivarne la schiusa.

2) Il leggero ripetuto schiacciamento esercitato sul vetrino coprioggetto, quale surrogato dei fattori meccanici operanti a livello dell'apparato boccale dell'ospite, favorisce alquanto la schiusa sia anticipandone i tempi sia incrementando il numero totale delle larvette fuoriuscite dagli involucri dell'uovo, limitatamente però ai liquidi meno efficaci. Nei liquidi più attivi, quali fluidi intestinali diluiti ed emolina, la situazione appare invece capovolta. Premendo leggermente il vetrino coprioggetto la larvetta, rivestita dalla tenace membrana vitellina, forma una vistosa ernia a livello della superficie ventrale, molle ed estensibile, del corion, così che, in breve, il « germe » sguscia da quest'ultimo. Si realizza così in vitro quanto accade in vivo, dove nello stomodeo dell'ospite sono presenti, nella generalità, uova già liberate dal corion. In realtà, però, con le ripetute pressioni si possono ledere i germi situati nei settori più stretti dell'intercapedine e pertanto gli svantaggi dell'operazione superano i vantaggi nel caso di liquidi pienamente efficienti.

3) I liquidi di gran lunga più efficaci sono risultati i fluidi intestinali diluiti delle larve dell'ultima età di Galleria, che hanno provocato la schiusa pressoché totale delle uova in quasi tutti i vetrini alla VI ora e percentuali superiori al 50% già alla II ora. Impiegati in fun-

TABELLA I. - Prove di efficacia di alcune soluzioni nel determinare la schiusa di uova uterine.

Prova	età femmine	NaOH 4%		HCl 1%		NaCl 9%		H ₂ O distillata		emolinfa diluita		fluidi intesti- nali diluiti		pepsina pH 5,4		pectinasi pH 5,4		"atero"
		↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	
I	20 gg	*	**	*	**	*	**	*	**	**	***	*	***	*	*	*	**	disgregato
II	9 gg	*	*	*	*	o	o	o	*	*	*	**	***	o	*	o	o	integro
III	14 gg	o	*	o	o	*	**	o	*	**	***	**	***	o	*	*	*	integro
IV	10 gg	*	**	o	o	*	**	o	**	o	*	**	***	o	o	o	o	disgregato
V	11 gg	o	***	o	*	o	*	*	*	*	*	**	***	*	*	*	*	integro
VI	17 gg	*	*	*	**	*	**	o	***	*	**	*	***	*	*	*	*	disgregato
VII	22 gg	o	*	o	o	o	o	o	*	*	*	*	***	o	o	o	o	integro
VIII	12 gg	o	**	o	o	o	o	o	*	*	*	o	***	o	*	o	o	integro

O = nessuna schiusa
 * = qualche schiusa (1 - 10%)
 ** = media schiusa (11 - 50%)
 *** = forte schiusa (oltre 50%)
 ↓ = con schiacciamento (20 leggere pressioni sul vetrino coprioggetto)
 ↓↓ = senza schiacciamento

N.B. In ciascuna riga i simboli posti in alto a sinistra si riferiscono ai rilievi effettuati allo scadere della II ora, i simboli in basso a destra ai rilievi condotti alla VI ora.

TABELLA I bis. - Graduatoria di efficacia dei vari liquidi usati per la schiusa di uova uterine di cui alla tabella I.

Fluidi intestinali diluiti	73
Emolinfa	44
H ₂ O distillata	34
NaCl ‰	31
Pectinasi 0,037 g/l	29
NaOH 4‰	27
HCl 1‰	16
Pepsina 0,037 g/l	15

Le cifre indicano il numero di asterischi totalizzati da ciascun liquido sperimentale in 16 preparati.

zione di testimonio essi hanno così dimostrato l'inadeguatezza degli altri mezzi di schiusa, con o senza l'intervento dei cosiddetti fattori meccanici. Segue a grande distanza l'emolinfa diluita, ed ancora l'acqua distillata, NaCl 9‰, ecc., come da annesso elenco, i quali sono apparsi veramente validi soltanto in presenza di uova provenienti da femmine con visceri disgregati. Chiudono la graduatoria HCl 1‰ e pepsina che non hanno mai dato percentuali di sgusciamiento superiori al 50%, nemmeno nei casi più favorevoli, per cui parrebbe che l'ambiente acido sia il meno idoneo alla schiusa.

B) Uova deposte

In parallelo a quella con le uova uterine è stata condotta una prova con le uova deposte, saggiando i medesimi liquidi di schiusa e operando alla stessa temperatura di 23-24 °C. Le uova sono state prelevate mediante un pennellino umido da « foglie » di plastica appositamente introdotte nelle gabbie di allevamento degli adulti di *Gonia*. Su tali zimbelli infatti, ed in particolare su quelli di colore giallo e verde, le femmine ovidepongono con grande facilità.

L'esperienza è stata condotta praticamente con le stesse modalità della precedente e come quella si compone di due parti: in una vengono valutati soltanto gli stimoli per così dire chimici, nell'altra anche quelli meccanici. Per la serie non sottoposta a stimolazioni meccaniche si sono inaugurati vetrini con incavo i quali non abbisognano di un reiterato ripristino di liquido, essendo in essi l'evaporazione estremamente rallentata; per l'altra si è rimediato a questo inconveniente immettendoli in camera umida.

Le prove sono state ripetute 8 volte ed i risultati riportati nella tabella II. Come si può rilevare sono state impiegate uova di varia età (da 1 a 6 giorni dopo la deposizione) emesse da numerose femmine nell'arco di una giornata, in gabbie diverse ad esclusione della prova III e VI. Innanzitutto si nota per le uova deposte una disponibilità alla

schiusa notevolmente minore rispetto a quelle uterine, sia per la serie sottoposta a schiacciamento che, e in misura assai più evidente, per la serie non stimolata meccanicamente.

La causa di questa diversa risposta delle due categorie di uova alle stesse condizioni sperimentali, che per il momento ci è sfuggita, diverrà patente col procedere della sperimentazione.

Al solito le percentuali di schiusa sono state rilevate alla II e alla VI ora dopo l'inizio dell'esperimento. Alla fine del I intervallo nessuna larveta è fuoriuscita nei vetrini non sottoposti a « schiacciamenti », quando se ne escluda qualche raro caso per i germi immersi nei liquidi organici dell'ospite, mentre si è registrato un certo numero di schiuse nella maggioranza di quelli (in 43 vetrini su 64) sui quali si sono applicati i suddetti stimoli meccanici.

Al termine del II intervallo si è verificato qualche sgusciamento soltanto in un quarto circa dei vetrini (15 su 64) non sottoposti a compressione, mentre in quelli opportunamente « schiacciati » sono comparse le larvette in quasi tutti (61 su 64) e per di più in numero ben maggiore che al I intervallo, anche se ciò non è ben evidente in tabella, dato il sistema di valutazione fatto per classi. Dopo la VI ora sono stati compiuti rilievi solo nei preparati non sollecitati meccanicamente, i quali essendo provvisti di incavo conservano a lungo i vari liquidi; si è così potuto notare che le schiuse si protraggono almeno nei 3 giorni successivi ma la maggioranza delle larvette fuoriesce dagli involucri dell'uovo solo con l'avancorpo.

Da tutto ciò emerge, almeno nelle presenti condizioni sperimentali, la grande importanza degli stimoli meccanici che non solo determinano un ben più elevato numero di schiuse ma che le inducono anche in quei fluidi che da soli si sono dimostrati inefficaci, ed inoltre in tempi più brevi.

I liquidi più attivi, in presenza di stimoli meccanici, sono risultati NaOH al 4‰ e i fluidi intestinali diluiti delle *L_{VII}* di Galleria; a una certa distanza seguono NaCl 9‰, pectinasi, emolinfa diluita, e acqua distillata; quelli meno efficaci sono apparsi HCl 1‰ e pepsina, e quindi, in definitiva, le soluzioni decisamente acide.

In assenza di sollecitazioni meccaniche le schiuse si rarefanno bruscamente o addirittura si annullano; solo i liquidi intestinali danno risultati di un certo rilievo, cui segue a grande distanza la soluzione di NaOH al 4‰.

Nella tabella, infine, non risultano differenze apprezzabili nel numero delle schiuse in relazione all'età delle uova; solo nel caso delle prove III e VI, condotte con elementi della stessa ovatura, si osserva un netto calo in rapporto all'invecchiamento che però non ha compromesso la vitalità delle larvette, visto che anche uova vecchie di una dozzina di

giorni ed oltre e visibilmente « rinsecchite », e cioè con la superficie ventrale fortemente concava, hanno causato contro ogni aspettativa elevate percentuali di parasitizzazione (7).

Gli sgusciamenti, comunque, salvo casi eccezionali sono spesso largamente inferiori al 50% e ciò indica che i vari liquidi sperimentali, nonché le aggiuntive stimolazioni meccaniche, sono assai meno efficaci dell'ospite naturale. Pur nello stesso fluido intestinale, che è da considerarsi come una sorta di testimonio, i risultati non sono apparsi sempre del tutto soddisfacenti; ma molto probabilmente ciò è dipeso dal fatto che tali liquidi sono stati diluiti con acqua distillata in misura eccessiva per ottenerne un quantitativo sufficiente. Né si sono notate differenze apprezzabili nell'efficacia dei fluidi estratti da L_{VII} iniziali, e quindi in fase trofica, rispetto a quelli provenienti da larve imbozzolate e quindi con canale alimentare pressoché vuoto, e pertanto con caratteristiche presumibilmente diverse.

Confrontando la graduatoria di efficienza dei vari liquidi nella serie di prove con uova uterine (tabella I bis) con quella delle uova deposte (tabella II bis), si nota come esse, salvo le parti iniziale e terminale, non corrispondano. Ciò può dipendere semplicemente dal fatto che i valori per le uova deposte sono molto appiattiti e perciò le differenze non sono significative, oppure indicare che vi è una sostanziale differenza nel potere di schiusa dei vari liquidi in rapporto alla derivazione delle uova.

Oltre alle basse percentuali di schiusa c'è poi da sottolineare la lunghezza dei tempi necessari per ottenerle, mentre negli ospiti le larvette sgusciano già nel primo tratto del canale alimentare, il che significa entro la prima ora dall'ingestione (8).

Considerato tutto ciò e con lo scopo di individuare i fattori specifici che inducono la schiusa delle uova nel canale alimentare dell'ospite, si è voluto saggiare l'importanza del pH delle soluzioni nonché l'attività di alcuni enzimi.

(7) Ripetiamo che la vitalità delle uova microtipiche è davvero eccezionale; molti Autori concordano nel segnalare che le larvette sono ancora vive dopo varie decine di giorni dalla ovideposizione. Sakharov (1929), ad esempio, riferendosi a *Gonia ornata* Meig. denuncia una sopravvivenza di 2 mesi e mezzo, ed oltre.

(8) Sasaki (1918) afferma che la grande maggioranza delle uova di *Sturmia sericariae* Rond. è già dischiusa dopo soltanto 20 minuti dall'ingestione; altri Autori danno tempi anche più brevi, addirittura dell'ordine di 1 minuto (Severin et alii, 1915). Per maggiori ragguagli su tale questione vedasi Mellini, 1957.

TABELLA II. - Prove di efficacia di alcune soluzioni nel determinare la schiusa di uova deposte.

Prova	età uova	NaOH 4%		HCl 1%		NaCl 9%		H ₂ O distillata		emolinfa diluita		fluidi intestinali diluiti		pepsina pH 5,4		pectinasi pH 5,4	
		↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
I		**	*	○	○	*	○	*	○	*	○	**	**	*	○	**	○
II	1 g	*	○	○	○	○	○	○	○	*	○	○	○	*	○	○	○
III	2 gg	*	○	○	○	*	○	○	○	*	○	*	○	*	○	*	○
IV	5 gg	**	○	○	○	**	○	*	○	*	○	**	*	○	**	○	○
V	1 g	**	○	○	○	*	○	*	○	*	○	**	○	*	**	○	○
VI	6 gg	**	○	○	○	*	○	○	○	○	○	○	○	*	○	○	○
VII	6 gg	**	○	○	○	*	○	*	○	*	○	**	○	*	○	*	○
VIII	3 gg	*	○	○	○	**	○	*	○	*	○	**	*	*	○	*	○

Per la spiegazione dei simboli vedasi tabella I.

TABELLA II bis. - Graduatoria di efficacia dei vari liquidi usati nel determinare la schiusa di uova deposte (il punteggio si riferisce al numero di asterischi totalizzati da ciascun prodotto nella tabella II).

Fluidi intestinali diluiti in H ₂ O distillata	41
NaOH 4‰	26
NaCl 9‰	19
Emolinfa diluita L _{VII} Galleria	18
Pectinasi 0,037 g/l	18
H ₂ O distillata	14
HCl 1‰	13
Pepsina 0,037 g/l	12

La prova consta di 8 ripetizioni per un totale di 128 vetrini; ogni liquido di schiusa è stato provato 2 volte: con e senza stimolazioni meccaniche.

2. Efficacia del pH del liquido di schiusa

A) Uova uterine

Visti i modesti e discordanti risultati ottenuti coi precedenti liquidi di schiusa e in considerazione della notevole importanza che certi Autori, quali Moritoshi (1936) e Wishart (1956), attribuiscono al pH del mezzo, abbiamo proceduto, con le tecniche già illustrate, a saggiare l'efficacia di vari pH alcalini a confronto di quello neutro e di uno acido. Al solito è stato tenuto come testimonio il liquido intestinale diluito (circa 1:20) con acqua distillata nonché, essendo questa risultata acida con pH 5,4, diluita, in una serie parallela, con una soluzione a pH neutro.

Particolare attenzione è stata riposta nella scelta e nella distribuzione delle uova uterine nei vari fluidi. Quelle embrionate infatti sono state accuratamente rimescolate con un pennellino al fine di rendere il più possibile omogenei i vari campioni. La prova è stata ripetuta 7 volte con altrettante femmine di età diversa.

Nella tabella III, compilata secondo i criteri già esposti, si desume quanto segue. Innanzitutto si registrano percentuali di schiusa alquanto più alte nei vetrini sottoposti a leggeri e ripetuti « schiacciamenti », il che conferma una certa importanza dei fattori meccanici nel determinare lo sgusciamiento; fanno eccezione, nel loro complesso, solo i campioni posti in pH 7 e nei fluidi intestinali diluiti in acqua distillata. Ciò può forse essere spiegato col fatto che le sollecitazioni imposte provocano la morte di un certo numero di larvette entro gli involucri delle uova incuneate nella sezione più bassa dell'intercapedine.

Si conferma poi che la pressione esercitata sul coprioggetto determina uno sgusciamiento più rapido. Allo scadere della II ora infatti, in tutti i vetrini, esclusi quelli coi fluidi intestinali diluiti, le percentuali di schiusa sono più elevate nella serie sottoposta alle suddette sti-

molazioni meccaniche. Alla VI ora il divario tende a colmarsi ed in un certo numero di casi non solo le percentuali di schiusa nei vetrini sollecitati meccanicamente e non sollecitati si equivalgono, ma addirittura in questi ultimi possono superare i primi.

I tempi di schiusa sono piuttosto lunghi. Entro le prime 2 ore si sono verificati sgusciammenti solo in una metà scarsa dei vetrini non compressi e in ben 43 su 50 in quelli schiacciati. Nella grande maggioranza dei casi si è però trattato di schiuse sporadiche al di sotto del 10%; solo in 3 preparati si è superato il 50% avvicinandosi a quanto succede in natura. Alla fine della VI ora si sono registrate schiuse in tutti i vetrini premuti, ad esclusione di uno, mentre in quelli non pressati non si sono verificate schiuse di sorta in una decina di vetrini ad ulteriore conferma dell'importanza dei fattori meccanici, almeno nelle presenti condizioni sperimentali, pure per le uova uterine. C'è da notare ancora che gli sgusciammenti sono proseguiti anche oltre questo intervallo e per almeno le 24 ore successive all'inizio della prova; infatti a quel termine abbiamo constatato forti percentuali di schiusa pure in liquidi apparsi nelle prime sei ore scarsamente efficaci.

Per meglio evidenziare l'efficacia dei vari liquidi si è costruito il grafico di cui alla fig. 1. In ascisse figurano i valori del pH dei vari liquidi sperimentali nonché i testimoni rappresentati dai fluidi intestinali diluiti; in ordinata è indicato una sorta di indice di schiusa, ottenuto sommando gli asterischi, che appaiono nella tabella III, attribuiti a ciascun liquido. Precisiamo che non si è tenuto conto dei dati relativi alla I e II prova, mancando la serie dei preparati sottoposti a compressione.

Si nota subito che le schiuse aumentano notevolmente passando dal pH acido a quello neutro, per abbassarsi bruscamente al pH 8 ed accrescersi poi progressivamente fino al pH 13 che, fra le varie soluzioni, è apparsa quella di gran lunga più efficace, a parte i fluidi intestinali diluiti che, al solito, hanno determinato il numero di schiuse più elevato e non di rado prossimo al 100%⁽⁹⁾. Tali fluidi, che come si è detto rappresentano una sorta di testimonio, evidenziano la sostanziale inadeguatezza dei vari liquidi sperimentati. Il pH 13 ha causato, è vero, discrete percentuali di schiusa, però esso è palesemente nocivo per le larvette neosgusciate che in breve soccombono ed inoltre tale valore non si riscontra mai nei canali alimentari degli insetti⁽¹⁰⁾, e riteniamo degli

(9) Poiché i gruppetti di 3 asterischi che compaiono in tabella indicano schiuse superiori al 50% non resta evidenziata l'eccezionale efficienza dei liquidi intestinali rispetto a quella più modesta delle soluzioni a pH 13.

(10) Waterhouse (1949), che ha misurato il pH dei fluidi intestinali delle larve di ben 39 specie di Lepidotteri, ha trovato che il valore più alto è pari a 10,20.

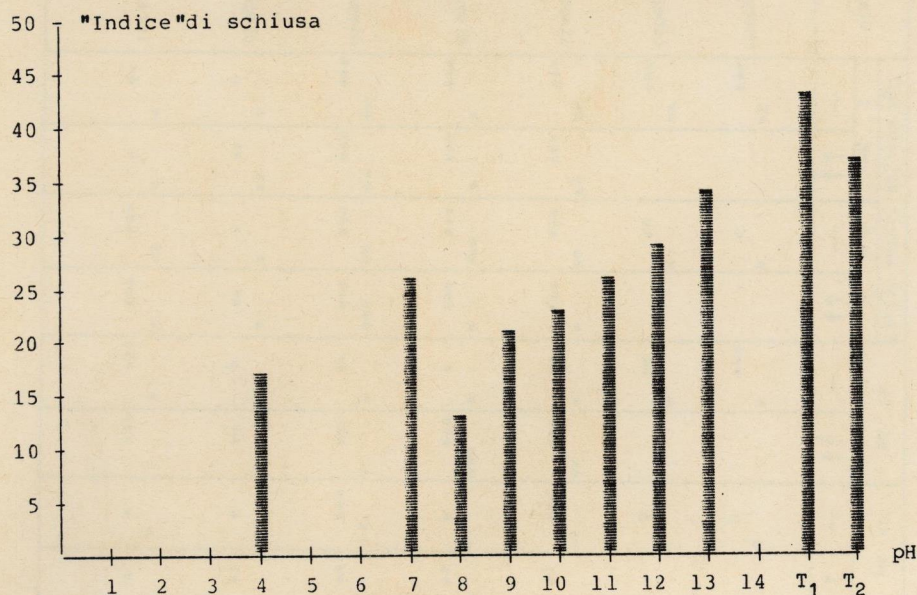


FIG. I

Efficacia comparata di soluzioni a diverso pH nel determinare la schiusa di uova uterine di *G. cinerascens* Rond. Si tenga presente che il criterio di valutazione adottato ha finito col «premiare» notevolmente i liquidi meno efficienti.

T₁ : testimonio, a base di «fluidi intestinali» di L_{VI} di *Galleria mellonella* L. diluiti in acqua (pH 5,4);

T₂ : gli stessi fluidi diluiti in soluzione a pH 7.

animali in genere, data la sua dannosità nei riguardi dei tessuti viventi, per cui in pratica esso non è mai operante in natura.

Nelle larve di *Galleria* il valore del pH nel tubo digerente si aggira intorno a 8,4 (Wigglesworth, 1972), mentre nella prova i liquidi con pH 8-9 hanno dato le percentuali di schiusa più basse. Evidentemente nell'ospite naturale entrano in gioco anche altri fattori per determinare lo sgusciamiento delle uova microtipiche; e poiché questo avviene nel canale alimentare è parso logico supporre che essi vadano ricercati tra gli enzimi.

Rileviamo da ultimo che, a parità di condizioni sperimentali, dalle uova uterine si ottengono al solito percentuali di schiusa notevolmente superiori rispetto alle uova deposte, ed inoltre che la schiudibilità è nettamente maggiore per le uova provenienti da femmine in cui l'utero e gli altri visceri siano entrati in completo disfacimento.

B) Uova deposte

È bene sottolineare ancora una volta che l'esperienza con le uova deposte è più significativa di quella con le uova uterine per varie ragioni.

Innanzitutto esse provengono da numerose femmine (anche una cinquantina) e quindi i vari campioni sono più rappresentativi, poi essendo emesse a sviluppo embrionale terminato la loro schiudibilità è garantita, come abbiamo constatato, attorno ad una media del 90%, inoltre per esse è escluso ogni contatto con i liquidi addominali della femmina che potrebbero modificare, in qualche modo, la loro disponibilità alla schiusa, ed infine esse, proponendo la situazione che si verifica in natura, si prestano meglio a identificare i fattori che ne inducono la schiusa.

Sulle modalità del loro prelievo dagli zimbelli di plastica sui quali le femmine in cattività depongono facilmente, purché di caratteristiche appropriate (lavoro in corso), si è già detto, come pure della loro traslazione nei vari liquidi di schiusa in vetrini portaoggetto. La temperatura ambientale durante la prova si è aggirata, come nelle altre esperienze, sui 22-23 °C.

Sono state effettuate 6 ripetizioni con « ovature » di età diversa da 1 a 6 giorni; ciascuna ripetizione, al solito, comprende due serie parallele di prove, una in assenza di stimolazioni meccaniche e l'altra in cui il vetrino coprioggetto è stato sottoposto a deboli e ripetute pressioni.

Come si può osservare nella tabella IV, riassuntiva di questa esperienza, le schiuse sono state assai limitate.

Alla scadenza del I intervallo (2 ore) nei preparati non sottoposti a pressione si è notata qualche larvetta solo in 7 vetrini su 54, e più precisamente in uno con soluzione a pH 13 e in tutti e 6 quelli con fluido intestinale diluito. Nei vetrini sottoposti a sollecitazioni meccaniche i risultati sono apparsi alquanto migliori, essendosi registrata qualche schiusa, alla fine dello stesso tempo, in 15 vetrini sparsi tra tutte le tesi esclusa quella riferentesi al pH acido.

Al termine della VI ora gli sgusciamenti nei preparati non sottoposti a pressione hanno mostrato un incremento molto modesto, interessando 13 campioni in tutto e per di più confinati solo tra quelli con soluzioni a pH 12, pH 13 e fluidi intestinali diluiti. Nella serie cui sono state applicate stimolazioni meccaniche, schiuse, seppure percentualmente basse, si sono verificate in 36 vetrini su 54, ed in pratica in tutti i liquidi messi a confronto.

Il grafico della fig. II, costruito sommando i dati di entrambe le serie, dà un'idea immediata e comparativa dei risultati conseguiti con i vari pH sperimentati. Come si vede le schiuse ottenute nelle soluzioni con pH da 4 a 11 sono pressoché irrilevanti; esse cominciano a divenire alquanto consistenti col pH 12, ma solo col pH 13 e specialmente coi liquidi intestinali si ottengono risultati di tutto rilievo. Si conclude pertanto che il pH delle soluzioni, di per sé, non riveste in natura grande importanza nel determinare la schiusa delle uova microtipiche, poiché i valori in cui esso mostra una decisa efficacia non si riscontrano nel

canale alimentare dei possibili ospiti, ed in ogni caso sono incompatibili con la sopravvivenza delle larvette neosgusciate. Il meccanismo di azione va probabilmente ricercato nel loro forte potere caustico che irritando le larvette le spinge a sfuggire ad uno stimolo tanto molesto e nocivo.

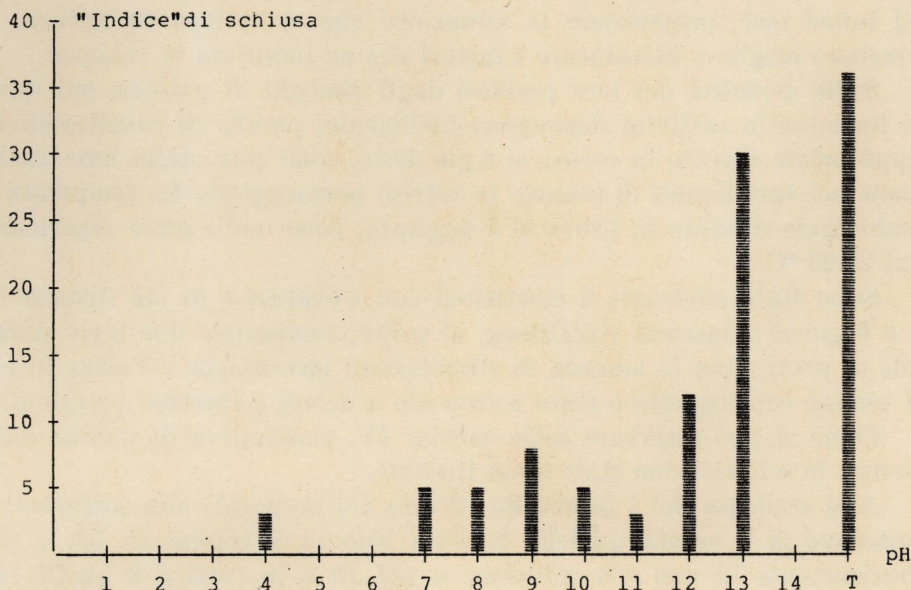


FIG. II

Efficacia comparata di vari pH e dei fluidi intestinali di *L. VII* di *Galleria* (T) nel determinare la schiusa di uova deposte di *Gonia*. Il grafico è stato ottenuto sommando i dati convenzionali (asterischi di cui alla tabella IV) di 6 doppie ripetizioni (in presenza e in assenza di sollecitazioni meccaniche) per un totale di 108 vetrini

Neppure le sollecitazioni meccaniche, almeno quali noi abbiamo impartito, sono apparse concretamente efficaci. È vero che in un maggior numero di preparati sottoposti a tale trattamento sono comparse le larvette, ma si è trattato di sgusciami puramente occasionali ed inoltre nel testimonio, dove le schiuse sono apparse generalizzate, in pratica non si riscontrano differenze tra i vetrini schiacciati e non.

Facciamo da ultimo notare che il confronto tra i grafici delle figg. I e II mette bene in evidenza la diversa schiudibilità, in identiche condizioni sperimentali, delle uova uterine rispetto a quelle deposte e dà anche una misura dell'efficacia dei liquidi organici delle femmine di *Gonia*, ivi compresi quelli intestinali, che durante la dissezione finiscono il più delle volte col bagnare almeno una parte delle uova.

TABELLA IV. - Prove di efficacia di alcune soluzioni a diverso pH e di stimoli meccanici nel determinare la schiusa di uova deposte.

Prova	età uova	pH 4		pH 7		pH 8		pH 9		pH 10		pH 11		pH 12		pH 13		fluidi intestinali di- luifi	
		↓↓	—	↓↓	—	↓↓	—	↓↓	—	↓↓	—	↓↓	—	↓↓	—	↓↓	—		↓↓
I	5-6gg	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	*
		*	o	*	o	*	o	*	o	*	o	o	o	o	o	o	o	o	**
II	2 gg	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	*
		*	o	*	o	*	o	*	o	*	o	o	o	o	o	o	o	o	****
III	3 gg	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	*
		o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	*
IV	1 g	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	**
		*	o	*	o	*	o	*	o	*	o	o	o	o	o	o	o	o	****
V	1 g	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	*
		o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	*
VI	2 gg	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	*
		o	o	*	o	*	o	*	o	*	o	o	o	o	o	o	o	o	**

Per la spiegazione dei simboli vedasi la tabella I.

3. *Efficacia degli enzimi in generale nella schiusa*

Al solito la ricerca è stata condotta su uova uterine e su uova deposte, mentre sono state abbandonate le stimolazioni meccaniche dimostrate di utilità sostanzialmente limitata.

In una prima esperienza, con uova uterine, è stata messa a confronto l'efficacia dei vari enzimi, indicati nella tabella V, operanti nelle soluzioni a pH ottimale, con l'efficacia dei medesimi al pH standard dei fluidi intestinali delle larve di VII età di Galleria, pari a 8,4. La prova è stata ripetuta 6 volte con altrettante femmine di Gonia e ha indicato in modo inequivocabile la superiorità dei liquidi a pH adeguato agli enzimi presenti. Agli effetti della schiusa questi hanno infatti totalizzato un punteggio pari a 65 contro 7 appena, raggiunto nei liquidi enzimatici al pH uniforme di 8,4.

Tale risultato evidenzia dunque una ben maggiore efficacia degli enzimi usati, rispetto al semplice pH dei liquidi, nell'indurre lo sgusciamiento delle larvette. In ogni caso però i fluidi intestinali di Galleria, impiegati al solito in funzione di testimoniaio, hanno dato, sebbene fortemente diluiti (in soluzione a pH 8,4), percentuali di schiusa notevolmente superiori.

Con una seconda esperienza, condotta ancora su uova uterine, si è voluto cercare una riconferma dell'efficacia degli enzimi nel determinare la schiusa. Allo scopo sono state poste a confronto le varie soluzioni enzimatiche a pH ottimale con le stesse soluzioni prive di enzimi. L'esito della prova, ripetuta anch'essa 6 volte con altrettante femmine di Gonia, è sembrato smentire l'importanza degli enzimi, avendo questi raggiunto complessivamente un punteggio di 51 contro 45 totalizzato dalle varie soluzioni. Poiché si sono notati dati nettamente contrastanti nelle varie ripetizioni, e poiché in particolare si è visto che le uova provenienti da femmine con utero e gli altri visceri disfatti davano elevati tassi di schiusa nella maggior parte delle soluzioni impiegate, si è supposto che il contatto delle uova con i liquidi addominali delle stesse femmine di Gonia morte potesse favorire lo sgusciamiento ⁽¹¹⁾.

La verifica di tale ipotesi è stata subito ottenuta ponendo gruppi di uova deposte, e pertanto non « contaminate » nel suddetto modo, nei liquidi organici fortemente diluiti con soluzione a pH 7,4 di individui di Gonia, sia maschi che femmine, morti da non più di 24 ore.

(11) Le eccezioni sono rappresentate dalle soluzioni non enzimatiche a pH 5, pH 4 e pH 8 nonché, sebbene in modo meno evidente, dalle corrispondenti soluzioni con cellulasi, pectinasi e tripsina, per cui è probabile che sia le une che le altre interferiscano negativamente con i fattori di provenienza materna che favoriscono la schiusa.

In quasi tutti i vetrini si è ottenuta la schiusa pressoché totale delle larvette, proprio come avviene nei liquidi intestinali diluiti delle larve di Galleria.

Così si spiega anche la presenza di larvette libere in mezzo alla massa delle uova nell'addome delle femmine di *Gonia* morte da qualche tempo, e perché, sempre, le uova provenienti da femmine morte e con l'utero disgregato diano, a parità di trattamento, percentuali di schiusa enormemente superiori alle uova deposte.

In base a queste constatazioni si è ripetuta l'esperienza intesa a evidenziare il ruolo degli enzimi quali agenti stimolanti la schiusa delle uova microtipiche, impiegando non più uova uterine bensì uova deposte. I risultati compaiono nella tabella VI. Innanzitutto si osserva che i dati delle varie tesi sono decisamente costanti nelle 6 ripetizioni, e ciò indica l'alta significatività della prova, e di conserva che l'età delle femmine ovideponenti (variante da 12 a 25 giorni) non è rilevante agli effetti della schiusa. Si fa notare poi che il testimonio, rappresentato dai fluidi intestinali delle larve di Galleria, è doppio, avendoli diluiti in soluzione a pH 8,4 (valore indicato come proprio del tubo digerente dei suddetti Lepidotteri dagli Autori; vedi Wigglesworth, 1972) nonché in soluzione a pH 7,4, valore minimo da noi misurato nei medesimi organi (massimo 7,93).

Gli enzimi più efficaci sono apparsi la tripsina e la pepsina che hanno dato, sempre, percentuali di schiusa vicine a quelle dei liquidi intestinali, anche se la loro azione è apparsa alquanto più lenta. Infatti mentre i primi, alla scadenza della II ora dall'immersione delle uova, inducono tassi di sgusciamiento prossimi al 10% e superano il 50% solo verso la VI ora, i secondi sovente raggiungono quest'ultimo livello già alla fine del I intervallo. L'efficacia dei suddetti enzimi appare poi evidentissima dal confronto con le corrispondenti soluzioni a pari pH, ma prive di questi biocatalizzatori, nelle quali le schiuse sono state del tutto sporadiche (pH 2) o addirittura nulle (pH 8). Col lisoenzima lo sgusciamiento è stato modesto e pari all'incirca a quello registrato nel liquido con lo stesso pH. Del tutto trascurabili, poi, o nulle le schiuse con gli altri enzimi e con le corrispondenti soluzioni prive di tali principi attivi.

L'importanza fondamentale dei suddetti due enzimi, a paragone con il semplice pH delle soluzioni, è anche dimostrata dal fatto che essi sono apparsi parimenti efficaci pure funzionando uno (la tripsina) in liquido a reazione leggermente alcalina (pH 8), e l'altro (la pepsina) in liquido fortemente acido (pH 2) e quindi a caratteristiche profondamente diverse da quello presente nel tubo digerente delle larve di Galleria e dei Lepidotteri in genere.

Un terzo controllo effettuato alla scadenza delle 24 ore ha dimostrato la possibilità di ulteriori schiuse nei liquidi meno efficaci sia

contenenti enzimi che privi, denunciando con ciò, accanto a quella dei fattori chimici, l'importanza del fattore tempo nel determinare la schiusa. Peraltro va sottolineata l'assoluta inefficienza, anche per i tempi lunghi, delle soluzioni a pH 8, pH 5 e pH 4 (che anche nelle due prove precedenti si erano piazzate in fondo alla graduatoria) e con takadiastasi, nelle quali non si è verificata nemmeno una schiusa. Da notare infine, a riguardo di questo ultimo enzima, che la corrispondente soluzione non enzimatica ha invece realizzato sia pure a 24 ore, ma in tutte e 6 le ripetizioni, un numero non trascurabile di sgusciamenti, per cui sembrerebbe che tale enzima espliciti addirittura un'azione negativa ⁽¹²⁾.

Un'ultima verifica, compiuta a 2 giorni di distanza, ha portato alla constatazione di ulteriori modesti sgusciamenti, spesso parziali, per le uova immerse nei liquidi meno favorevoli. Si è anche confermata l'assoluta mancanza di schiuse nelle soluzioni a pH 8, pH 5 e con takadiastasi per cui ne deriva che se il mezzo si rivela del tutto negativo nelle prime 24 ore, esso si manterrà tale anche in seguito.

Attraverso quale meccanismo pepsina e tripsina inducano la fuoriuscita delle larvette dagli involucri dell'uovo non ci è dato di sapere. Nei liquidi intestinali di Galleria, che si sono mostrati tanto validi anche se fortemente diluiti, si è notato che l'esile e molle corion ventrale finisce con l'essere completamente distrutto nel giro di circa 6 ore, e in quelli pure efficaci ma ad azione lenta contenenti i 2 suddetti enzimi entro le 20 ore, mentre nelle altre soluzioni, poco o nulla attive, il corion ventrale, più o meno espanso a mo' di vescichetta, è risultato ancora integro alla 30^a ora. Sembra perciò lecito ipotizzare che la schiusa sia indotta o comunque favorita dalle alterazioni, sfocianti nella distruzione completa di tale porzione del guscio, operata da certi biocatalizzatori.

(12) Si osservi come per le uova uterine i liquidi contenenti questo enzima, abbiano invece dato buoni risultati e come esattamente l'opposto sia accaduto per quelli con la tripsina. Ribadiamo comunque che sono da ritenersi più attendibili, per le ragioni già illustrate, i risultati delle prove condotte con uova deposte.

TABELLA V. - Prove di efficacia di vari enzimi in soluzioni a pH per loro ottimali e in soluzione standard a pH 8,4 per lo sguisciamento di uova uterine.

Prova	età femmine	Lisoenzima		Pectinasi		Pepsina		Tripsina		Takadiastasi		Cellulasi		Fluidi intestina- li diluiti		Utero
		pH 7,4	pH 8,4	pH 4	pH 8,4	pH 2	pH 8,4	pH 8	pH 8,4	pH 7	pH 8,4	pH 5	pH 8,4	pH 8,4	pH 8,4	
I	11 gg	o	o	o	o	o	o	o	o	*	o	o	o	**	***	integro
		***	o	o	o	***	*	o	*	***	o	o	*	***	***	
		***	o	*	o	***	***	***	***	***	***	*	***	***	***	
II	11 gg	o	o	o	o	o	o	o	o	**	o	o	o	o	o	integro
		***	o	o	o	*	*	o	o	***	o	o	o	***	***	
		***	o	*	o	*	***	o	o	***	**	o	o	***	***	
III	18 gg	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	integro
		o	o	o	o	**	**	o	o	*	o	o	o	o	o	
		**	o	**	o	**	**	o	o	***	o	o	o	*	o	
IV	17 gg	***	o	*	*	*	o	o	o	**	o	o	o	*	*	integro
		***	o	*	*	**	o	o	o	***	o	o	o	***	***	
		***	o	*	*	***	o	o	o	***	o	o	o	***	***	
V	13 gg	***	o	*	o	**	o	o	o	***	o	o	o	***	***	integro
		***	o	*	o	***	o	o	o	***	o	o	o	***	***	
		***	o	***	o	***	o	*	***	***	***	o	o	***	***	
VI	8 gg	*	o	o	o	o	o	o	o	*	o	o	o	*	*	integro
		*	o	o	o	o	o	*	***	o	o	o	o	***	***	
		*	*	o	o	o	o	***	***	***	o	o	o	***	***	

N.B. Per ciascuna prova i simboli situati in alto si riferiscono ai rilievi effettuati allo scadere della II ora, quelli in mezzo alla fine della VI ora, quelli in basso al compimento delle 24 ore.
 Gli uteri sono stati prelevati, eccettuata la prova III, da femmine morte da non più di 24 ore.

TABELLA VI. - Prove comparate di efficacia tra vari enzimi nelle soluzioni a pH per loro ottimali e le corrispondenti soluzioni non enzimatiche per la schiusa di uova deposte.

Prova	età femmine	pH 7,4		pH 4		pH 2		pH 8		pH 7		pH 5		Fluidi intestinali diluiti		
		Lisoenzima	---	Pectinasi	---	Pepsina	---	Tripsina	---	Takadiastasi	---	Cellulasi	---	pH 8,4	pH 7,4	
I	24 gg	*	o	o	*	*	o	*	o	o	o	o	*	*	**	
		*	o	o	***	***	o	***	o	o	o	o	o	***	***	***
		*	o	o	***	***	o	***	o	o	*	o	o	***	***	***
II	18 gg	o	o	o	*	*	o	*	o	o	o	o	o	***	**	
		*	o	o	***	***	o	***	o	o	o	o	o	***	***	***
		**	o	o	***	***	o	***	o	o	*	o	o	***	***	***
III	12 gg	o	o	o	*	*	o	*	o	o	o	o	o	***	***	
		**	o	o	***	***	o	***	o	o	o	*	o	***	***	***
		***	o	o	***	***	o	***	o	o	*	*	o	***	***	***
IV	25 gg	o	o	o	*	*	o	*	o	o	o	o	o	***	**	
		*	o	o	***	***	o	***	o	o	*	o	o	***	***	***
		**	o	o	***	***	o	***	o	o	**	o	o	***	***	***
V	19 gg	o	o	o	o	o	o	*	o	o	o	o	o	***	**	
		*	o	o	**	**	o	**	o	o	*	o	o	***	***	***
		**	o	*	**	**	o	**	o	o	*	o	o	***	***	***
VI	13 gg	o	o	o	*	*	o	*	o	o	o	o	o	***	o	
		*	o	o	**	**	o	**	o	o	o	o	o	***	***	***
		**	o	o	**	**	o	**	o	o	**	o	o	***	***	***

N.B. Come nella tabella precedente vengono qui trascritti anche i valori di schiusa rilevati alla 24^a ora dopo l'immersione.

TABELLA VI bis. - Graduatoria di efficacia di alcuni enzimi e dei pH delle corrispondenti soluzioni per la schiusa di uova deposte dopo 6 ore dall'immersione.

Fluidi intestinali diluiti di larve di Galleria (in funzione di testimonio):

	34 (a pH 8,4)	e	29 (a pH 7,4)	
Tripsina	(0,037 g/l)		(pH 8) : 24	pH 8 : 0
Pepsina	(0,037 g/l)		(pH 2) : 21	pH 2 : 4
Lisoenzima	(0,037 g/l)		(pH 7,4) : 8	pH 7,4 : 7
Pectinasi	(0,037 g/l)		(pH 4) : 4	pH 4 : 0
Cellulasi	(0,037 g/l)		(pH 5) : 1	pH 5 : 0
Takadiastasi	(0,037 g/l)		(pH 7) : 0	pH 7 : 1

4. Efficacia degli enzimi del canale alimentare delle larve di Galleria mellonella L. sulla schiusa.

Visto che alcuni enzimi favoriscono in modo patente le schiuse e considerato che i fluidi del canale alimentare delle larve di VII età di Gonia, usati come testimonio, sono apparsi ancor più efficaci, mentre il pH delle soluzioni non ha mostrato di per sé alcuna rilevanza (escluso ai livelli più alti), abbiamo voluto fare una prova conclusiva atta ad evidenziare, in modo incontrovertibile la validità degli enzimi quali principali fattori di schiusa.

La prova, ripetuta 12 volte impiegando uova deposte da numerose femmine su varie « foglie » di plastica, in gabbie diverse, ha messo a confronto 3 liquidi: acqua distillata a pH 7, fluidi intestinali normali (quindi con la carica enzimatica naturale) e fluidi intestinali sterilizzati in provetta mediante ebollizione per 2 minuti e pertanto praticamente privi di attività enzimatica. Nelle prove I-VI i liquidi del canale alimentare sono stati fortemente diluiti in acqua distillata a pH 7 in ragione di circa 1 a 100; nelle prove VII-XII la diluizione è stata minore, approssimativamente 1:10. Ciascun campione comprendeva circa una quarantina di uova.

I risultati appaiono nella tabella VII, ove, a differenza delle precedenti, sono trascritti i dati di 4 rilievi, e cioè allo scadere della 2^a, 4^a, 6^a e 20^a ora (limitatamente però alle prime 6 prove) ed inoltre, per calibrare meglio l'efficacia, anziché ricorrere ad una stima approssimativa si è riportato il numero reale delle schiuse.

Nelle prove I-VI i fluidi intestinali non sottoposti a ebollizione, ma enormemente diluiti, mostrano una efficacia modesta, in ogni caso però decisamente superiore agli altri due liquidi a confronto. Alla VI ora si notano sgusciamenti in tutti e 6 i vetrini, contro 2 soltanto per quelli con fluido previamente bollito e nessuno in quelli con acqua distillata. Il vantaggio si mantiene inalterato, in termini di numero di schiuse, anche alle verifiche successive: alla 20^a ora le larvette nei suddetti liquidi

superano di circa 3 volte quelli presenti nei liquidi bolliti e di 6 volte quelli in acqua, anche se coi tempi lunghi qualche schiusa, completa e/o parziale, tende a verificarsi in tutti i preparati.

Nelle prove VII-XII coi liquidi intestinali moderatamente diluiti, quelli non portati ad ebollizione hanno lasciato sgusciare nelle prime 6 ore un numero di larvette circa quadruplo rispetto alla corrispondente serie delle prove precedenti, ma, e ciò è più importante, hanno dato un numero di schiuse ben 30 volte superiore alla II ora e di 5 volte alla IV ora. Non solo, ma al I controllo si sono verificate schiuse in 5 vetrini su 6 contro i 2 soltanto della serie precedente. Tutto ciò dimostra chiaramente l'importanza della concentrazione degli enzimi agli effetti della precocità degli sgusciamenti. In altri preparati di esperienze precedenti, in cui i fluidi intestinali erano stati diluiti in misura ancora minore, la schiusura di tutte, o quasi, le uova si è avuta nel giro di sole 2 ore. Si ritiene pertanto che la carica enzimatica presente nel canale alimentare delle larve di *Galleria* rappresenti il fattore essenziale nel determinare uno sgusciamiento non solo generalizzato ma anche in tempi brevi delle uova ingerite col pabulum; e si noti che la tempestività della schiusa è una condizione indispensabile per assicurare la presa di possesso dell'ospite, vista la relativa rapidità con la quale il contenuto del tubo digerente fluisce verso l'apertura anale.

L'efficacia dei corrispondenti liquidi intestinali portati ad ebollizione si mantiene modesta: in essi sono comparsi solo 1/9 delle larve alla II ora, 1/6 alla IV ora ed ancora 1/6 alla VI ora rispetto a quelle presenti nei liquidi non bolliti. Le schiuse rispetto ai corrispondenti liquidi delle prove I-VI sono apparse solo lievemente incrementate nonostante la ben maggiore concentrazione. Anche questo ci sembra un ulteriore argomento a favore dell'azione determinante degli enzimi in riguardo alla schiusa delle uova microtipiche: dato che l'ebollizione li inattiva non ha evidentemente importanza la loro carica iniziale.

In tutte le prove gli sgusciamenti sono apparsi del tutto sporadici nell'acqua distillata.

È interessante notare come anche gli stadi quiescenti di parassiti, sia Protozoi che Metazoi, di Vertebrati che penetrano nell'ospite per via orale siano in larga misura attivati dalle cariche enzimatiche presenti nel canale alimentare. Il loro meccanismo d'azione sembra consistere, in certi casi, in una parziale lisi della parete della cisti, in altri, invece, in una stimolazione diretta che attiva ed induce il parassita a fuoriuscire coi propri mezzi (Lackie, 1975). Quest'ultima modalità sembra valere anche per la nostra *Gonia*, dato che le larvettine sono fornite di uncino boccale sclerificato col quale, come abbiamo visto in varie occasioni, incidono gli involucri dell'uovo.

TABELLA VII. - Confronto tra le schiuse ottenute in liquidi intestinali diluiti di larve di *Galleria* non sottoposti e sottoposti a ebollizione, a riprova dell'importanza degli enzimi quali fattori di schiusa.

Prova	H ₂ O distillata pH 7				Fluidi intestinali diluizione: ca. 1:100				Prova	H ₂ O distillata pH 7			Fluidi intestinali diluizione: ca. 1:10									
					non sterilizzati		sterilizzati						non sterilizzati			sterilizzati						
	2h	4h	6h	20h	2h	4h	6h	20h		2h	4h	6h	2h	4h	6h	2h	4h	6h				
I	0	0	0	*	1	5	8	12*	0	0	0	6*	VII	0	0	0	10	14	16	0	1	1*
II	0	0	0	*	0	4	5	7*	0	0	0	2*	VIII	0	0	0	9	12	14	0	0	1
III	0	0	0	2*	1	5	6	14*	0	2	4	6*	IX	0	0	*	18	20	25	0	2	2*
IV	0	0	3	3*	0	1	1	8*	0	0	1	2*	X	0	0	0	14	22	25	4	4*	4*
V	0	0	1	4*	0	5	10	13*	1	6	7	7*	XI	0	0	0	0	17	21	2	3	3*
VI	0	0	0	1*	0	1	1	8*	0	0	0	*	XII	0	1	2	10	17	20	1	7	8

* Indica la presenza di L₁ sgusciate solo parzialmente.

N.B. A differenza di tutte le altre tabelle viene qui riportato il numero delle larvette sgusciate.

5. Schiudibilità delle uova uterine estratte da femmine di *Gonia vive*.

In questa condizione sperimentale le uova sono state sì prelevate dalle vie genitali materne, ma non sono venute a contatto con i liquidi organici della madre essendone tutti i visceri perfettamente integri. Ciò nonostante si mostrano anche siffatte uova uterine più disponibili per la schiusa rispetto a quelle deposte? La prova è stata condotta utilizzando quei fluidi che nel corso dell'esperienza si sono mostrati maggiormente attivi, nonché i liquidi organici di *Gonia morte* per confermarne la validità.

Al solito i più efficaci sono risultati i fluidi intestinali diluiti di larve di *Galleria*, che in una metà delle prove hanno dato il 50% di schiuse

già alla II ora, e la quasi totalità alla VI ora, come si può rilevare nella tabella VIII.

Elevati pure gli sgusciamenti nella soluzione tampone a pH 13, che però ha dimostrato un'azione più lenta (in nessun preparato sgusciamenti sopra il 50% nelle prime 2 ore) anche se, coi tempi lunghi, pressoché totale.

Parimenti dicasi per la pepsina e la tripsina che pure hanno dato elevate percentuali di sgusciamiento ma solo per immersioni molto prolungate: alla II ora nessuna oppure solo qualche rara larveta, salvo casi eccezionali.

I fluidi Gonia hanno mostrato una efficacia intermedia, inferiore comunque alle aspettative, ma ciò può essere dipeso dalla loro eccessiva diluizione, fatta con soluzione a pH 8,4, per le prime 3 prove e con H₂O distillata a pH 7 per le altre tre; quest'ultima è sembrata alquanto più attiva.

L'acqua distillata e NaOH 4‰ hanno svolto un'attività piuttosto modesta e spostata sui tempi più lunghi: nessuna schiusa alla II ora, poche alla VI, varie, e circa in una metà dei vetrini superiore al 50%, alla XX.

Del tutto occasionali sono poi apparsi gli sgusciamenti in NaCl 9‰, che invece si era classificato in posizione intermedia con le uova uterine di femmine morte (vedasi tabella I bis).

In base alla presente prova pare si possa concludere quanto segue:

a) Esiste una notevole differenza nella schiudibilità delle uova provenienti da femmine diverse (massima per la VI, minima per la II); tale diversità è rilevabile soprattutto a livello dei liquidi meno efficaci, fatto che peraltro è emerso anche in prove precedenti. Nei liquidi più efficaci, quali fluidi intestinali diluiti, e soluzione a pH 13, le differenze scompaiono, le uova di tutte le femmine schiudono infatti con percentuali prossime al 100%.

b) Le uova uterine prelevate da femmine vive mostrano una schiudibilità di fronte ai liquidi meno efficaci, per così dire, intermedia tra quella assai bassa delle uova deposte e quella talora notevole delle uova uterine di femmine morte. Ciò può dipendere dal fatto che, per quanta attenzione si ponga nella dissezione, tracce di liquidi organici della madre viva possono venire a contatto con le uova facilitandone la schiusa.

TABELLA VIII. - Prove di efficacia, dei liquidi mostratisi più attivi nella precedente sperimentazione, sulla schiusa di uova *uterine* di femmine *vive* di Gonia.

Prova	età femmine	H ₂ O distillata pH 7	NaCl 9%	NaOH 4%	Soluzione tampone pH 13	Pepsina	Tripsina	Fluidi intestinali Gal-leria pH 8,4	Fluidi Gonia
I	19 gg	○ ** ***	○ ** ***	○ ○ ○	* ** ***	*** **	** ***	* ***	○ ○ **
II	17 gg	○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○	* ** ***	* ** ***	○ ** ***	** ***	○ * **
III	14 gg	○ ○ ○ ***	○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○	* *** ***	○ * **	○ ** ***	** ***	○ ** ***
IV	21 gg	○ ○ ○ ***	○ ○ ○ ○	○ ** **	** *** ***	○ ** ***	○ * ***	*** ***	* * **
V	15 gg	○ * * *	○ ○ ○ *	○ *** ***	** *** ***	○ ** ***	○ * ***	*** ***	* ** ***
VI	9 gg	○ ** ***	○ * ***	○ ** ***	** *** ***	** *** ***	* *** ***	*** ***	○ *** ***

N.B. I rilievi sono stati effettuati alla II, alla VI e alla XX ora dopo l'immersione delle uova nei vari liquidi.

TABELLA VIII bis. - Graduatoria di efficacia dei liquidi dimostratisi più efficaci, nel corso di tutta la presente sperimentazione, per la schiusa di uova uterine di femmine vive di Gonia.

Fluidi intestinali di larve di Galleria	50
Soluzione tampone pH 13	42
Pepsina	36
Tripsina	33
Fluidi in toto di Gonia	26
Acqua distillata pH 7	18
NaOH 4‰	15
NaCl 9‰	9

RIASSUNTO

Sono stati studiati i fattori che inducono lo sgusciamiento delle uova microtipiche di *Gonia cinerascens* Rond. La ricerca è stata condotta sia su uova uterine di femmine vive e di femmine morte, che su uova deposte in cattività, immergendole in vari liquidi e sottoponendole, in una serie di prove, anche a stimolazioni meccaniche consistenti in brevi e ripetute compressioni.

Innanzitutto si è osservato che tali pressioni, quali surrogato dei fattori meccanici operanti sull'uovo a livello dell'apparato boccale dell'ospite, favoriscono in qualche misura lo sgusciamiento soprattutto anticipandolo in quasi tutti i preparati ed inoltre consentendolo, sia pure occasionalmente, nei liquidi di per sè poco o nulla efficaci; in seguito però le schiuse nei liquidi efficaci non sottoposti a sollecitazione sopravanzano generalizzandosi. Si conclude pertanto che gli stimoli meccanici non sono indispensabili in presenza di stimolazioni d'ordine chimico veramente valide.

In identiche condizioni sperimentali il tasso di sgusciamiento aumenta fortemente passando dalle uova deposte a quelle uterine da cui le larvette sono fuoriuscite, anche in misura molto alta, in tutti i liquidi usati, sia a reazione basica che acida, nonché nella semplice acqua distillata a pH neutro. Sempre elevatissima, e non di rado totale, è poi la schiusa delle uova estratte da femmine morte e con visceri oramai disgregati.

Per le uova deposte il pH delle soluzioni è apparso veramente efficace solo per valori elevati (13) e quindi a livelli che non si riscontrano nel canale alimentare delle possibili vittime, e d'altronde incompatibili per la vita delle stesse larvette neonate.

Sempre su uova deposte che, riproponendo la situazione naturale, danno risposte più convincenti e più chiare, il confronto tra soluzioni contenenti enzimi e soluzioni che ne sono prive, ma aggiustate allo stesso pH ottimale per l'azione dei vari enzimi, hanno evidenziato una notevole efficacia della pepsina e della tripsina anche a dosi molto deboli. Da notare poi, ad ulteriore conferma della scarsa importanza del pH di per sè, che la prima è stata impiegata in soluzioni a pH 2, mentre i fluidi intestinali dell'ospite sono decisamente basici (pH 8,4), come del resto nella generalità delle larve dei Lepidotteri. Una convincente riprova della importanza determinante degli enzimi, nel provocare la fuoriuscita delle larvette dagli involucri dell'uovo, ci è offerta dal confronto di efficacia tra i liquidi intestinali di larve di Galleria, fortemente diluiti, sottoposti o non ad ebollizione; infatti mentre nei primi si sono registrate solo schiuse occasionali, nei secondi le percentuali sono state elevatissime. Altre prove hanno poi indicato che anche la spiccata schiudibilità delle uova uterine di femmine morte con visceri in disgregazione è imputabile, quasi certamente, all'azione dei complessi enzimatici della stessa Gonia che finiscono con l'entrare in contatto con le uova.

Le soluzioni enzimatiche oltre a favorire un generale sgusciamento esercitano, a differenza delle altre, una azione molto rapida. Ciò, in natura, è di fondamentale importanza, visto che gli alimenti impiegano circa 4 ore a percorrere l'intero canale alimentare delle larve di VII età di Galleria, per cui le uova che tardano a schiudere vengono espulse con le feci. La rapidità d'azione è apparsa tanto maggiore quanto più è elevata la concentrazione degli enzimi; essa è risultata massima per i fluidi intestinali poco diluiti dell'ospite. Si conclude pertanto che gli enzimi presenti nei liquidi digestivi della vittima rappresentano il fattore determinante nella schiusa delle uova microtipiche. Tale conclusione è sostanzialmente in accordo con quanto accertato per i parassiti, sia Protozoi che Metazoi, che in stadi quiescenti vengono introdotti per via orale nei Vertebrati, e generalizza pertanto il meccanismo di attivazione dei parassiti che iniziano i loro cicli nel canale alimentare degli ospiti.

Per quanto riguarda l'aspetto puramente pratico, e cioè quello di ottenere grandi masse di larvette neonate a scopo sperimentale, il mezzo più semplice resta quello di immergere uova uterine, ovvero uova deposte, nei liquidi intestinali di larve di Galleria dell'ultima età.

On the hatching of the microtypical eggs of *Gonia cinerascens* Rond. in experimental conditions.

S U M M A R Y

We have investigated the factors that cause the hatching of the microtypical eggs of *Gonia cinerascens* Rond. The research was carried out on uterine eggs of females, both dead and alive, as well as on eggs laid in captivity. The eggs were dipped in various liquids and underwent, in a series of tests, mechanical stimuli consisting in short and repeated compressions.

First of all we noticed that these pressures, which simulate the mechanical factors operating on the egg at the level of the mouth parts of the host, do to a certain extent encourage the hatching: the process is speeded up in almost all the slides and is made possible, even if only occasionally, in the liquids that are scarcely effective in themselves; later on, however, many more eggs hatch in the effective liquids that don't receive any stimuli. We can therefore conclude that mechanical stimuli are not necessary where we have really valid chemical stimuli.

Under exactly the same experimental conditions the rate of hatching increases greatly when we turn from the eggs that have been laid to the uterine eggs; the larvae broke out from the latter in great quantities in all the liquids, both with an acid and basic reaction, and even in distilled water with a neutral pH. The rate of hatching is particularly high and not seldom complete in eggs that have been extracted from dead females whose internal organs have disgregated completely.

With regard to the eggs that have been laid, the pH of the solutions seemed truly effective only when the values were very high (13), that is, at levels which one does not find in the alimentary canal of the possible victims; moreover these levels are incompatible with the life of the new-born larvae.

Still working on eggs that have been laid, which reflect the situation in nature, we made a comparison between the solutions containing enzymes and those that do not, although the pH of the latter was optimum for the action of the various enzymes. The results showed how remarkably effective pepsin and trypsin are even in very small doses. As a further confirmation of the slight importance of pH in itself it is worth noticing that pepsin was used in pH 2 solutions, while the intestinal fluids of the

host are decidedly basic (pH 8,4), as in most larvae of the Lepidoptera. The great importance of enzymes in causing the eclosion is also demonstrated by comparing the effectiveness of the intestinal liquids (greatly diluted) of the larvae of *Galleria*; some had been boiled and some had not: while in the former the eggs hatched only occasionally, in the latter the rate of hatching was very high. Further experiments have shown that the marked tendency to hatch of uterine eggs from dead females with all the organs disgregating can be ascribed to the action of the enzymatic complexes of the females themselves, which come into contact with the eggs.

The enzymatic solutions not only help towards hatching generally, but also promote a much more rapid action than the others. In nature this is extremely important because it takes food about four hours to go through the whole alimentary canal of *Galleria* of the VIIth stage, so the eggs that hatch late are expelled with the faeces. We found that the more concentrated the enzymes, the quicker the action, and it was in fact quickest in the intestinal fluids of the host that were little diluted. We can therefore conclude that the enzymes in the digestive liquids of the victim are the main factors leading to the hatching of microtypical eggs. This conclusion is in agreement with what has been ascertained for parasites, both Protozoa and Metazoa, which in their quiescent state are introduced orally in the Vertebrates: we can therefore make a general rule of the process of activation of the parasites that begin their cycles in the alimentary canal of the hosts.

As for the more practical aim of getting great quantities of new-born larvae for experimental purposes, the simplest way is to dip uterine eggs, or eggs that have been laid, in the intestinal liquids of the larvae of *Galleria* of the last stage.

BIBLIOGRAFIA CITATA

- BARONIO P., CAMPADELLI G., 1978. - Ciclo biologico di *Gonia cinerascens* Rond. (Dipt. Tachinidae) allevata in ambiente condizionato sull'ospite di sostituzione *Galleria mellonella* L. (Lep. Galleriidae). - *Boll. Ist. Ent. Univ. Bologna*, 34: 35-54.
- BESS H. A., 1936. - The biology of *Leschenaultia exul* Townsend, a tachinid parasite of *Malacosoma americana* Fabricius and *Malacosoma disstria* Hubner. - *Ann. Ent. Soc. Am.*, 29: 593-613.
- BILIOTTI E., DESMIER de CHENON R., 1971. - Le parasitisme de *Pales pavidus* Meig. (Dipt. Tachinidae) sur *Galleria mellonella* L. (Lep. Galleriidae). Mise au point d'un élevage permanent en laboratoire. - *Ann. Zool. Ecol. anim.*, 3: 361-371.
- GRENIER S., DELOBEL B., BONNOT G., 1974. - Développement et croissance pondérale de *Phryxe caudata* Rond. (Diptera, Tachinidae) sur *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera). Influence de l'âge de l'hôte. - *Ann. Zool. Ecol. anim.*, 6: 61-79.
- HERTING B., 1960. - Biologie der Westpaläarktischen Raupenfliegen Dipt., Tachinidae. - *Monogr. angew. Ent.*, 16, 188 pp.
- LACKIE A. M., 1975. - The activation of infective stages of endoparasites of vertebrates. - *Biol. Rev.*, 50: 285-323.
- MELLINI E., 1956. - Studi sui Ditteri Larvevoridi. III. *Sturmia bella* Meig. su *Inachis io* L. (Lepidoptera Nymphalidae). - *Boll. Ist. Ent. Univ. Bologna*, 22: 69-98.
- MORITOSHI N., 1936. - Digestive fluids of phytophagous Insects and the hatching of the eggs of *Sturmia sericariae* Corn. - *Oyo-Dobuts. Zasshi*, 8: 20-27 (in R.A.E., 24: 320).

- RIVIERE J. L., 1975. - Fluctuations de la ponte chez *Pales pavidus* Meig. (Dipt. Tachinidae). - *Bull. Soc. Ent. France*, 80: 181-183.
- SAKHAROV N. L., 1929. - On the parasitism of *Gonia* and *Cnephala* in the larvae of *Euxoa segetum* Schiff. - *Plant Protect.*, 6: 71-74 (in R.A.E., 19: 286-287).
- SASAKI C., 1918. - The development of the silkworm parasitic maggot after its eggs are swallowed by the silkworm. - *Rep. Seric. Exp., Seric. Exp. Stat. Tokyo*, 3: 377-396 (in R.A.E., 7: 12).
- SEVERIN H. H. P., SEVERIN H. C., HARTUNG W., 1915. - The stimuli which cause the eggs of the leaf-ovipositing Tachinidae to hatch. - *Psyche*, 22: 132-137.
- STRICKLAND E. H., 1923. - Biological notes on parasites of prairie cutworms. - *Canada Dep. Agric., Techn. Bull., No. 26*, 40 pp.
- TOWNSEND C. H. T., 1934. - Manual of myology. - São Paulo, vol. 1, 280 pp. (cfr. pp. 37-43).
- WATERHOUSE D. F., 1949. - The hydrogen ion concentration in the alimentary canal of larval and adult Lepidoptera. - *Australian J. Sci. Res.*, 2: 428-437.
- WIGGLESWORTH V. B., 1972. - The principles of insect physiology. - Methuen, London, 741 pp.
- WISHART G., 1945. - *Aplomya caesar* (Aldrich), a tachinid parasite of the European corn borer. - *Can. Entomol.*, 77: 157-167.
- WISHART G., 1956. - Effects of hydrogen ion concentration on hatching of eggs of *Aplomya caesar* (Ald.) (Diptera: Tachinidae). - *Can. Entomol.*, 88: 655-656.
- WYLIE H. G., 1960. - Insect parasites of the winter moth, *Operophtera brumata* (L.) (Lepidoptera: Geometridae) in Western Europe. - *Entomophaga*, 5: 111-129.