

I. CHIARELLO I. SERONE A. SPRINGHETTI

**Effetti del trattamento con un analogo dell'ormone giovanile
sulla fertilità di *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera Tenebrionidae).**

Il trattamento di insetti adulti con ormone giovanile o con suoi analoghi determina generalmente una diminuzione della fertilità; può diminuire il numero delle uova deposte dalle femmine trattate, aumentare la mortalità embrionale o anche aumentare la mortalità larvale.

Precedenti esperimenti ci hanno permesso di osservare questi fenomeni anche in *Tenebrio molitor* trattato per bocca allo stadio adulto con un analogo dell'ormone giovanile: methoprene. La mortalità embrionale e larvale dipende dalla dose somministrata (Springhetti e Franchi, 1981; Springhetti e Fontana, 1982), dosi sufficientemente elevate possono determinare la morte di tutti gli embrioni che si sviluppano nelle uova deposte, ma nei trattamenti con dosi basse possono nascere percentuali più o meno alte di larve, stranamente, quando il methoprene è stato somministrato (per bocca) per periodi abbastanza lunghi, si è osservata una progressiva diminuzione della mortalità embrionale (Springhetti e Franchi, 1981) anziché un aumento.

Con i presenti esperimenti si cerca di confermare il fenomeno osservato, per mezzo di dati più numerosi.

MATERIALE E METODO

La ricerca è stata fatta su *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera Tenebrionidae), allevato da molti anni all'Istituto di Zoologia dell'Università di Ferrara.

Coppie di adulti, sfarfallati da non più di 24 h e non ancora del tutto pigmentati, sono state isolate in scatole di plastica di circa 30 cm², con il fondo coperto da uno strato di circa 0,5 cm di segatura fine, nella quale gli insetti hanno deposto le uova.

Alle coppie è stato somministrato un analogo dell'ormone giovanile, il methoprene (isopropil-3, 7, 11-trimetildodeco-2, 4-dienoato), Altosid

(*) Ricerca eseguita con il contributo C.N.R. n. 81.00826.06.

(ZR 515), prodotto dalla Zoecon Corporation di Palo Alto, U.S.A. ⁽¹⁾ Il prodotto è stato sciolto in alcool etilico assoluto e distribuito su cialde di farina di frumento spesse circa 1 mm. L'alcool fu fatto evaporare lentamente a 10°C perché il methoprene penetrasse più uniformemente nella cialda. Le cialde sono poi state tagliate in pezzi di circa 2 cm² che sono stati offerti in cibo uno alla volta agli insetti come unico alimento; questi hanno perciò assunto la maggior parte del methoprene per bocca ed è stata trascurabile la quantità assorbita per contatto. Ogni 4 giorni, alle coppie è stata data anche acqua potabile su un tampone di carta da filtro.

Nel trattamento sono state usate due diverse dosi di methoprene, che nelle precedenti esperienze avevano provocato mortalità embrionale solo in una parte delle uova deposte: 0,4/1000 e 0,8/1000, intendendo per dose il rapporto tra il peso del methoprene e quello della cialda, a condizioni ambiente. Alle coppie di controllo è stata data cialda trattata con alcool etilico puro.

Ogni 4 giorni le coppie di *T. molitor* sono state trasferite in altra scatola con segatura fresca, le uova deposte sono state separate dalla segatura e cosparse di farina di frumento.

In tal modo sono stati raccolti 7 distinti gruppi di uova deposte da ciascuna coppia nei 28 giorni seguenti la metamorfosi.

Le scatole con le coppie dei riproduttori e quelle con le uova sono state tenute in ambiente buio, saturo di umidità, a 27°-28°C. In ogni scatola sono state contate le larve nate e le uova secche distinguendo tra quelle rimaste bianche e quelle diventate nerastre.

RISULTATI

Fecondità. La fecondità media è riassunta in Tab. 1. In media, le coppie di controllo hanno deposto un maggior numero di uova che le coppie trattate con methoprene, sia con dose 0,4/1000, che con dose 0,8/1000; la fecondità dei due gruppi trattati, invece, è stata molto simile.

L'andamento nel tempo delle ovideposizioni è rappresentato in fig. 1. Soltanto due coppie (circa 2%) hanno deposto uova prima del 4° giorno, una delle coppie trattate con dose 0,4/1000 (3 uova), e una trattata con dose 0,8/1000 (8 uova). Il trattamento con methoprene non ha quindi determinato un anticipo delle ovideposizioni.

Le tre curve di fig. 1 hanno un andamento molto simile e le differenze nel numero medio di uova deposte in ogni periodo dai tre gruppi di

(1) Ringraziamo la Zoecon Corp. che ci ha gentilmente fornito l'Altosid.

femmine non raggiungono mai significatività statistica, ma rispecchiano solo la diversa fecondità dei gruppi; il trattamento non ha quindi modificato l'andamento delle ovodeposizioni nel tempo.

Tutti i tre gruppi di coppie hanno deposto uova con massima frequenza tra il 9° ed il 12° giorno; in seguito il numero delle uova è progressivamente diminuito, fino a toccare valori minimi tra il 25° ed il 28° giorno.

Tab. 1 - Numero medio di uova deposte dalle coppie di controllo e trattate con methoprene (dosi 0,4/1000 e 0,8/10000) divise nelle tre categorie considerate.

	n° coppie	n° uova secche bianche	n° uova secche nere	n° uova schiusse	n° totale uova
controlli	33	1,0 ± 0,7	3,9 ± 3,9	108,1 ± 5,6	113,0 ± 4,2
dose 0,4	34	20,9 ± 5,7	24,9 ± 5,8	48,7 ± 6,5	94,4 ± 4,7
dose 0,8	38	20,2 ± 5,3	44,6 ± 6,3	29,7 ± 4,2	94,5 ± 4,3

Uova secche bianche. Masner et al. (1968), Springhetti e Franchi (1981) hanno considerato le uova che sono diventate secche restando bianche come uova non fecondate e le hanno escluse dai loro conteggi; nelle presenti esperienze esse sono state invece contate.

Uova bianche secche sono state deposte da 6 femmine di controllo (= 18%) e da 25 (= 74%) e 28 (= 72%) femmine trattate rispettivamente con la dose 0,4/1000 e la dose 0,8/1000; la frequenza delle femmine di controllo che hanno deposto questo tipo di uova è statisticamente inferiore a quelle di entrambi i gruppi di femmine trattate, che tra loro invece, non differiscono.

Complessivamente, le uova bianche secche rappresentano l'1% delle uova deposte dalle femmine di controllo e sono meno frequenti che tra le uova deposte sia dalle femmine trattate con dose 0,4/1000 (22%) sia dalle femmine trattate con dose 0,8/1000 (21%); in questi due gruppi, invece, le loro frequenze non differiscono.

In fig. 2 è rappresentata la distribuzione delle uova secche bianche nei gruppi di uova deposte nei periodi successivi.

Nei controlli, la frequenza percentuale è stata sempre bassa e abbastanza uniforme. Nei gruppi di uova deposte dalle femmine trattate con methoprene, la frequenza delle uova secche bianche è stata notevolmente alta già nei primi gruppi ed è in seguito progressivamente aumentata fino a costituire il 35% ed il 39% rispettivamente tra il 25° ed il 28° giorno dal trattamento.

Il trattamento delle coppie con methoprene ha quindi determinato un aumento percentuale di questo tipo di uova, correlato con la durata del trattamento stesso.

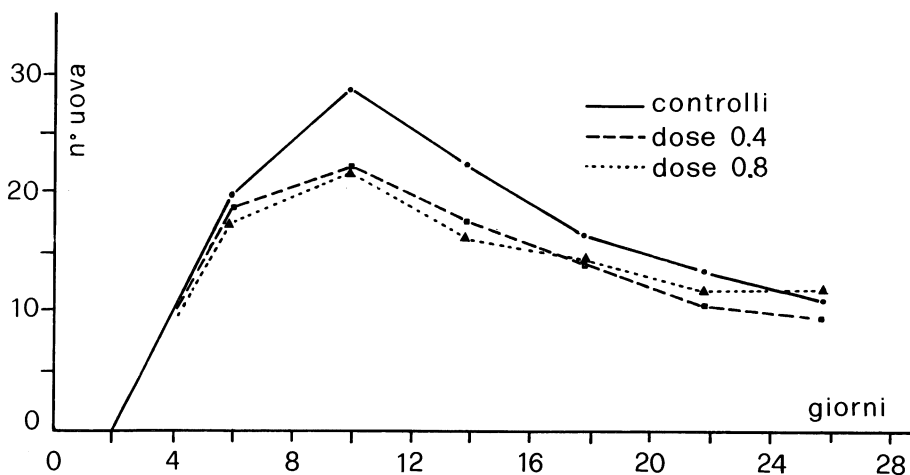


Fig. 1 — Numero medio di uova deposte nei successivi intervalli di tempo.

Uova secche nere. Sono considerate dai diversi Autori uova in cui è iniziato lo sviluppo embrionale, ma l'embrione è morto ad uno stadio più o meno avanzato.

Uova divenute secche e nere sono state deposte da 2 femmine di controllo (= 6%): da una, in piccola percentuale (1,7%), dall'altra in alta percentuale (95,5%). La morte degli embrioni può quindi essere dovuta a cause diverse; a traumi accidentali, nel primo caso, a cause specifiche, nel secondo.

23 femmine trattate con dose 0,4/1000 di methoprene (= 68%) hanno deposto uova diventate secche e nere, con percentuali che variano dal 2% all'84%. Anche 34 femmine trattate con 0,8/1000 (= 87%) hanno deposto uova secche e nere con variazioni dal 2% al 98%. Nei due gruppi di coppie trattate le frequenze delle femmine che hanno deposto uova secche e nere differiscono statisticamente ed entrambe differiscono statisticamente dalla frequenza riscontrata nei controlli.

Nel totale, solo il 3,5% delle uova deposte dai controlli sono diventate secche e nere, mentre sono diventate tali il 26,4% di quelle deposte dalle femmine trattate con dose 0,4/1000 ed il 47,3% di quelle de-

poste dalle femmine trattate con dose 0,8/1000: la dose maggiore ha quindi avuto effetti più marcati sulla mortalità degli embrioni.

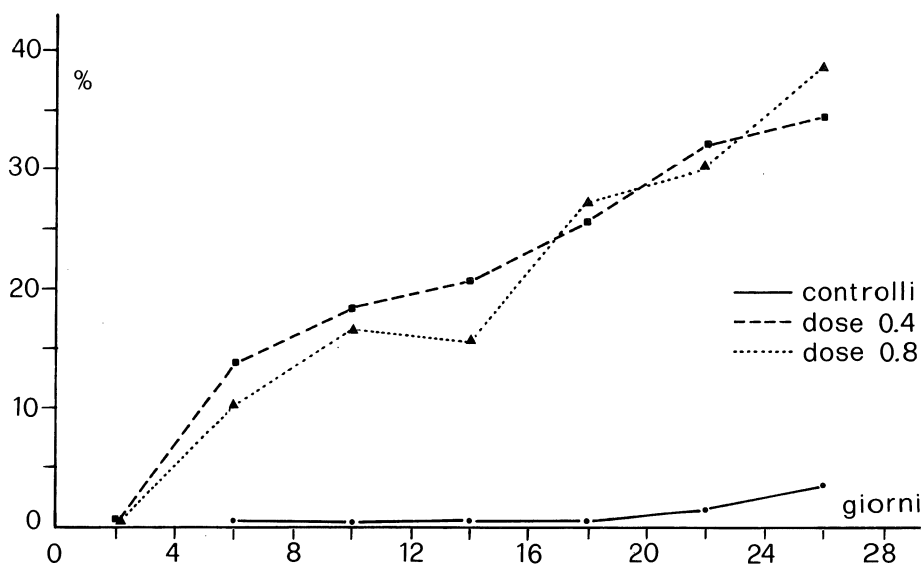


Fig. 2 — Frequenza delle uova secche bianche nei gruppi di uova deposte nei successivi intervalli di tempo.

In fig. 3 è indicata la frequenza delle uova secche e nere in relazione al periodo dell'ovideposizione. Si può rilevare che nelle ovature di controllo la frequenza non varia sensibilmente. Nelle uova deposte dalle coppie trattate sia con dose 0,4/1000 che con dose 0,8/1000, la frequenza delle uova nere è invece minore negli ultimi gruppi deposti che nei primi.

Pur trascurando la mortalità embrionale (pari al 100%) riscontrata nelle sole 11 uova deposte nei 4 giorni seguenti la metamorfosi, risulta evidente che l'azione letale del methoprene sugli embrioni diminuisce nel tempo: questo diventa molto evidente dopo il 12° giorno, in un gruppo (dose 0,4/1000), e dopo il 16° giorno nell'altro (dose 0,8/1000); la diminuzione è rapida e negli ultimi gruppi di uova deposte, le frequenze delle uova nere nei due gruppi sono molto vicine e non differiscono più staticamente.

Uova schiuse. Nei tre gruppi studiati, un diverso numero di femmine ha deposto uova capaci di schiudere. Tutte le femmine di controllo hanno

deposto almeno qualche uovo da cui è nata la larva; invece, 7 femmine trattate con dose 0,4/1000 (= 20%) e 7 trattate con dose 0,8/1000 (= 18%) hanno deposto uova che sono tutte seccate senza schiudere. Nei 2 gruppi trattati, la frequenza di queste femmine non differisce, ma entrambe sono significativamente superiori a quella trovata nei controlli.

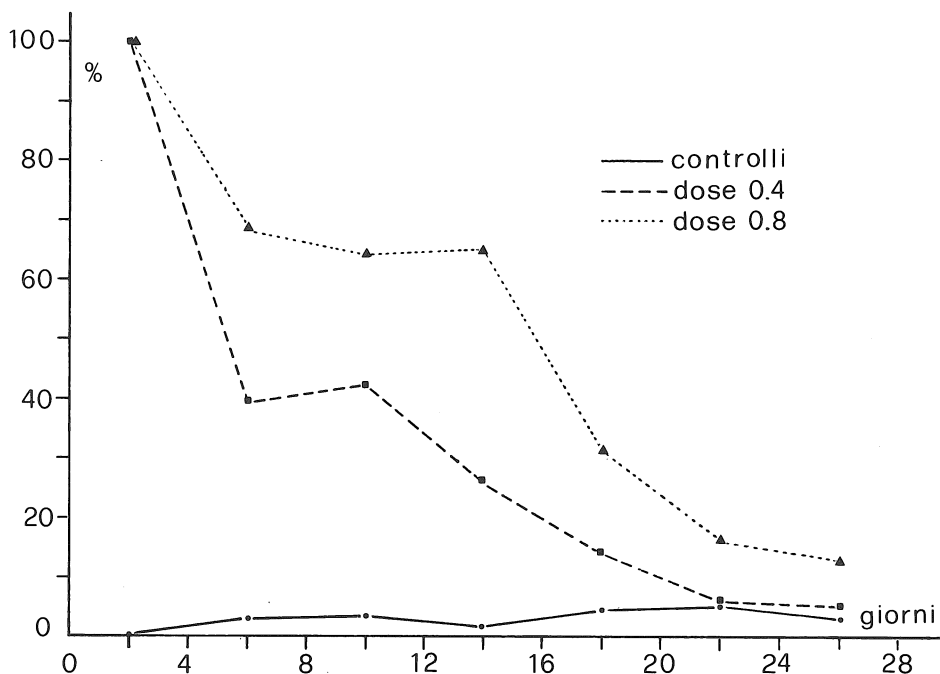


Fig. 3 — Frequenza delle uova secche nere nei gruppi di uova deposte nei successivi intervalli di tempo.

Anche il numero delle femmine che hanno deposto solo uova capaci di schiudere è diverso nei tre gruppi: le uova di 26 coppie di controllo (79%) sono schiuse tutte, ma solo due femmine (= 6%) trattate con dose 0,4/1000 e nessuna femmina trattata con dose 0,8/1000 hanno deposto uova che sono tutte schiuse.

La percentuale delle uova schiuse sul totale delle uova deposte raggiunge il 96% nei controlli, ma rappresenta solo il 52% delle uova deposte dalle coppie trattate con dose 0,4/1000 ed il 31% di quelle deposte dalle coppie trattate con dose 0,8/1000. La riduzione della fertilità appa-

re quindi conseguenza del trattamento ed in rapporto con la dose somministrata.

In fig. 4 è rappresentata la frequenza delle larve nate in relazione all'epoca delle ovodeposizioni. Si può rilevare che nelle uova deposte dai controlli la frequenza delle nascite non varia sensibilmente ed è sempre superiore al 90%. Nelle uova deposte dalle coppie trattate con methoprene, invece, appare molto evidente che la frequenza delle larve nate dalle uova deposte dopo il 16° giorno è superiore a quella delle larve nate dalle uova deposte nei periodi precedenti: ciò è meno appariscente per le uova delle coppie trattate con dose 0,4/1000 e più marcato per le uova delle coppie trattate con dose 0,8/1000.

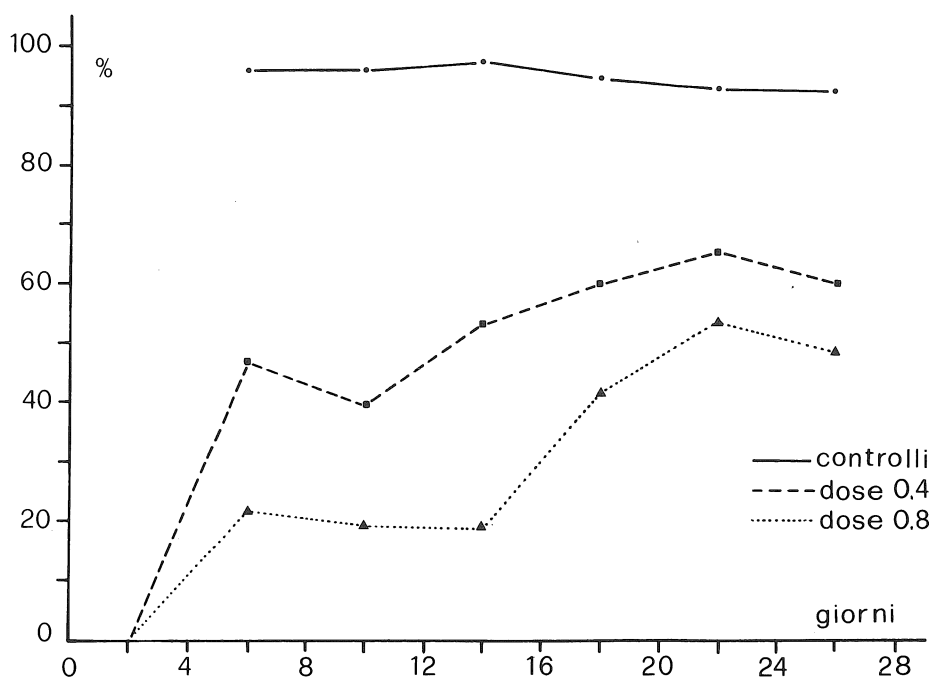


Fig. 4 — Frequenza delle uova schiuse nei gruppi di uova deposte nei successivi intervalli di tempo.

L'effetto negativo del trattamento con methoprene sulla fertilità del *Tenebrio molitor* sembra quindi diminuire nel tempo, malgrado la somministrazione della sostanza non sia mai stata interrotta.

CONCLUSIONI

Piccole dosi di methoprene sono state somministrate — per bocca ed in modo continuativo — ad adulti di *Tenebrio molitor* nei 28 giorni seguenti la muta. Il trattamento ha determinato la riduzione nel numero medio di uova deposte e la comparsa di un elevato numero di uova che non sono schiuse; ciò conferma precedenti risultati.

I tre indici qui considerati per valutare l'effetto del trattamento (frequenza delle uova secche bianche, delle uova secche nere e delle uova schiuse) dipendono dalla dose usata e variano in rapporto al periodo trascorso dall'inizio del trattamento: aumenta la frequenza sia delle uova secche bianche, sia delle uova schiuse e diminuisce quella delle uova secche nere.

Secondo Masner et al. (1968) le uova secche bianche sono uova non fecondate e perciò incapaci di sviluppo; se è così, per spiegare l'aumento della loro frequenza quando viene prolungato il trattamento delle coppie, si possono formulare varie ipotesi: che il maschio trattato fornisca alla femmina un numero insufficiente di spermatozoi; che gli spermatozoi forniti siano inadatti a fecondare le uova; che gli spermatozoi perdano la capacità di fecondare le uova dopo che sono stati trasferiti nelle vie genitali femminili.

La minore funzionalità del maschio trattato e/o dei suoi gameti sembra possibile, visto che le ghiandole accessorie sono sede d'accumulo dell'ormone giovanile (Dahm et al., 1976) e che il trattamento con analoghi dell'ormone giovanile può indurre pseudosterilità nei maschi di talune specie (Shinyaeva et al., 1983); sembra invece improbabile che gli ovociti diventino meno atti ad essere fecondati perché aumenta la frequenza degli zigoti che portano a termine lo sviluppo embrionale. Nessuna ipotesi poggia, però, su prove dirette.

La diminuzione delle uova secche nere nei gruppi deposti in tempi successivi ed il contemporaneo aumento del numero di uova schiuse ci sembra fenomeno indipendente dal precedente e determinato da fattori differenti.

Secche e nere diventano le uova in cui l'embrione muore durante lo sviluppo; la loro frequenza dipende dalla dose somministrata (Masner et al., 1968; Springhetti e Franchi, 1981) e dallo stadio di sviluppo degli ovociti al momento della somministrazione (Masner et al., 1968; Patterson, 1971, 1974). La morte degli embrioni avviene più frequentemente alla formazione della linea germinale e alla blastocinesi (Riddiford, 1972). Benché in *Pyrrhocoris* un solo trattamento topico possa determinare sterilità completa e irreversibile della femmina (Masner et al., 1968), in altre specie l'effetto del trattamento diminuisce invece rapidamente (Van Sambeek e Bridges, 1980, in *Dendroctonus*; Springhetti e Franchi, 1984,

in *Tenebrio*) probabilmente a causa di più attivi meccanismi di inattivazione e/o eliminazione della sostanza (Staal, 1972; Sparks e Hammock, 1980).

Il trattamento continuo per bocca dovrebbe però o aver determinato un accumulo di JH-analogo nell'organismo dell'insetto, o averlo almeno mantenuto a livello costante; la diminuzione della mortalità embrionale e l'aumento delle nascite di larve fa pensare invece ad una diminuzione della sostanza nella femmina; questo può avvenire sia perché diminuisce l'attività dei 'corpora allata' della femmina trattata, per effetto di 'feed-back', sia perché viene meno il JH-analogo trasferito dal maschio alla femmina durante l'accoppiamento (Shirk et al., 1980); non si può però escludere una qualche forma di assuefazione della femmina alla sostanza somministrata.

RIASSUNTO

A coppie di *Tenebrio molitor* adulti è stato somministrato methoprene per bocca nei 28 giorni seguenti la metamorfosi, e sono state raccolte le uova deposte in tale periodo.

Le coppie trattate hanno deposto in media meno uova dei controlli.

Le uova sono state distinte in tre categorie: uova secche bianche, che non erano state fecondate; uova secche nere, nelle quali l'embrione è morto a uno stadio di sviluppo più o meno avanzato; uova schiuse, dalle quali la larva è sgusciata.

Tutte tre le categorie di uova dipendono dalla dose somministrata: con la dose aumenta sia il numero delle uova secche bianche, sia il numero delle uova secche nere, mentre diminuisce il numero di quelle schiuse.

Anche la durata del trattamento influenza il rapporto percentuale tra le tre categorie di uova: nella seconda metà del periodo di trattamento aumentano infatti le uova secche bianche e quelle schiuse, mentre diminuiscono quelle secche nere.

Alcune ipotesi vengono avanzate nel tentativo di spiegare questo fenomeno.

SUMMARY

Fertility of Tenebrio molitor L. (Coleoptera Tenebrionidae) treated with a juvenile hormone analogue

Adult pairs of *Tenebrio molitor* were orally given methoprene during the 28 days following their metamorphosis, and the eggs laid during this period were collected.

On average, the treated pairs laid fewer eggs than the controls.

The eggs were divided into three classes: dry white, non fertilized eggs; dry black eggs in which the embryos died when at different stages of its development; hatched eggs (which the larva left).

All three classes of eggs varied according to the given dose: the higher was the dose, the higher was the number of dry white eggs and of dry black eggs, whereas the number of hatched eggs decreased.

The length of the treatment too influenced the per cent proportion between all three the classes: during the second half of the treatment the number of white dry eggs and of the hatched eggs increased, whereas the dry black eggs decreased.

Some hypothesis were made, with the purpose to explain these facts.

BIBLIOGRAFIA

- Dahm K.H., Bhaskaran G., Peter M.G., Shirk P.D., Seshan K.R., Röller H., — On the identity of the juvenile hormone in insects (in Gilbert L.I. (Ed.), The juvenile hormones) — Plenum Press, NY: 19-47.
- Masner P., Slama K., Landa V., 1968 — Natural and synthetic materials with insect hormone activity. IV. Specific female sterility effects produced by a juvenile hormone analogue. — J. Embryol. exp. Morph., 20: 25-31.
- Patterson J.W., 1971 — Critical sensitivity of the ovary of 'Aedes aegypti' adults to sterilization by juvenile hormone mimics. — Nature New Biol., 233: 176-177.
- Patterson J.W., 1974 — A comparison of the morphogenetic and sterilizing activities of juvenile hormone mimics on 'Aedes aegypti'. — J. Insect Physiol., 20: 2095-2106.
- Riddiford L.M., 1972 — Juvenile hormone and insect embryonic development: its potential role as an ovicide (in Menn J.J., Beroza M. (Ed.), Insect juvenile hormones). — Acad. Press, NY: 95-111.
- Shinyayeva L.I., Reutskaja O.E., Burov V.N., 1983 — Physiological mechanisms of pseudo-sterilization of insects by juvenoids. — Ent. Obozr. 63: 236-244.
- Shirk P.D., Bhaskaran G., Röller H., 1980 — The transfer of juvenile hormone from male to female during mating in the 'Cecropia' silkmoth. — Experientia, 36: 682-683.
- Sparks T.C., Hammock B.D., 1980 — Comparative inhibition of the juvenile hormone esterases from 'Trichoplusia ni', 'Tenebrio molitor' and 'Muscra domestica' — Pestic. Biochem. Physiol., 14: 290-302.
- Springhetti A., Fontana F., 1982 — Delayed effects of a juvenile hormone analogue orally administered to 'Tenebrio molitor' L. adults (Coleoptera, Tenebrionidae). — Redia, 65: 285-291.
- Springhetti A., Franchi S., 1981 — Fecundity and fertility of 'Tenebrio molitor' (Coleoptera: Tenebrionidae) treated with an analogue of the juvenile hormone (Altosid) by mouth. — Annali Univ. Ferrara, (N.S.), 2: 145-156.

- Springhetti A., Franchi S., 1984 — Temporary effect on fertility of a JH-analogue given orally to 'Tenebrio molitor' L. (Coleoptera: Tenebrionidae). *Annals Entomol.* 2: 39-42.
- Staal G.B., 1972 — Biological activity and bioassay of juvenile hormone analogs (in Menn J.J., Beroza M., *Insect Juvenile Hormones*). — Acad. Press, NY: 69-94.
- Van Sambeek J.W., Bridges J.R., 1981 — Influence of the juvenile hormone analogue methoprene on reproduction of the southern pine beetle 'Dendroctonus frontalis' Zimm. — *J. Georgia entomol. Soc.*, 16: 83-90.

Dr Iris Chiarello, Dr Incoronata Serone, Prof. Antonio Springhetti — Istituto di Zoologia dell'Università, Via L. Borsari 46, I — 44100 Ferrara.

Ricevuto il 2 luglio 1984; pubblicato il 15 dicembre 1984.

