

PROF. G. M. GHIDINI

Libero docente di Zoologia presso l'Università di Genova

## L'impiego di "attogrammi", nel saggio biologico degli insetticidi

Nel campo degli studi sugli insetticidi si sono fatti, durante gli anni della guerra ed in quelli che l'hanno succeduta, enormi progressi.

È stata invero una fioritura di prodotti altamente tossici la cui enumerazione è davvero superflua tanto essi sono largamente conosciuti sia attraverso la letteratura scientifica e divulgativa sia per la propaganda attivissima che le varie case produttrici ne vanno facendo.

È da notare però che lo studio comparativo della loro efficacia e del loro modo d'azione non è sempre facile perchè mancano metodi di indagine "standard", ai quali sia possibile accedere con facilità per un saggio biologico dell'attività dei diversi prodotti sia allo stato puro sia nelle condizioni di preparazione commerciale.

La necessità di un metodo di largo impiego e di facile applicazione è perciò vivamente sentita tanto per l'indagine puramente scientifica quanto per l'accertamento a scopo commerciale del potere tossico di vari prodotti presenti sul mercato e sui quali è necessario far cadere la scelta; un metodo cioè che, indipendentemente dalle minute osservazioni dei singoli sperimentatori, difficilmente documentabili, possa fornire dati permanenti e controllabili anche a distanza di tempo.

Non sono mancati naturalmente tentativi in questo senso, ma non è azzardato dire che ogni laboratorio usa metodi propri per cui i diversi risultati possono raramente essere comparati. Si aggiunga che anche i metodi migliori sono passibili di critiche e che il più delle volte l'indagine di laboratorio non è condotta su singoli insetti, ma per gruppi di 50-100 individui di cui ci si limita spesso a comunicare le percentuali di mortalità entro termini di tempo crescenti.

Stendendo un piano di ricerche comparative sull'attività preletale di alcuni contatticidi sintetici il Prof. GUIDO GRANDI mi ha interessato a realizzare un mezzo che permettesse un facile e controllabile confronto fra i risultati ottenibili nelle diverse prove biologiche, un metodo cioè dal quale si potessero avere dati esprimibili individualmente

per teste considerato. L'attometro descritto in questa nota rappresenta una prima parziale soluzione del problema, dalla quale già si sono ottenuti dati di notevole interesse.

Prima di riferirne con qualche dettaglio sarà bene accennare ai principali fra i metodi fino ad oggi escogitati allo scopo.

#### METODO DI SANKOWSKI E JERNAKOFF.

È usato per la determinazione della percentuale di mortalità specialmente dei due testi *Musca domestica* L. e *Calliphora vomitoria*.

I due ditteri sono allevati secondo il metodo di PEET e GRADY e ci si deve mettere nelle condizioni di poter separare le immagini coetanee. Di esse vengono usati i soli maschi, prelevando quelli che hanno cinque giorni di età.

Per manipolarli facilmente essi vengono tenuti per 10-15 minuti in ghiacciaia e successivamente posti su una lastra di marmo raffreddata che li mantiene in acinesi per il tempo desiderato.

Con l'uso di una micropipetta graduata, si lascia cadere sul mesonoto di ogni individuo un quantitativo fisso di una soluzione nota di contatticida. Evaporato il solvente gli esemplari ugualmente trattati vengono tenuti, entro gabbiette, alla temperatura di 28° C.. Dopo 24 ore si contano le mosche morte. La curva di mortalità viene redatta esprimendo in ascisse la dose in milligrammi di contatticida per kg di insetti e in ordinate il numero di mosche morte per ogni gruppo.

#### METODO DI HOSKINS E CALDWELL (1).

Consiste nel nebulizzare mediante uno spruzzatore di tipo DE VILLBIS un quantitativo noto di una determinata soluzione di contatticida in una camera tubulare, leggermente inclinata sul piano orizzontale. In prossimità della parte più bassa di detta camera un largo foro permette alla nebbia formata di uscire a pressione normale e di attraversare una gabbietta metallica nella quale sono contenuti gli insetti che servono da teste (mosche, zanzare, ecc.). Dopo una permanenza di durata fissa la scatola viene levata e gli insetti travasati in altra gabbia pulita per tenerli in osservazione 12, 24, 48 ore onde prendere nota delle percentuali di mortalità.

---

(1) Cito questo metodo fra quelli più di recente proposti, ma altri ne esistono basati sullo stesso principio e con variazioni di dettaglio più o meno notevoli (Peet-Grady, Potter-Hocking, Webb, ecc.).

METODO DI MYLIUS E KOECHLIN.

Anche in questo metodo ci si serve come teste d'esperimento di mosche ed in particolare della *Calliphora vomitoria*. Si scioglie l'insetticida in esame in acetone preparando una gamma di soluzioni dall'1 al 10 per mille. Un cc di ognuna di queste soluzioni viene distribuito sul fondo di capsule di Petri. Dopo circa 1 ora, quando si è certi che tutto l'acetone è evaporato, vi si introducono cinque insetti tutti della stessa età e si tengono alla temperatura di 22° C., registrando poi i tempi entro i quali gli insetti stessi entrano in supinazione e successivamente muiono. La media di quattro prove viene assunta come dato definitivo.

Per permettere la discriminazione fra l'azione di contatto e quella respiratoria, ove coesistano per lo stesso prodotto, viene deposta una sottile rete metallica sul fondo trattato in modo da rendere impossibile il contatto.

Questo metodo può essere naturalmente modificato in varie maniere e ad esso si potrebbe dare il nome più generico e comprensivo di metodo delle piastre o lamine trattate. Esso consiste dunque nelle sue linee essenziali nel trattare superfici con caratteristiche fisiche e chimiche note con soluzioni "standard,, di insetticida, obbligando poi gli insetti a restarvi in contatto o lasciandoli liberi di appoggiarsi o meno sulla superficie trattata.

Quando l'indagine deve essere condotta su polveri, o si procede alla estrazione dei principi attivi con esse mescolati, oppure si è obbligati a distribuirne quantitativi ponderali noti sul fondo di capsule di Petri di area conosciuta ed obbligarvi al contatto gli insetti in prova (1).

Ciò non è sempre facile, ma può essere ovviato, come lo scrivente usa nel suo laboratorio, in due modi: o sovrapponendo, dopo l'introduzione degli insetti, un sottile disco forellato di celluloidi di calibro leggermente minore del diametro interno della capsula tenendolo distanziato dal fondo, quel tanto che la mole dell'insetto lo consente, mediante tre spilli entomologici infilati in esso lungo la circonferenza quasi al vertice di un immaginario triangolo equilatero iscritto; oppure sovrapponendo agli insetti un vetro da orologio, più o meno convesso secondo la mole dell'insetto; l'angolo acuto, che i suoi margini formano così con la superficie trattata, impedisce agli insetti in prova di arrampicarsi su di esso.

---

(1) È evidente che se la ricerca ha scopo comparativo tali quantitativi devono essere estremamente bassi onde poter discriminare eventuali differenze in tossicità.

#### ALTRI METODI.

Altro sistema di recente proposto è quello di introdurre, entro recipienti di volume noto, un quantitativo fisso di sostanza polverulenta da esaminare, assieme con gli insetti di saggio e di far poi ruotare ogni recipiente per un numero fisso di volte, in modo che le polveri vengano a distribuirsi uniformemente sulle pareti e sull'insetto. È chiaro che anche questo sistema è soggetto a critiche gravi, soprattutto per il diverso tasso di adesività delle singole polveri, al loro diverso peso specifico e alla mole delle loro particelle.

In tutti questi metodi d'altronde la registrazione degli effetti indotti dalle varie sostanze sugli insetti in esame è affidata allo sperimentatore, il quale è obbligato ad una estenuante e continua osservazione o ad un saltuario controllo.

#### ATTOMETRO GHIDINI (1).

Per tali ragioni e per le ovvie conseguenze che se ne possono trarre ho pensato in questi ultimi tempi ad applicare al campo entomologico il principio di un noto apparecchio di fisiologia generale dopo avervi apportate le necessarie modifiche.

Ho realizzato così un semplice strumento il cui complesso è chiaramente indicato dalla fig. I. La parte essenziale di esso è data da un leggerissimo tamburo rotante il cui asse in acciaio pesca da un lato entro un bagno di mercurio; dall'altro lato, un po' prima dell'estremo, esso porta saldato un disco metallico di 1/10 di spessore, dal quale sporgono radialmente quattro (o otto) contatti in acciaio inossidabile; una piccola bacinella di vetro è posta al disotto di tale disco e, mediante il perno di sostegno a vite, può essere abbassata o sollevata al livello voluto; essa contiene alcune gocce di mercurio in cui i contatti vengono successivamente a pescare durante la rotazione del tamburo. Poichè i due bagni di mercurio sono in rapporto con un circuito di corrente continua (cctenuta con un comune raddrizzatore) in cui è inserita una elettrocalamita, è evidente che ogni qual volta i contatti del disco entrano nel mercurio della bacinella l'elettrocalamita entra in funzione e può a sua volta far funzionare una penna scrivente amplificatrice.

---

(1) Mantengo, per indicare l'apparecchio, la dizione « Attometro Ghidini » che la Redazione di « Scienza e Lavoro » (Brescia 1948, 4) ha voluto gentilmente, ma a mia insaputa, attribuirgli.

Dopo aver scelto opportunamente la specie o le specie di insetti che più si prestano per i saggi biologici richiesti, è sempre possibile con opportuni stratagemmi fissarne gli individui in prova ad un sostegno in modo che essi siano largamente liberi nei loro movimenti locomotori pur essendo obbligati a camminare sulla superficie del tamburo che ruoterà in un senso o nell'altro a seconda che la marcia dell'insetto in esame è di progressione o di retrocessione; ad ogni quarto od ottavo di giro si stabilirà così un contatto che verrà registrato dalla penna su un comune chimografo a velocità di rotazione regolabile (risponde soddisfacentemente un chimografo che faccia un giro all'ora o un giro ogni dodici ore e il cui tamburo abbia un raggio di circa 10 cm).

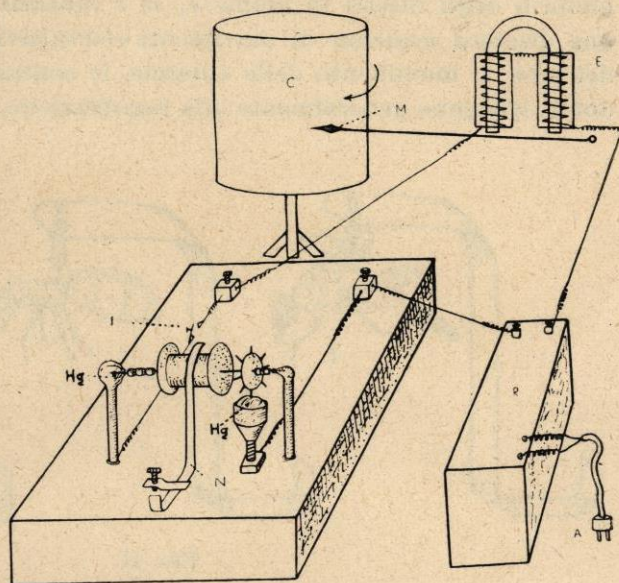


FIG. I.

Attometro Ghidini. Figura schematica d'insieme. — *A*, presa di corrente alternata; *C*, chimografo; *E*, elettrocalamita; *Hg*, bagni di mercurio; *I*, interruttore; *M*, penna scrivente; *N*, sostegno porta insetti; *R*, raddrizzatore di corrente.

L'apparecchio non è dunque che un semplice attometro che ci consente di seguire su di un insetto normale le fasi cinetiche che gli sono proprie in quelle determinate condizioni, per un tempo lungo a piacere.

Indipendentemente dall'uso che ne può essere fatto per gli studi generali di fisiologia comparata, è evidente che esso può trovare largo impiego anche nel campo pratico per saggi biologici di insetticidi diversi.

Infatti sulla superficie esterna del cilindro può essere applicata una fascetta di carta bibula di tipo "standard,, la quale, con la tecnica in uso, può venire imbevuta in precedenza con una soluzione di un qualunque contatticida della quale sia noto il tasso di principio attivo.

Una volta evaporato il solvente, sulla carta rimarrà uniformemente distribuito il soluto, siechè, conoscendo il tipo della carta usata ed una volta determinata la percentuale di assorbimento di solvente per super-

ficie unitaria, sarà anche possibile conoscere la concentrazione per cm<sup>2</sup> di principio attivo con cui gli insetti in esame si mettono a contatto.

Con l'impiego dell'apparecchio testè descritto si ottengono attogrammi i quali fissano, come è stato detto, le fasi di movimento locomotorio degli insetti in esame e, se i contatti sono numerosi, anche una discreta sequenza di movimenti convulsivi preagonici. Il tremito dei tarsi, il movimento delle antenne, le contrazioni spastiche dell'addome, sfuggono generalmente alla registrazione, ma se si considera che,

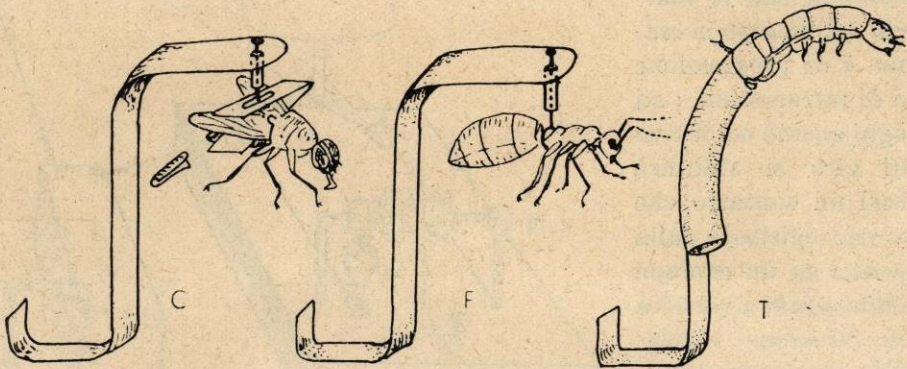


FIG. II.

Modalità di fissaggio al supporto di vari testi: C, *Calliphora vomitoria* L.; F, *Formica rufa pratensis* Retz.; T, *Tenebrio molitor* L.

per giudicare della efficacia di un insetticida su una certa specie, può essere assunto con vantaggio il momento in cui insorgono disfunzioni locomotorie e tremiti preagonici, appare chiaro che gli attogrammi che si possono ottenere nel modo indicato rappresentano di per sè una buona documentazione del decorrere delle intossicazioni.

Passando dal generale al particolare ecco alcuni chiarimenti di dettaglio riguardanti i testi da me più frequentemente usati ed il loro modo di fissaggio.

*Tenebrio molitor* L. — Ho finora usato le sole larve; esse vengono fissate al supporto introducendole in un tubicino metallico in modo che tutta la parte anteriore sporga libera; due intaccature laterali di questo tubicino permettono di cingere la larva con un sottile filo metallico senza comprimerla eccessivamente, ma impedendole di uscire o di entrare di più nel supporto; la legatura al quarto urite si è dimostrata la più adatta (fig. II, T). Questo metodo di fissaggio è stato suggerito dall'osservazione che larve di *Tenebrio* messe in un recipiente senza alcun materiale friabile, ma con segmenti di tubicini di vetro di calibro vario, penetrano in quest'ultimi e vi permangono a

lungo in quanto in quelle condizioni è soddisfatta, nell'unico modo possibile, la tigmotassia della specie. Poichè le larve, introdotte solo parzialmente nel supporto, fanno il possibile per entrarvi completamente o per uscirvi, così il rullo vien fatto girare a lungo o in un senso o nell'altro.

Questo teste è molto resistente all'azione dei contatticidi oggi in uso sicchè è bene che il chimografo giri molto lentamente se non se ne vuole seguire troppo impegnativamente il suo funzionamento.

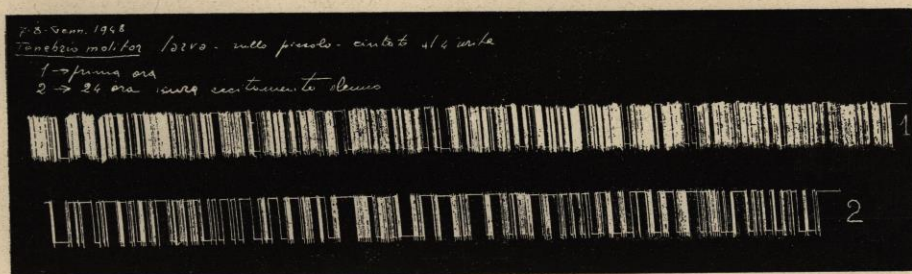


FIG. III.

Attogramma normale di larva di *Tenebrio molitor* L. cintata al 4 urite, nella 1<sup>a</sup> e nella 24<sup>a</sup> ora di attività (il 2 non ha avuto alcuna eccitazione iniziale).

Differenze abbastanza notevoli si hanno in larve di età diverse per cui bisogna, quando si sperimenta, usare larve che abbiano la stessa età prelevandole da materiale opportunamente selezionato.

*Formica rufa pratensis* Retz. — È un ottimo teste da laboratorio. A differenza della specie precedente è estremamente sensibile all'azione dei contatticidi. La specie può essere tenuta in allevamento con facilità creando condizioni ambientali favorevoli e non lasciando mai mancare acqua di cui questi insetti sono bevitori insaziabili; può venir alimentata con sciroppi, carne, frutta, ecc.

Il materiale si presta male ad una scelta di esemplari coetanei, ma se si tiene conto della lunga durata di vita di questi insetti è facile comprendere che la necessità di discriminazione è meno utile.

Per il fissaggio degli individui al supporto si è sfruttata la loro particolare conformazione corporea; essi vengono infatti imbrigliati, nel restringimento peziolare fra il torace e il gastro, da un anellino di filo di rame; questo è saldato ad un'asticciola che può ruotare in un tubicino portato dall'estremità del sostegno maggiore (fig. II, F). Poichè l'anellino di rame è interrotto, è facile, dopo averlo un poco allargato, introdurvi il peziolo della formica e riavvicinare le due branche con l'aiuto di una pinza. Il montaggio delle formiche è molto facile e dopo

pochi tentativi lo si può eseguire in meno di mezzo minuto se si ha l'accortezza di trattenere fra l'indice e il pollice della mano sinistra una o due zampette dell'animale e di inflare l'anello mentre esso è intento a mordere la pelle.

*Calliphora vomitoria* L. — Un dispositivo molto simile a quello usato per le formiche è stato adottato per il fissaggio delle Callifore al supporto; esso consiste di una placchetta metallica al cui centro è saldato ortogonalmente un asse che può ruotare nel tubicino



FIG. IV.

Attogramma di larva di *Tenebrio molitor* L., di 4 ore su yesano allo 0,1% (la larva è stata tenuta successivamente in osservazione per 15 giorni; essa si è ripresa e non ha mostrato, oltre la leggera ipnosi iniziale, altri disturbi notevoli).

di sostegno; una laminetta di uguali dimensioni può muoversi a cerniera su quella inferiore. Dopo aver portato in ipnosi il teste prescelto si divaricano le due laminette e fra di esse si introducono le ali dell'insetto; abbassando la laminetta superiore e vincolandola a quella inferiore mediante un leggero morsetto l'animale rimane solidalmente vincolato (fig. II, C). L'operazione può essere compiuta in meno di un minuto.

Ho illustrato tre dei metodi da me usati per il fissaggio dei testi, ma altri se ne possono escogitare e sperimentare. Anche con insetti assai piccoli (*Acanthoscelides*, *Calandra*, ecc.) è possibile ottenere chiari diagrammi se si ha l'accortezza di regolare il peso del rullo alla mole del teste.

Da quanto ho detto appare chiaro che con il metodo degli attogrammi è possibile condurre l'indagine sia con il metodo di SANKOWSKI e YERNAKOFF, sia con quello delle superficie trattate; non solo, ma, date le modeste dimensioni dell'apparecchio, questo può venir posto su una lastra di cristallo (munita di un foro a tappo di gomma per il passaggio dei fili di corrente) e coperto da un cristallizzatore ad orli smerigliati e ingrassati (di volume noto); introducendo poi un quantitativo noto di sostanza ad azione respiratoria è possibile ottenere attogrammi anche per prodotti che agiscono per asfissia.



A seconda dell'altezza del tamburo chimografico e del numero di attografi messi in azione contemporaneamente sarà possibile ottenere tre o quattro attogrammi tutti in una volta ed avere così il contemporaneo controllo di più individui o un'analisi comparativa sincrona fra trattamenti diversi.

È noto che esistono contatticidi i quali esaltano in un primo tempo le attività cinetiche dei soggetti in esame, altri che le diminuiscono.



FIG. V.

Attogramma di larva di *Tenebrio molitor* L., di 4 ore su yesano allo 0,5% (la larva, tenuta successivamente in osservazione è andata perduta al secondo giorno per incidente di laboratorio).

L'osservazione corrente non permette di esprimere queste differenze se non in termini generici; ma con il metodo degli attogrammi è possibile esprimere le diverse fasi cinetiche con curve assai veritiere: basterà riportare in ascisse il numero di contatti avvenuti in un certo lasso di tempo (15 minuti ad esempio) e in ordinate i tempi. Per questa indagine naturalmente la velocità del chimografo (o il suo raggio) devono essere tali da rendere impossibile la sovrapposizione delle linee verticali negli attogrammi (non conviene abbassare il numero dei contatti del tamburo per non perdere in sensibilità).

Pur riservandomi di comunicare in altra sede una disamina comparativa dei risultati ottenuti con l'uso dell'attometro penso utile riportare alcuni attogrammi che possono illustrare con sufficiente chiarezza quali sono le possibilità di indagine che l'apparecchio ci fornisce.

Nel grafico di fig. III (le letture degli attogrammi vanno fatte da destra a sinistra nel senso delle frecce) sono rappresentati attogrammi di una stessa larva di *Tenebrio molitor*, rispettivamente nella prima e nella 24<sup>a</sup> ora di funzionamento dell'apparecchio. Nei grafici delle figg. IV e V sono rappresentati invece gli attogrammi di larve dello stesso insetto e della stessa età (4 ore successive procedendo dall'alto in basso e da destra a sinistra), tenute rispettivamente su rullo trattato con una soluzione di esaclorocicloesano rispettivamente allo 0,1% e 0,5% di isomero gamma. Come appare chiaro le differenze, specialmente nella quarta ora di attività, sono notevoli, tanto più se messe

in rapporto con la piccola differenza di principio attivo fra l'una e l'altra prova.

Non sarà inutile far presente che, essendo possibile sostituire il rullo trattato con altro uguale non trattato, è facile poter ottenere attogrammi di insetti tenuti per tempi limitati a contatto della superficie

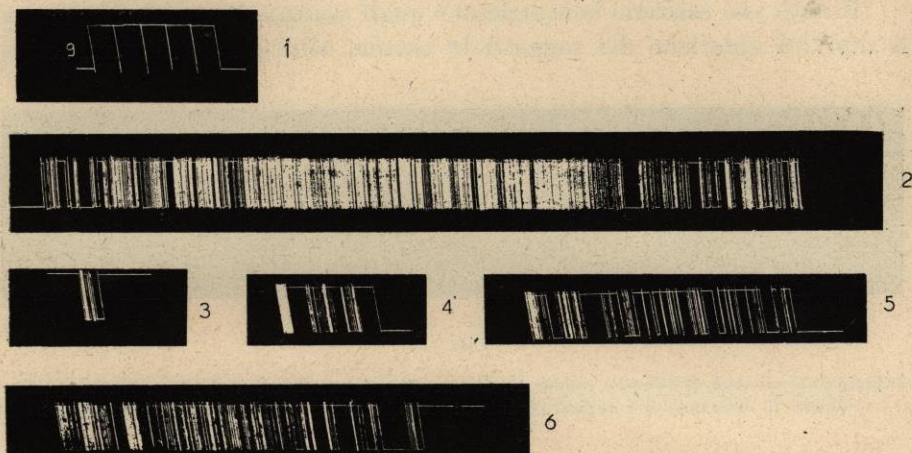


FIG. VI.

C. A. S. — Cooper (insetticida a base di piretrine e D. D. T. idroemulsionabile).

Diluzione — 25 cc. in 1000 cc. di H<sub>2</sub>O.

Teste. — *Formica rufa pratensis* Retz.

1. Ogni segno verticale corrisponde all'intervallo di 60 minuti secondi.
2. Attogramma normale per mezz'ora di tempo.
3. Attogramma su C. A. S. 25/1000, appena preparato.
4. Idem, dopo un'ora dalla preparazione.
5. » » 2 ore » »
6. » » 4 ore » »

I grafici mostrano l'azione del prodotto alla diluizione indicata dal momento in cui la soluzione è allestita fino a 4 ore dopo. Come appare evidente il prodotto ha una forte azione d'urto iniziale portando ad acnesi locomotoria in circa un minuto primo; ciò deve al suo contenuto in piretrine; tale azione va però rapidamente scemando dopo 1, 2, 4 ore sicchè l'azione residuale del prodotto tende ad identificarsi con l'azione residuale del solo D. D. T.

trattata ed avere così utili indicazioni sulle modalità di penetrazione e di diffusione delle sostanze tossiche nel corpo dell'insetto.

I rulli trattati possono inoltre venir conservati dopo un primo trattamento in modo che messi in azione a distanza di tempo permettano la registrazione di attogrammi rapidamente comparabili al fine di determinare l'efficacia residuale di un determinato contatticida. Al proposito si osservi la fig. VI dove sono disposti in successione attogrammi ottenuti con una soluzione di piretro e DDT; da essa appare chiaro come l'azione del piretro, fortemente abbattente nelle prime ore, vada diminuendo con il passare del tempo, sicchè l'azione del prodotto

finisce per indentificarsi con la sola azione residuale del DDT a pari concentrazione e a pari distanza di tempo.

Naturalmente, e chi ha la minima pratica di questi metodi di registrazione potrà facilmente comprenderlo, lo sperimentatore deve seguire l'esperimento soprattutto nelle prime fasi (fissaggio dell'insetto teste, accertamento di regolari contatti dopo il montaggio del rullo, funzionamento della penna scrivente, ecc.) e trarre le sue conclusioni solo quando un numero sufficientemente alto di prove non gli consenta di formulare un giudizio sicuro.

Modifiche più o meno difficili a realizzarsi potranno permettere ulteriori miglioramenti (contagiri, discriminazione fra la rotazione in un senso o nell'altro, ecc.) all'apparecchio, ma ciò potrà essere fatto solo con il contributo di vari sperimentatori che, accogliendo l'idea, intendano valorizzarla.

#### BIBLIOGRAFIA

- DONER, M. W. - *Testing insecticide residues. A review of methods.* - Soap and San. Chem., 1947, XXIII, p. 139.
- HOSKINS, W. M., CALDWELL, A. H. jr. - *Development and use of a small spray chamber.* - Soap and San. Chem., 1947, p. XXIII, 147.
- MILLER, A. C., SIMANTON, W. A. - *Biological factors in Peet-Grady results* - Soap and San. Chem., 1938, XIV, p. 103.
- MORETTI, G. P. - *Tossicità di alcuni composti clorurati per gli adulti di Oryzaephilus surinamensis L.* - Boll. Soc. Ent. It., 1948, LXXVIII, pp. 4-10.
- MYLIUS, A., KOECHLIN, H. - *Helvetica*, 1946, XXIX, pp. 405-411.
- PEET, C. H. - *The Peet-Grady method revised.* - Soap and San. Chem., 1932, VIII, p. 98.
- PEET, C. H., GRADY, A. C. - *Studies in insecticidal activity; testing insecticides against flies.* - Jour. Econ. Entom., 1928, XXI, pp. 612-617.
- POTTER, C. - *A laboratory spraying apparatus and technique for investigating the action of contact insecticides with some notes on suitable test insects.* - Ann. Appl. Biol., 1941, XXVIII, pp. 142-169.
- POTTER, C., HOCKING, K. S. - *An apparatus for testing and comparing the biological action of insecticides on flying insects and a method for sampling the concentration of the atomized insecticide.* - Ann. Appl. Biol., 1939, XXVI, pp. 348-364.

- RICHARDSON, H. H. - *Insecticidal method for the estimation of kerosene extracts of pyrethrum.* - Jour. Econ. Entom., 1931, XXIV, pp. 97-105.
- SANKOWSKY, A., JERNAKOFF, M. A. - Soap and San. Chem., 1934, X, p. 85.
- TATTERSFIELD, F. - *An apparatus for testing contact insecticides.* - Ann. Appl. Biol., 1934, XXI, p. 691.
- TATTERSFIELD, F. - *Biological methods of testing insecticides. A review.* Ann. Appl. Biol., 1939, XXVI, pp. 365-381.
- TATTERSFIELD, F., MORRIS, H. M. - *An apparatus for testing the toxic values of contact insecticides under controlled condition.* - Bull. Entom. Res., 1924, XIV, p. 223.
- TRUHAUT, R. - *Les dérivés organiques halogénés doués d'activité insecticide.* - Rev. gén. des Scien. pures et appl., 1947, LIX, pp. 163-175, 212-221.
- WEBB, J. E. - *A spraying apparatus and testing chamber for investigating the residual action of insecticidal deposits.* - Bull. Entom. Research, 1947, XXXVIII, pp. 209-232.