

EGIDIO MELLINI e GUIDO CAMPADELLI

Istituto di Entomologia «Guido Grandi» dell'Università di Bologna

Prove di incubazione extrauterina e di schiusa delle uova microtipiche di *Pseudogonia rufifrons* Wied.⁽¹⁾⁽²⁾

INTRODUZIONE

Nelle gabbie di allevamento molte femmine di *Pseudogonia rufifrons* soccombono più o meno precocemente, con l'utero ancora infarcito da qualche migliaio di uova microtipiche in varie fasi dello sviluppo embrionale. A parte l'interesse conoscitivo, è importante, dal punto di vista pratico, verificare se vi è la possibilità di ottenere il completamento dell'embriogenesi fuori dalle vie materne. In caso positivo si potrebbe infatti utilizzare gran parte di questo ingente quantitativo di uova per l'allevamento massale del parassita o, quanto meno, ricorrere ad esse in eventuali momenti critici di temporanea rarefazione dell'entomofago, anche se la regolare continuità dell'allevamento è garantita, nei nostri laboratori, da una «banca» di uova, permanente pur nel continuo rinnovo, conservate in ambiente refrigerato a 4-5°C (Campadelli, 1982).

Per quanto riguarda i fattori inducenti la schiusa delle uova microtipiche, ci siamo occupati dell'argomento una decina di anni or sono (Mellini e Campadelli, 1978). In quella occasione abbiamo dimostrato l'importanza primaria di certi enzimi e la maggiore attitudine a sgusciare, in condizioni sperimentali, delle uova «uterine» (naturalmente a sviluppo embrionale concluso) rispetto a quelle deposte, nonché la grande variabilità delle risposte, al riguardo, in relazione alle diverse femmine impiegate.

Ritorniamo ora su questo tema sollecitati da finalità di ordine eminentemente pratico, inerenti ai tentativi, in atto nel nostro laboratorio, di allevare le larve di questo parassitoide con dieta artificiale. Per questo scopo è preferibile ricorrere a tecniche che consentano uno sgusciamiento generalizzato e in tempi brevi, in modo da potere immettere senza indugio le minutissime delicate larvette nei

⁽¹⁾ Lavoro effettuato nell'ambito del P.F. - M.A.F. «Lotta biologica e integrata per la difesa delle piante agrarie e forestali».

⁽²⁾ Studi sui Ditteri Larvevoridi. XLVIII contributo.

substrati trofici. Poiché simili risultati non sono facilmente ottenibili con l'uso degli enzimi, si sono provati anche altri metodi e in particolare la centrifugazione. È chiaro che tali stimoli meccanici non sono operanti in natura sul nostro parassitoide sperimentale, ma hanno la caratteristica di essere non solo agevolmente applicabili in laboratorio ma anche misurabili con facilità e precisione. Del resto i pochi Autori che si sono occupati di questo problema hanno ritenuto che, per indurre la fuoriuscita delle larvette dagli involucri delle uova microtipiche, concorrano sia fattori chimici che fattori meccanici, rappresentati questi ultimi dalle frizioni operate dalle appendici boccali dell'ospite sulle uova al momento della loro ingestione assieme al bolo alimentare.

MATERIALE E METODO

Per l'esecuzione delle varie prove è stato utilizzato un centinaio circa di femmine di *Pseudogonia rufifrons* di età superiore a una decina di giorni, quando è ormai iniziata da qualche tempo l'ovideposizione e l'utero risulta ancora pieno di uova nei vari stadi dell'embriogenesi. Oltre a femmine vive sono stati impiegati individui moribondi nonché morti da 1 o più giorni fino ad un massimo di 2 mesi.

1. Prove di incubazione extrauterina

Si sono dissezionate femmine vive o moribonde per asportarne l'utero che viene disteso su un foglio di carta bibula inumidita. Da esso sono stati prelevati 3 campioni di uova, comprendenti un centinaio di elementi ciascuno, a tre diversi livelli e precisamente: uova a corion dorsale nero-pece site in prossimità del gonotrema, uova a corion di colore grigio-nocciola localizzate nella metà più interna del suddetto organo, ed infine uova a corion bianco presenti nel tratto subito a valle dello sbocco delle spermateche. Tali campioni sono stati conservati in soluzione fisiologica (0,85% di NaCl) per una settimana in cella termostata a 27°C.

Si è voluto accertare inoltre se l'embriogenesi proceda anche nelle uova che restano stipate nell'utero di femmine morte e che, assieme al secreto dell'epitelio uterino che in breve si consolida, vengono a formare una sorta di conglomerato compatto e duro. Per potere esaminare queste uova al binoculare e sottoporle ai previsti trattamenti, le femmine morte da tempo sono state messe a rammolire in camera umida per 24 ore; campioni di uova a corion variamente pigmentato sono stati sottoposti ad un primo esame previo schiacciamento parziale tra due vetrini.

2. Prove di sgusciamento

a) Con l'uso di solventi dipolari aprotici delle albumine.

Nell'ipotesi che la mancata schiusura di uova contenenti larve pronte a sgusciare possa dipendere dalla pellicola di sostanze albuminoidi che le riveste, si

sono immersi campioni di uova in soluzioni acquose di prodotti chimici dotati della proprietà di «solubilizzare» tali sostanze. Su consiglio di alcuni docenti dell'Istituto di Chimica organica dell'Università di Bologna sono stati impiegati i seguenti prodotti:

— NaCl 0,85%. Limitatamente ad alcune prove, nella soluzione sono stati immersi frammenti di pastiglie usate in ittiologia per aumentare il tenore dell'ossigeno disciolto.

— Urea 1-30%.

— N,N Dimetilformamide. Ha l'inconveniente di divenire, nel giro di 24 ore, lattescente, così che l'osservazione delle uova immerse ne è impedita.

— Dimetilsofossido. Al pari del prodotto precedente, è stato usato allo stato puro, cioè non diluito.

Le suddette prove sono state ripetute 4 volte.

b) Con l'uso di enzimi.

Sono stati saggiati i seguenti biocatalizzatori:

— Chimotripsina. Sciolta, in ragione del 2,5%, in soluzione tampone di acetato di Na al 2,5 M, e usata a 25°C.

— Diastasi. Diluita come sopra ma impiegata a 37°C.

— Clarasi. Diluita e impiegata come sopra. Si tratta di un miscuglio di 3 enzimi con attività amilolitica, proteolitica e fosforolitica.

— Lipasi pancreatica. Stessa concentrazione e temperatura come per il complesso enzimatico precedente.

Va peraltro rilevato che la temperatura di 37°C, necessaria perché tre dei preparati enzimatici usati possano esplicare in pieno la loro azione, rappresenta un livello termico tendenzialmente critico per il parassita (Campadelli e Tosi, 1984).

Come per le prove precedenti le uova erano libere e disseminate sul fondo di vetrini da orologio sigillati ermeticamente con parafilm, mentre uno o più campioni per ogni tesi venivano sottoposti all'esame microscopico al fine di accertare che l'embriogenesi fosse terminata o comunque in stadi molto avanzati, cioè con presenza di larvetta provvista di scheletro cefalo-faringeo bene differenziato.

c) Mediante centrifugazione.

Sono state sottoposte alla forza centrifuga solo uova contenenti «larvette» con apparato bucco-faringeo e fascie di spinule bene evidenti. L'esame al binoculare a 40 ingrandimenti non può tuttavia garantirci che simili larve siano effettivamente del tutto pronte a sgusciare. Campioni, di un centinaio di uova ciascuno, sono stati prelevati dall'utero di femmine moribonde o morte e immersi in liquidi quali acqua distillata, ovvero di fonte nonché in preparati enzimatici. Operazioni simili sono state effettuate anche con uova deposte sui soliti zimbelli di cera e distaccate o meno da tali supporti. Inizialmente si sono provati regimi di rotazione compresi tra 1000 e 14000 giri al minuto e tempi di rotazione varianti da 5 secondi a 4 minuti. Visti i risultati, la sperimentazione è stata in

seguito condotta sottoponendo i campioni a 1000 giri per 10-15 secondi. Infatti tempi e velocità eccessivi non portano ad un aumento sensibile delle schiuse mentre deprimono vistosamente la vitalità delle larvette neonate. Va inoltre precisato che i valori temporali adottati sono puramente nominali; ad essi infatti vanno aggiunti 3 secondi necessari per raggiungere il regime di rotazione di 1000 giri e 11 secondi per l'arresto della centrifuga dal momento in cui si interrompe il contatto.

RISULTATI

1. Prove di incubazione extrauterina

Inizialmente si è proceduto col solito metodo di prelevare dall'utero di femmine in fin di vita, o morte da non più di 24 ore, campioni di uova a vari livelli.

Le uova, disperse in soluzione fisiologica, sono state poste in incubazione in cella termostata a 27°C, ovvero, limitatamente ad alcune prove, a temperatura ambiente sui 20-24°C.

Dopo una settimana, oltre alle uova nere, anche quelle inizialmente di color nocciola o bianche presentavano all'interno, in percentuali variabili fino al 90% circa, la larvetta completamente formata. Nel frattempo parte delle uova nocciola erano divenute nere e parte di quelle bianche avevano virato al nocciola. Risulta pertanto possibile utilizzare in larga misura le uova presenti nell'utero di una femmina, magari anche morta da 1-2 giorni, sottoponendole ad incubazione in vitro⁽³⁾. L'unica differenza riscontrata, rispetto a quelle incubate in vivo, è che la pigmentazione dei corion in breve si arresta, mentre nella femmina viva essa procede assai più celermente dell'embriogenesi, tant'è vero che in uova col corion dorsale del tutto pigmentato, ma lontane dal gonotremo, la larvetta non è ancora completamente formata. Va peraltro ribadito che il fenomeno del completamento dello sviluppo embrionale fuori dall'apparato genitale non è sempre generalizzato per tutte le femmine; per alcune infatti nelle uova parzialmente pigmentate o addirittura bianche l'embriogenesi si conclude solo in un numero limitato di casi.

A parte la possibilità di utilizzare a scopo di moltiplicazione massale, quote cospicue delle uova presenti in femmine in fin di vita o morte (e che quindi andrebbero perdute) indipendentemente dallo stadio raggiunto nello sviluppo embrionale, i dati soprariportati ci assicurano che nelle prove che seguono, anche se nelle uova a corion nero l'embriogenesi non era ultimata al momento del loro impiego, vi era pur sempre la possibilità che essa potesse completarsi nei liquidi

⁽³⁾ È questa una tecnica cui siamo ricorsi varie volte in passato per ottenere planidi da uova parzialmente incubate nell'«utero» materno di specie ovovivipare quali *Steiniella callida* Meig., *Ptilopsina nigrisquamata* Zett. e *Macquartia chalconota* Meig. (Mellini, 1958).

di schiusa, nei quali la permanenza si protraeva generalmente per una settimana.

Visti questi risultati, si è voluto accertare se l'embriogenesi possa terminare anche nelle uova rimaste nel corpo di femmine morte da lungo tempo. Nel giro di una giornata, o poco più, il cadavere risulta completamente disseccato nei suoi visceri; le uova e l'abbondante secreto lattescente si rapprendono in una sorta di «mandorlato» assai compatto. Abbiamo posto una ventina di femmine morte, da una settimana fino a oltre due mesi, in camera umida e così, rammolliti gli insetti ed i loro organi interni, si è potuto stemperare il contenuto uterino in acqua distillata. L'esame delle uova, previo parziale schiacciamento delle medesime in acqua tra due vetrini, pure fornendo risultati alquanto variabili in relazione alle diverse femmine impiegate, ha dimostrato che l'incubazione, nel corpo di individui privi di vita, finisce generalmente con l'arrestarsi in tempi relativamente brevi dopo la morte. Infatti soltanto in 2 femmine si sono trovate uova di colore nocciola con embrione fornito di scheletro cefalo faringeo più o meno evidente. L'arresto dello sviluppo embrionale nelle uova rimaste entro le femmine morte da oltre 24-48 ore va con tutta probabilità attribuito al fatto che, cementandosi il materiale contenuto nell'utero in un duro conglomerato, si rendono praticamente impossibili gli scambi gassosi dell'embrione. Infatti qualora le uova siano state tempestivamente trasferite in soluzione fisiologica, l'embriogenesi di solito procede fino alla sua conclusione.

2. Prove di sgusciamento

A. Mediante «solventi» delle sostanze albuminoidi.

Questi tentativi sono stati effettuati non solo per ottenere larve neonate da impiegare nella messa a punto di diete artificiali, ma anche nella presunzione che potessero fornire una prova indiretta, o quanto meno indizi, che è effettivamente il secreto uterino, ricoprente le uova, il fattore inibente la loro schiusa dopo la deposizione. Se l'azione attivante esplicata dagli enzimi nel canale alimentare dell'ospite consiste semplicemente nel distruggere tale film, lo stesso risultato, cioè la schiusa delle uova, si dovrebbe ottenere anche con altre sostanze chimiche prive di attività enzimatiche ma in grado di sciogliere la suddetta pellicola che è formata, assai probabilmente (Gardenghi e Mellini, 1980) da sostanze riferibili al gruppo delle albumine e/o globuline.

Le prove sono state ripetute 8 volte immergendo uova a sviluppo embrionale concluso o pressoché, provenienti da altrettante femmine, in soluzioni acquose, a varia concentrazione, dei 4 prodotti indicati precedentemente. Nonostante le loro proprietà di agire come solventi degli albuminoidi, il numero delle schiuse è stato in realtà molto modesto, o nullo, sebbene la permanenza delle uova nei vari liquidi si sia protratta per quasi una settimana.

Al pari di quanto si è verificato nelle prove che seguono, si sono notate numerose schiuse parziali, cioè larvette fuoriuscite dagli involucri dell'uovo solo

con l'avancorpo. Ciò ha consentito di accertare che l'esodo avviene a livello del corion ventrale (nella metà anteriore), che è del tutto molle e gommoso. Pertanto sono da escludere le ipotesi avanzate dagli Autori citati da Severin et alii (1915) e cioè che l'azione degli enzimi consista nell'indebolire il corion e quella delle mandibole dell'ospite nel romperlo.

Il prodotto che si è nettamente distinto, e che ha dimostrato una certa efficacia, è il cloruro di sodio sciolto in acqua distillata in ragione dello 0,85%, vale a dire nella stessa misura della soluzione fisiologica comunemente usata per gli insetti. Questa tecnica, qualora migliorata, magari con l'adozione di livelli termici più idonei, appare largamente compatibile con l'utilizzazione delle larvette neonate a scopo di allevamento su substrati trofici artificiali, potendo versare direttamente il liquido di schiusa contenente i minutissimi parassiti su tali diete.

L'aggiunta di frammenti di pastiglie liberanti ossigeno, usate negli acquari, non ha modificato l'efficienza dei vari liquidi di schiusa. Si è ricorsi a tale espediente nell'ipotesi che il mancato sgusciamiento delle larve fosse imputabile a condizioni asfittiche.

Data l'importanza dell'argomento ci si riserva di riprenderlo e di studiarlo a parte ricorrendo ad idonee tecniche sperimentali.

B. Mediante enzimi.

Si è voluto saggiare anche l'efficacia di enzimi non impiegati nella sperimentazione da noi svolta una decina di anni or sono (Mellini e Campadelli, 1978).

Sulle uova uterine la loro efficacia è stata, tutto sommato modesta; le schiuse hanno cominciato a manifestarsi solo dopo alcune ore (4-5) dall'immersione delle uova nei vari liquidi enzimatici, nei quali peraltro sono rimaste per almeno 5 giorni. In pratica però il numero delle schiuse va progressivamente riducendosi col trascorrere del tempo, sebbene la lunga permanenza in tali liquidi a 25°C generalmente consenta, nelle uova a sviluppo embrionale non ancora terminato, il completamento della embriogenesi e di conseguenza, almeno teoricamente, la possibilità di sgusciamiento.

I risultati migliori si sono ottenuti con chimotripsina operante a 25°C. Forse la scarsa efficienza dimostrata da diastasi e clarasi è dipesa, almeno in parte, dalle alte temperature (37°C) alle quali esse agiscono che possono avere danneggiato le uova. Infatti mentre in quelle immerse nei liquidi contenenti chimotripsina l'embriogenesi, qualora incompleta ha potuto, come si è riferito, terminare, negli altri liquidi enzimatici mantenuti a 37°C, anche dopo 4-5 giorni in molte uova la larvetta non risultava ancora formata. Peraltro anche operando a temperature inferiore (25-27°C) non si sono ottenute percentuali di schiusa apprezzabili. Sulla clarasi, in particolare, si era contato molto, visto che è costituita da una miscela di 3 enzimi ad attività complessa.

Sulle uova deposte anche la chimotripsina ha agito in misura irrilevante e sovente addirittura nulla anche con tempi assai lunghi (circa una settimana) e sebbene in questo caso lo sviluppo embrionale fosse certamente terminato fin

dall'inizio della prova. Si conferma pertanto, almeno con le tecniche di laboratorio adottate, l'enormemente minore propensione a sgusciare propria delle uova deposte rispetto a quelle uterine, già registrata nel corso delle sperimentazioni passate. Parimenti si ribadisce, per le uova uterine, la grande differenza nelle risposte alle applicazioni di enzimi col variare della femmina.

C. Mediante l'impiego della forza centrifuga.

Con questo metodo (1000 giri al minuto per la durata di 10 secondi) si è ottenuta la schiusa sovente generalizzata, di uova uterine poste sia in acqua di fonte che in soluzione fisiologica nonché nelle varie preparazioni enzimatiche di cui si è detto nel paragrafo precedente.

I risultati migliori si sono avuti, contro ogni aspettativa, nella semplice acqua, non solo per il numero assai più elevato di larvette libere, pari sovente al 90% ed oltre delle uova impiegate, ma anche per la loro maggiore vitalità; in questo mezzo esse si sono infatti mantenute mobili anche per 2 giorni ed oltre mentre nei liquidi contenenti enzimi sono risultate inerti già dopo una ventina di ore.

Non si è notato un progressivo incremento nel numero delle schiuse aumentando la durata del trattamento, anche se in realtà, in qualche caso, l'efficacia è apparsa alquanto superiore con tempi alquanto più lunghi (20 secondi). Neppure le schiuse si innalzano progressivamente aumentando il numero dei giri; anzi più il regime di rotazione diviene elevato più le larve si mostrano danneggiate e soccombenti in tempi brevi. In ogni caso l'effetto è pressoché immediato; infatti dopo 3-4 minuti dal trattamento il numero delle larvette libere è elevato e di norma non subisce notevoli incrementi col trascorrere del tempo.

La forza centrifuga, che si è rivelata l'agente di schiusa di gran lunga più efficace e rapido, è, naturalmente, un mezzo valido solo se applicato su uova a sviluppo embrionale concluso e quindi già pronte per schiudere⁽⁴⁾. In alcune ripetizioni in cui si è avuto un basso numero di schiuse, i campioni di uova sono stati sottoposti ad una seconda centrifugazione 24-48 ore dopo; orbene, così operando, si è avuto un'alto numero di larvette. Si ritiene che ciò sia stato possibile perché nel suddetto lasso di tempo lo sviluppo embrionale ha potuto completarsi nella maggioranza delle uova. Va infatti tenuto presente che l'esame al microscopio ci indica se la larva è più o meno formata, ma non se lo sviluppo è realmente terminato e il nuovo organismo pronto a fuoriuscire dagli involucri dell'uovo. Non è comunque conveniente procedere ad una seconda centrifugazione anche perché, in tal caso, le larve neonate in breve diventano piriformi e soccombono. Del resto dei vari tempi di centrifugazione provati, quelli consigliabili sono i più brevi, fino ad un massimo di una quindicina di secondi per evitare danni alle larvette che debbono iniziare lo sviluppo postembrionale.

(⁴) Con la centrifugazione si può talora separare il corion dall'uovo che peraltro rimane avvolto dalla membrana vitellina.

In conclusione è dunque preferibile, per indurre una schiusa generalizzata, mettere in incubazione le uova estratte dall'utero per almeno un giorno, od anche più secondo lo stadio raggiunto dall'embriogenesi, in acqua di fonte o in soluzione fisiologica, e procedere quindi alla loro centrifugazione nei suddetti liquidi secondo le modalità sopra indicate. È questo il metodo che riteniamo più idoneo per ottenere in breve tempo grandi masse di larve neonate per gli impieghi sperimentali più vari.

Per le uova deposte le schiuse ottenute con la centrifugazione sono risultate del tutto sporadiche. Sono state immerse in soluzione fisiologica o in acqua di fonte sia uova distaccate dai supporti di cera che uova incollate dalle femmine sui medesimi e successivamente frammentati. In tutti i casi, pur applicando i valori di rotazione e temporali rivelatisi pienamente efficaci per le uova uterine, i risultati sono stati del tutto deludenti. Non c'è stata dunque differenza nelle schiuse tra le uova scollate dal supporto, che sembravano avvantaggiate, e quelle incollate; solo si è notato che una modestissima aliquota di queste ultime si era staccata. La situazione è risultata immutata 24 ore dopo. Si conferma pertanto l'eccezionale ritenenza a schiudere propria delle uova deposte non solo in presenza dei fattori chimici di schiusa ma anche di quelli fisici. Sottolineamo che in questa prova, ripetuta 4 volte, non vi era alcun dubbio che le larvette fossero pronte a fuoriuscire, dato che si trattava di uova deposte nelle quali, di regola, l'embriogenesi è già completata al momento della deposizione.

Aggiungiamo da ultimo che le larvette indotte a sgusciare mediante la centrifugazione delle uova sono perfettamente vitali, visto che un loro campione, trasferito su omogeneizzato di crisalidi di *Galleria*, ha aumentato il proprio peso iniziale di una trentina di volte nel giro di una settimana (Bratti e Monti, 1988).

RIASSUNTO

La presente ricerca è stata effettuata come lavoro propedeutico alla sperimentazione in atto sull'allevamento integrale delle larve del parassitoide *Pseudogonia rufifrons* Wied. su dieta artificiale.

Sono state saggiate alcune tecniche per ottenere lo sgusciamiento in vitro delle uova microtipiche. Per quanto riguarda i fattori chimici di schiusa, si è provata l'efficacia di vari solventi dipolari aprotici delle sostanze albuminoidi, di liquidi enzimatici nonché della soluzione fisiologica. Con riferimento ai cosiddetti fattori fisici di schiusa si è applicata, su uova parimenti in immersione, la forza centrifuga. Il metodo di gran lunga più efficace, sia per l'elevatissima percentuale di schiusa che per l'eccezionale rapidità d'azione (qualche minuto, contro alcune ore), è risultato quello della centrifugazione, cioè l'applicazione di una forza non implicata in natura in questo processo. Sono sufficienti valori relativamente bassi di rotazione (1000 giri al minuto) e di esposizione (10-15 secondi), tali da non incidere minimamente sulla vitalità delle larvette neonate.

Qualunque sia la tecnica applicata, le uova uterine schiudono molto più facilmente di quelle deposte. Per questa ragione è considerato che molte femmine soccombono precocemente con l'utero ancora gremito di uova, si è tentato di incubare queste ultime in soluzione fisiologica. Tale

operazione riesce in molti casi purché le uova siano prelevate dalla femmina non oltre 1-2 giorni dalla sua morte.

Pseudogonia rufifrons Wied.: extrauterine incubation and microtype egg hatching

SUMMARY

The data reported in this paper are the results of laboratory observations conducted as part of an experiment on the rearing of the parasitoid *Pseudogonia rufifrons* larvae on artificial diet.

Chemical and physical techniques for the in vitro hatching of microtype egg, were tested. The chemical agents involved were dipolar aprotic solvents of albumen-like substances, enzymatic liquids and saline solution. The physical method of hatching employed was the centrifuging of eggs in saline solution or in water.

Centrifuging was found to be the most effective technique as to the percentage (very high) of hatched eggs and rapidity (a few minutes against several hours). The tests showed that a relatively low r.p.m. rate (1000) and minim exposure time (10-15 seconds) were sufficient to assure good results without in the least affecting the viability of newly hatched larvae.

The uterus-extracted eggs had a far higher hatching percentage than did laid eggs. For this reason, and because many females die prematurely with a nearly full complement of immature eggs, an attempt was made to incubate these eggs in saline solution. This technique proved successful so long as the eggs are extracted within 1-2 days of the female's death.

BIBLIOGRAFIA CITATA

- BRATTI A., MONTI M., 1988. - Allevamento in vitro delle larve di *Pseudogonia rufifrons* Wied. su omogeneizzato a base di crisalidi di *Galleria mellonella* L. - *Boll. Ist. Ent. «G. Grandi» Univ. Bologna*, 43: 115-126.
- CAMPADELLI G., 1982. - Sulla conservabilità delle uova microtipiche di *Gonia cinerascens* Rond. (Dipt. Tachinidae). - *Boll. Ist. Ent. Univ. Bologna*, 37: 91-100.
- CAMPADELLI G., TOSI C., 1984. - Ricerca della temperatura ottimale per l'allevamento di *Gonia cinerascens* Rond. (Diptera Larvaevoridae). - *Boll. Ist. Ent. «G. Grandi» Univ. Bologna*, 39: 101-111.
- GARDENGI G., MELLINI E., 1980. - Sulla formazione dell'uovo microtipico e del relativo apparato di fissazione in *Gonia cinerascens* Rond. (Diptera Larvaevoridae). - *Boll. Ist. Ent. Univ. Bologna*, 35: 215-230.
- MELLINI E., 1958. - Effetti della penetrazione precoce nell'ospite sullo sviluppo del parassita. - *Atti Acc. Sci. Ist. Bologna, Rendiconti*, 5: 1-9.
- MELLINI E., CAMPADELLI G., 1979. - Sulla schiusura delle uova microtipiche di *Gonia cinerascens* Rond. in condizioni sperimentali. - *Boll. Ist. Ent. Univ. Bologna*, 34: 153-189.
- 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.