

[Handwritten scribbles]

RICERCHE SIEROLOGICHE 146002
APPLICATE ALLA SISTEMATICA DEL GENERE *CORIS*

ALONZO V. - CAVALIERE A. - CEFALI M. L. - PERNICE A.

ISTITUTO DI MICROBIOLOGIA DELLA FACOLTÀ DI SCIENZE DELL'UNIVERSITÀ DI MESSINA
Direttore: prof. AUGUSTO BRUNI

ISTITUTO SPERIMENTALE TALASSOGRAFICO DI MESSINA
Direttore inc.: dott. ANTONINO CAVALIERE

Instituut voor Zeewetenschappelijk onderzoek
Institute for Marine Scientific Research
Introduction
8401 Broedene - Belgium - Tel. 039 / 80 37 15

La sistematica del genere *Coris* (*Julis* di Cuvier), ordine Perciformi, sottordine Labroidi, famiglia Labridi, è stata oggetto, da tempo, di discussioni in merito alle due specie mediterranee *Coris julis* (L.) e *Coris giofredi* (Risso), che vari Autori, oggi, ritengono potersi considerare una unica specie.

È stato Linneo, per primo, a descrivere nel 1766 il *Labrus julis*, che già nel 1758 aveva classificato col nome di *Coris julis*. In seguito il RISSO (1810), per determinati caratteri morfologici, ritenne di dover distinguere dal *Coris julis* un'altra specie, che denominò *Coris giofredi*.

Altri Autori mantennero la distinzione fra le due specie. Il CANESTRINI (1872) descrisse forme di passaggio tra le due specie in questione, tuttavia, le considerò distinte. Dello stesso parere furono MOREAU (1881), RAFFAELE (1888), GOURRET (1893) e LO BIANCO (1909) in base al rinvenimento di maschi e femmine appartenenti alle due specie; anche SARATO (1890) segnalò di avere trovato esemplari maschi di *Coris giofredi*.

Altri ittiologi, tra cui STEINDACHNER (1868), ritennero, invece, si trattasse di una sola specie, e che *Coris julis* fosse il maschio e *Coris giofredi* la femmina. A tale conclusione sono pervenuti: GUNTHER (1880), che pur in un primo tempo (1862) era stato sostenitore della differenza fra le due specie; DAY (1880), JORDAN (1891), SMITT (1893), HOLT (1898). Anche TORTONESE e TROTTI (1949) sostennero che *Coris julis* e *Coris giofredi* si dovessero ritenere sinonimi di una stessa specie.

Secondo BACCI e RAZZAUTI (1957) *Coris julis* e *Coris giofredi* sono da ritenersi maschio e femmina di una stessa specie, da chiamarsi « *Coris julis* », che presenta due livree diverse indipendenti dalle fasi sessuali; si tratterebbe di una specie ermafrodita proteroginica, con lunghe fasi

puramente femminili e maschili, rientrante nella categoria dei falsi gonocoristi.

Anche REINBOTH (1957) è d'accordo sulla inversione sessuale ed è contrario alla dualità delle specie.

Al riguardo si rileva, ancora, che RAFFAELE (l.c.), FAGE (1918) e SPARTÀ (1933, 1956) descrissero le uova, lo sviluppo embrionale e post embrionale, osservando che positive ripetute fecondazioni artificiali incrociate conducono sempre alla schiusa delle larve, aventi lievi differenze, sia per la durata della incubazione in laboratorio, sia per qualche particolare morfologico. Nelle uova e nelle larve non si notano, però, sostanziali caratteri atti a dare precisi elementi diagnostici che inducano a ritenere distinte le due specie (SPARTÀ 1956).

Questi Labridi, intesi volgarmente Donzelle, Girelle, Pesci di re ecc., sono molto diffusi nel Mediterraneo; qui a Messina vengono denominati dai pescatori rispettivamente « viriola masculina e viriola fimmedda », mentre un altro Labride, il *Thalassoma pavo* (*Julis di Bleeker*), viene denominato « zinghira ».

Le specie del genere *Coris* presentano corpo oblungo, lateralmente compresso, provvisto di piccole squame che variano di numero e grandezza; sono Teleostei dagli splendidi colori, le cui tonalità variano in rapporto allo sviluppo, all'habitat, al sesso ed alla maturità sessuale. Vivono a medie profondità ove vegetano abbondanti le alghe, si nutrono in parte di queste, nonchè di piccoli crostacei e molluschi. Le dimensioni oscillano entro limiti piuttosto ristretti, la maturità sessuale si ha in primavera-estate.

I caratteri che hanno indotto i vari Autori citati a ritenere differente *Coris julis* da *Coris giofredi* si riferiscono, soprattutto, alla pigmentazione che, nei diversi periodi di vita dei Labridi, ed in particolare nel genere *Coris*, subisce variazioni abbastanza evidenti.

Coris julis si differenzerebbe a prima vista da *Coris giofredi* per caratteri pigmentari più accentuati, e cioè per la presenza di una macchia azzurra sui primi raggi della dorsale e di un'estesa macchia nera ai lati del corpo.

Come si rileva dalla letteratura, sin qui passata in rassegna, gli studi, sinora compiuti, sono stati limitati ad osservazioni sulle uova, sviluppo embrionale e postembrionale, sulle differenze biometriche, sulle gonadi, sulle livree. Secondo Spartà molto utili, ai fini discriminativi, sarebbero ulteriori indagini da condurre su organi ciatiformi, scheletro, otoliti squame ecc., già in corso in questo Istituto Talassografico.

Non sono state ancora indagate le caratteristiche antigene del genere *Coris*, studio che costituisce lo scopo del presente lavoro, nel quale sono paragonati sierologicamente gli antigeni estratti dalle masse muscolari di *Coris julis* e *Coris giofredi*.

Ai fini del controllo della sensibilità del metodo, gli antigeni sono stati paragonati anche con la specie del genere *Thalassoma*, *Thalassoma pavo* (L.).

Materiali e metodo

Stante la difficoltà di ottenere nei Labridi in studio congrue quantità di sangue per puntura cardiaca, le prove sierologiche sono state condotte su antigeni estratti dalle masse muscolari (1).

PREPARAZIONE DELLA POLVERE DI MUSCOLO. — Esempari di *Coris julis* (L.), *Coris giofredi* (Risso) e *Thalassoma pavo* (L.) furono tenuti a stabulare per otto giorni in acquari con acqua di mare. I pesci furono, quindi, uccisi e privati sia di quegli organi (cervello, occhi, squame, ecc.) i cui antigeni organo-specifici avrebbero potuto interferire nelle prove di immunodiffusione, sia di quegli organi interni (come il tratto digerente) contenenti antigeni nettamente eterologhi, inerenti ai microorganismi della flora intestinale. Le masse muscolari vennero omogeneizzate sterilmente in apparecchio Politron 20 OD e sottoposte a criolisi. Infine il materiale fu estratto a freddo (-10°C) tre volte con miscela di Bloor (etere solforico + alcool assoluto 3 : 1), al fine di allontanare i lipidi (2).

PREPARAZIONE DEI SIERI IMMUNI. — Il muscolo dei pesci, essiccato e polverizzato come descritto, veniva sospeso in soluzione fisiologica in ragione di mg 100 per ml.

La sospensione era mescolata con parti eguali di adiuvante di Freund completo ed inocolata, in ragione di ml 1 di emulsione, nella zona nucale, per via sottocutanea, in conigli maschi del peso di kg due. Dopo una settimana veniva praticata una seconda iniezione con adiuvante, e la immu-

(1) A questo riguardo vogliamo ricordare le ricerche condotte da STALLCUP (1954) con antigeni estratti dai muscoli per prove quantitative di precipitazione, sulla scorta delle misurazioni della torbidità. Le ricerche di questo Autore, fatte su volatili appartenenti alla famiglia Fringillidae, condussero alla valutazione di differenze sierologiche che hanno avuto valide applicazioni ai fini tassonomici ed hanno dimostrato che la classificazione in base ai caratteri sierologici concordava con quella effettuata in base a criteri anatomo-morfologici. Lo stesso Autore (1961) ottenne risultati confortevoli nella comparazione sierologica di alcune famiglie del sottordine dei Passeri.

JOHNSON e LEONE (1955) e LEONE e WIENS (1956), in alcuni casi, hanno utilizzato come antigene, in reazioni di precipitazione, estratti dal cuore o dalle masse muscolari, o di pollo o di mammiferi.

(2) I lipidi sono stati allontanati espressamente perché, se iniettati assieme al materiale proteico muscolare, comportandosi come apteni, avrebbero potuto contribuire alla produzione di anticorpi non certamente specifici. Infatti è noto che in tutto il mondo organico vivente sono contenuti i cosiddetti antigeni lipidici ubiquitari.

In ricerche condotte da PERNICE (1958) allo scopo di verificare mediante la reazione di fissazione del complemento, servendosi come materiale antigene delle masse muscolari, la identità sierologica o meno tra *Coris julis* e *Coris giofredi*, non vennero ottenuti risultati sufficientemente probativi a causa della considerevole minore produzione di anticorpi ottenuta con *Coris julis*, nella immunizzazione dei conigli (effettuata senza l'adiuvante di Freund) rispetto agli animali trattati con *Coris giofredi*. In questi, infatti, il tasso degli anticorpi era risultato circa il decuplo di quello ottenuto con *Coris julis*.

nizzazione veniva protratta con due iniezioni settimanali di ml 1 di sospensione muscolare in soluzione fisiologica, senza adiuvante. Periodicamente si effettuavano dei salassi per saggiare l'attività dei sieri alle prove di immunodiffusione. In caso di esito soddisfacente si procedeva al salasso totale dell'animale, in caso contrario si continuava il trattamento immunizzante, sempre senza adiuvante. In genere per una buona immunizzazione fu sufficiente un periodo di 12 settimane con *Coris giofredi* e *Thalassoma pavo*, mentre periodi leggermente maggiori furono necessari per ottenere sieri attivi dagli animali trattati con *Coris julis*.

ESTRAZIONE DEGLI ANTIGENI DALLA POLVERE DI MUSCOLO. — Onde potere disporre del maggior numero di antigeni si è creduto opportuno procedere alla estrazione frazionata delle proteine muscolari, cioè quelle del sarcoplasma separatamente da quelle delle miofibrille; allo scopo si è seguito quanto suggerito da Helander (1957), apportando al metodo alcune lievi modifiche. La polvere di muscolo veniva estratta due volte con tampone fosfatico (mono e di-potassico), a pH 7,3 e 0,03 M, in ragione di ml 10 di tampone per grammo di muscolo secco. Effettuata la separazione mediante centrifugazione, i surnatanti venivano riuniti in pool (frazione A) e sul sedimento venivano eseguite altre tre estrazioni con ml 10 per volta di tampone fosfatico a pH 7,4 e 0,1 M, addizionato di KJ 1,1 M; dopo centrifugazione le tre aliquote venivano riunite in pool (frazione B). Tutte le estrazioni erano effettuate per tre ore a temperatura ambiente. Il residuo della seconda estrazione era ulteriormente estratto per 12 ore a 37 °C con tampone al Veronal secondo Michaelis a pH 8,4 e 0,01 M (frazione C).

Sulle tre frazioni A, B e C è stato determinato il contenuto in azoto con il micro-Kjeldahl. Come si può rilevare dall'esame della tabella I, la maggiore quantità di azoto si trova nella frazione A, in cui è oscillante tra il 41,56 e il 53,70 %, a seconda della specie di Labride. Le frazioni B e C contengono rispettivamente delle quantità di azoto comprese tra il 25,60 ed il 29,62 % e tra il 10,98 ed il 24,70 %. La perdita, rispetto all'azoto totale della polvere di muscolo, oscilla tra il 5,13 ed il 9,64 %, a seconda del Labride preso in considerazione.

TABELLA I

	<i>Coris julis</i>		<i>Coris giofredi</i>		<i>Thalassoma pavo</i>	
	N mg/g	%	N mg/g	%	N mg/g	%
Sostanza muscolare secca	96,5	—	93,6	—	90,0	—
Frazione A	40,11	41,56	39,18	41,86	48,33	53,70
Frazione B	26,74	27,71	23,97	25,60	26,66	29,62
Frazione C	23,83	24,70	20,81	22,23	9,88	10,98
Perdita sul secco	5,82	6,03	9,64	10,29	5,13	5,70

ALLESTIMENTO DELLE PROVE DI IMMUNODIFFUSIONE. — Le prove di immunodiffusione sono state eseguite secondo la tecnica del micro-metodo di WADSWORTH (1962). In alternativa è stato adoperato il macro-metodo di OUCHTERLONY (1962).

Le varie frazioni antigene ottenute per estrazione della polvere di muscolo venivano saggiate sia con i sieri omologhi che con sieri ottenuti da conigli immunizzati con polvere di muscolo proveniente da altro Labride.

RISULTATI

Le prove di immunodiffusione, allestite fra le frazioni antigene *A*, *B* e *C* estratte da *Coris julis*, *Coris giofredi* e *Thalassoma pavo* ed i relativi sieri immuni, hanno dato luogo ad un numero variabile di strie di precipitazione, cinque con *Coris julis* e *Coris giofredi* e sei con *Thalassoma pavo*. Le reazioni crociate tra *Coris julis* e *Coris giofredi* hanno mostrato identità antigene dei due estratti. Archi di precipitazione assolutamente identici con totale fusione delle linee stesse sono stati osservati sia per le frazioni *A* (figg. 1 e 2) che *B* (fig. 3) e *C* (fig. 4) tanto con sieri immuni anti-*Coris julis* che anti-*Coris giofredi*.

Le prove crociate allestite tra le frazioni antigene *A* di *Coris julis*, *Coris giofredi* e *Thalassoma pavo* mostrano che tra quest'ultimo e l'estratto antigene relativo (omologo) si forma un netto arco di precipitazione riferibile ad un antigene assente sia in *Coris julis* che in *Coris giofredi*; tutti gli archi di precipitazione sono in comune con quelli ottenuti con le frazioni *A*

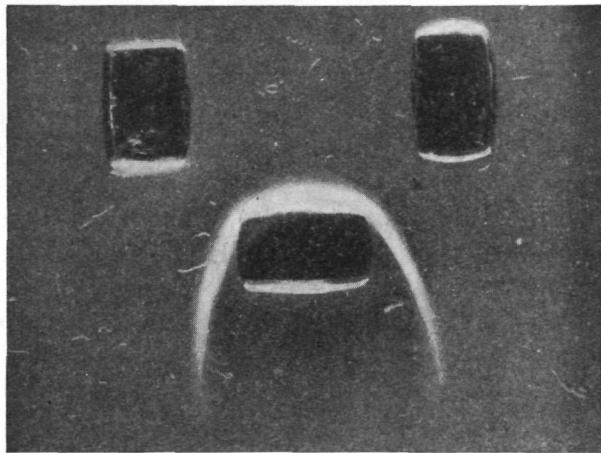


FIG. 1. — Nei pozzetti superiori: a sinistra frazione antigene *A* di *Coris giofredi*, a destra frazione antigene *A* di *Coris julis*; nel pozzetto inferiore siero anti-*Coris julis*. (macrometodo sec. Ouchterlony).

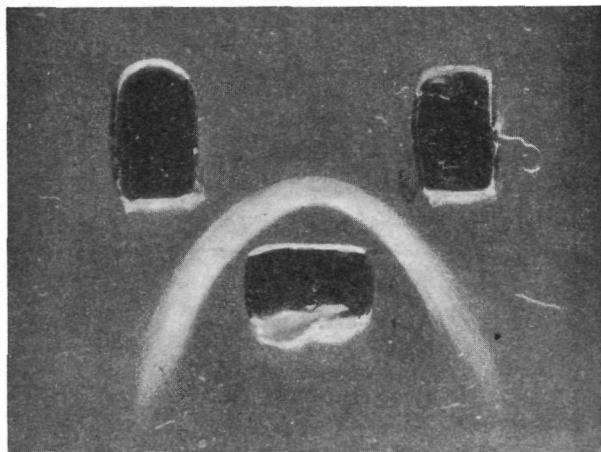


FIG. 2. — Nei pozzetti superiori: a sinistra frazione antigene *A* di *Coris giofredi*, a destra frazione antigene *A* di *Coris julis*, nel pozzetto inferiore siero anti-*Coris giofredi*. (macrometodo sec. Ouchterlony).

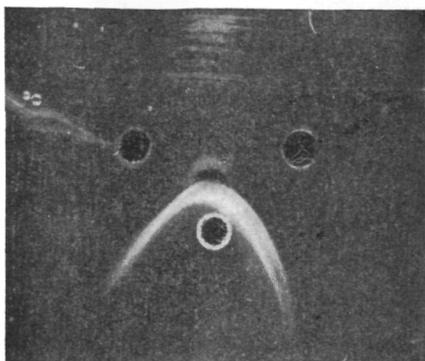


FIG. 3. — Nei pozzetti superiori: a sinistra frazione antigene B di *Coris julis*, a destra frazione antigene B di *Coris giofredi*; nel pozzetto inferiore siero anti-*Coris giofredi*. (micrometodo di Wadsworth)

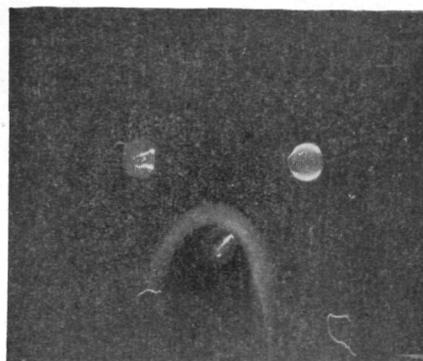


FIG. 4. — Nei pozzetti superiori: a sinistra frazione antigene C di *Coris julis*, a destra frazione antigene C di *Coris giofredi*; nel pozzetto inferiore siero anti-*Coris julis*. (micrometodo di Wadsworth).

delle altre due specie (figura 5). L'identità degli antigeni delle masse muscolari di *Coris julis* e *Coris giofredi* è stata confermata anche mediante immunoelettroforesi comparativa eseguita secondo la tecnica di WADSWORTH ed HANSON (1960), nonché mediante prove di assorbimento crociato effettuate trattando il siero anti-julis con antigene « giofredi » e rispettivamente siero anti-giofredi con antigene « julis ». In entrambi i casi l'assorbimento degli anticorpi è stato totale in quanto prove successive tra i sieri assorbiti ed i relativi antigeni non hanno dato luogo alla formazione di alcun precipitato.

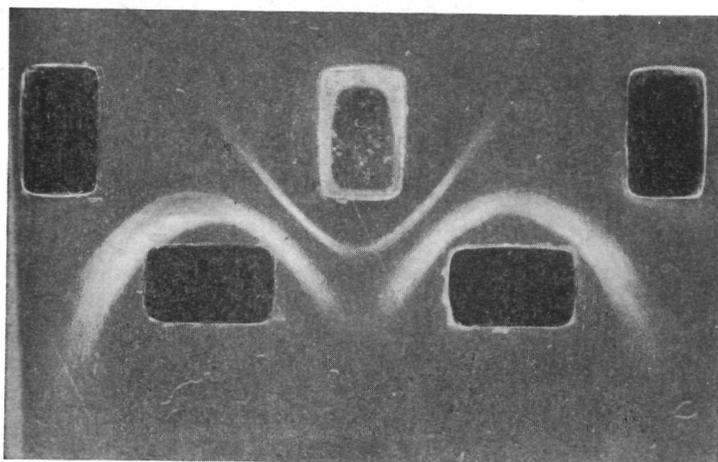


FIG. 5. — Nei pozzetti superiori: a sinistra frazione antigene A di *Coris giofredi*, al centro frazione antigene A di *Thalassoma pavo*, a destra frazione antigene A di *Coris julis*; nei pozzetti inferiori siero anti-*Thalassoma pavo*. (macrometodo di Ouchterlony).

La presenza di un antigene in *Thalassoma pavo* non reperibile in *Coris julis* nè in *Coris giofredi* è stata anch'essa confermata immunoelettroforeticamente. Inoltre, il siero anti-*Thalassoma pavo* assorbito con anti-

geni di *Coris julis* e *Coris giofredi* si presenta sempre un anticorpo residuo che dà luogo ad un arco di precipitazione allorché tale siero viene saggiato contro l'antigene omologo; lo stesso siero non dà alcuna stria contro antigeni di *Coris julis* e *Coris giofredi*.

Discussione e conclusioni

Base per la classificazione degli esseri viventi è la identificazione dei caratteri genetici e filogenetici intercorrenti fra due o più individui che permettono di considerarli simili. Ai metodi anatomorfologici, largamente impiegati per questa classificazione naturale, si sono da tempo affiancati i metodi sierologici, che consentono di appurare eventuali similitudini tra quei componenti essenziali dell'organismo vivente, soprattutto proteine, dotate di potere antigene. Le proteine, in particolare, sono notevolmente utili ai fini della classificazione poiché ciascuna specie animale o vegetale possiede delle proteine specifiche, differenti da quelle presenti in specie anche strettamente correlate (WALD 1952). Fanno eccezione a questa regola gli antigeni di organo, che possono essere comuni a specie differenti, soprattutto se appartenenti allo stesso genere o alla stessa famiglia.

Il maggior ostacolo nell'applicazione di alcuni metodi sierologici (della precipitazione in provetta in particolare) è rappresentato dalla difficoltà di poter discernere il grado di reattività crociata tra estratti antigeni provenienti da animali molto vicini nella scala zoologica. Un notevole vantaggio al fine del superamento della difficoltà suddetta può presentare l'uso delle reazioni di precipitazione in gel anziché in provetta. Tale tecnica consente di evidenziare tra un estratto antigene ed il relativo antisiero un numero di archi di precipitazione pari al numero di antigeni contenuti nell'estratto stesso. Nelle prove comparative, archi di precipitazione prodotti da antigeni uguali tenderanno a fondersi, mentre quelli derivanti da antigeni diversi si incroceranno vicendevolmente.

Nel nostro caso è evidente che la totale fusione degli archi di precipitazione che si verifica con gli antigeni di *Coris julis* e *Coris giofredi*, saggiati sia con sieri immuni per *Coris julis* che per *Coris giofredi*, parla a favore di una reale identità degli antigeni costituenti queste due forme.

Le prove di paragone allestite con gli antigeni muscolari di *Thalassoma pavo*, specie molto vicina a *Coris julis* e *Coris giofredi*, immunologicamente parlano per una netta diversità delle due specie, in quanto in *Thalassoma pavo* esiste un antigene assolutamente assente nei due *Coris*.

Ci si sarebbe aspettato un rovescio della medaglia nel senso cioè che *Coris julis* e *Coris giofredi* mostrassero un antigene proprio, specifico della specie, non presente in *Thalassoma pavo*. I mezzi sin qui messi in atto nel dispositivo sperimentale non hanno consentito mettere in evi-

denza questo ipotetico antigene di specie, ma nulla vieta di ammettere che in effetti il fenomeno possa essere in questi termini. Un eventuale antigene di specie potrebbe anche essere effettivamente presente, ma in quantità talmente esigua che il metodo adottato non ne abbia reso possibile l'evidenziazione. Per ora, in base alle ricerche fin qui condotte con le metodiche adoperate, immunodiffusione ed immunoelettroforesi, si può affermare che le masse muscolari di *Coris julis* e *Coris giofredi* presentano identità di struttura antigene fra di loro.

Pur con le riserve legate al fatto già rilevato della sensibile differenza dei titoli anticorpali ottenuti nei sieri di conigli immunizzati con gli antigeni muscolari rispettivamente di *Coris julis* e *Coris giofredi*, vogliamo qui rendere noto che le prove eseguite da PERNICE (1958) mediante reazione di fissazione del complemento, allestite con diluizioni a scacchiera dei sieri e degli antigeni, non avevano messo in evidenza differenze tra i due antigeni.

Gli estratti muscolari di *Thalassoma pavo*, mostrano rispetto a quelli di *Coris julis* e *Coris giofredi* un antigene nuovo che è senz'altro un antigene da riferire presumibilmente alla selezione filogenetica. I cinque antigeni estratti dalle masse muscolari posseduti in comune dai due *Coris* e da *Thalassoma pavo* sarebbero da riferire ad antigeni con specificità di organo, legati cioè a componenti proteici muscolari.

RIASSUNTO

È stata condotta una indagine sierologica a scopo sistematico per verificare la unicità o meno delle due specie appartenenti al genere *Coris* (*Coris julis* e *Coris giofredi*). È stata adoperata la precipitazione su gel di agar usando antigeni proteici estratti dalle masse muscolari. Le prove effettuate non hanno mostrato differenze che possono consentire di affermare che trattasi di due specie diverse.

RÉSUMÉ

Recherche sérologique entreprise dans le but de vérifier, du point de vue systématique, l'unicité ou non de deux espèces du genre *Coris* (*Coris julis* et *C. giorredi*). On s'est servi de la précipitation sur gel d'agar en utilisant les antigènes protéiques extraits des masses musculaires. Les preuves effectuées n'ont pas signalé de différences permettant d'affirmer qu'il s'agit de deux espèces différentes.

SUMMARY

Serological studies, consisting in a gel-diffusion test, were carried out to ascertain the eventual identity of two species belonging to the genus *Coris* (*Coris julis* and *Coris giofredi*). Protein antigens were extracted from the muscle. The test did not bring out any difference which would justify to consider them as two different species.

BIBLIOGRAFIA

- BACCI G. e RAZZAUTI A. (1957) Falso gonocorismo in «*Coris julis*» (L.) *R. C. Accad. Lincei*, 23, 181-189.
- CANESTRINI G. (1872) *Faune d'Italia, Pesci*. Vallardi, Milano.
- DAY F. (1880) *The fishes of Great Britain and Ireland*. London.
- FAGE L. (1918) Shore-Fishes (Macrorhamphosidae, Ammodytidae, Atherinidae ecc.). *Rep. Danish oceanogr. Exped. Médit.*, 2, 50.
- GOURRET P. (1893) Ichtyologie Marseillaise. Famille des Labroides. *Ann. Mus. H. N. Marseille*, 4, m. 3^a, 63.
- GUNTHER A. (1862) *Catalogue of Fishes in the British Museum*. 4, 195.
- GUNTHER A. (1880) *An introduction to the study of fishes*. Edinburgh.
- HELANDER E. (1957) Muscle-protein determination. *Acta physiol. scand. suppl.* 141.
- HOLT E. W. L. (1898) La Girelle royale et la Girelle de Giofredi doiventelles toutes deux être rapportées à l'espèce dimorphique *Coris julis* (L.). *Ann. Mus. H. N. Marseille Ser. 2, Bull. t. 1*.
- JOHNSON I. S. e LEONE C. A. (1955) The ontogeny of proteins of the adult chicken heart as revealed by serological techniques. *J. expl. Zool.* 130, 515.
- JORDAN D. S. (1891) A Review of the Labroid Fishes of America and Europa. *Rep. W.S. Comm. Fish.*, 1887.
- LEONE C. A. et WIENS A. L. (1956) Comparative serology of carnivores. *J. Mammal.* 37, 11.
- LO BIANCO S. (1909) Notizie biologiche riguardanti specialmente il periodo di maturità sessuale degli animali del Golfo di Napoli. *Mitt. Zool. Stat. Neapel* 19, 711.
- MOREAU E. (1881) *Histoire naturelle des poissons de la France*. 3, 141 Masson, Paris.
- OUCHTERLONY Ö. (1962) Diffusion in gel methods for immunological analysis II, *Progr. Allergy*, 6.
- PERNICE A. (1958) *Ricerche inedite*.
- RAFFAELE F. (1888) Le uova galleggianti e le larve dei Teleostei nel Golfo di Napoli. *Mitt. Zool. Stat. Neapel* 8, 20.
- REINBOTH R. (1957) Sur la sexualité du Téléostéen *Coris julis* (L.) *C. R. Acad. Sci., Paris*, 245, 1662.
- RISSE A. (1810) *Ichtyologie de Nice*. Ed. Haussman et D'Hautel, Paris.
- SARATO C. (1890) Notes ichtyologiques. *Gazette de Nice et des Alpes Maritimes* 4, 43.
- SMITT F. A. (1893) *A history of Scandinavian fishes*. Pt. 1, Stockolm.
- SPARTÀ A. (1933) Contributo alla conoscenza di uova e larve nei Labridi. Uova e larve di *Julis giofredi* Risso e *Julis pavo* ottenute da fecondazioni artificiali e stadi post-embrionali raccolti nel plancton. *Mem. Com. talassogr. ital.*, 203.
- SPARTÀ A. (1956) Labridae, Scaridae, Scorpaenidae. Uova e larve e stadi giovanili di Teleostei. *Fauna e Flora del golfo di Napoli*. Mon. 38, 584.

- STALLCUP W. B. (1954) Myology and serology of the avian family Fringillidae, a taxonomic study. *Publ. Mus. nat. Hist. Univ. Kans.*, 8, 157.
- STALLCUP W. B. (1961) Relationships of some families of the suborder Passeres (Songbirds) as indicated by comparisons of tissue proteins. *J. grad. Res. Center*, 29, 43.
- STEINDACHNER F. (1868) Ichtyologischen Bericht über eine nach Spanien und Portugal unternommene Reise *S. B. K. Akad. Wiss. Wien* 57, 701.
- TORTONESE E. e TROTTI L. (1949) Catalogo dei Pesci del Mar Ligure. *Atti Accad. Ligure*, 6, 94-95.
- WADSWORTH C. et HANSON L. A. (1960) Comparative analysis of immune electrophoretic precipitates employing a modified immune electrophoretic technique. *Int. Archs. Allergy appl. Immun.*, 17, 165.
- WADSWORTH C. (1962) A microplate technique employing a gel chamber compared with other micro- and macro-plate techniques for immunediffusion. *Int. Archs. Allergy appl. Immun.*, 21, 131.
- WALD G. (1952) Modern trends in physiology and biochemistry. Acad. Press N.Y.