

48. F. CARRANO e F. PALAZZO — Localizzazione precoce di alcuni enzimi nello sviluppo dell'uovo di *Tubifex rivulorum*. (*)

Riassunto. — Su uova in sviluppo di *Tubifex rivulorum* è stata condotta con metodi istochimici la ricerca della citocromossidasi, della succinodeidrogenasi e della benzidin-perossidasi. I primi due enzimi sono strettamente localizzati nel polplasma, il terzo è invece diffuso in tutto l'uovo ad eccezione delle zone polplasmatiche.

Nell'uovo centrifugato la citocromossidasi e la succino-deidrogenasi sono localizzati nello strato del polplasma; la benzidin-perossidasi invece negli strati del tuorlo e del plasma ialino.

Résumé. — Sur des oeufs en développement de *Tubifex rivulorum* on a fait, avec des méthodes histochimiques, la recherche de la cytochrome-oxydase, de la succinodéhydrogénase et de la benzidin-peroxydase. Les deux premières enzymes sont absolument localisées dans le polplasma, la troisième est au contraire diffusée dans tout l'oeuf à l'exception de la zone du polplasma.

Dans l'oeuf centrifugé la cytochrome-oxydase et la succinodéhydrogénase sont localisées dans la zone du polplasma; la benzidin-peroxydase au contraire dans les couches du vitellus et du plasma hyalin.

Summary. — The distribution of certain enzymes in the egg and embryo of *Tubifex rivulorum* has been studied by histochemical methods. Cytochrome-oxidase and succino-dehydrogenase are localized in the « polplasm », whereas benzidin-peroxidase is distributed in the whole egg, with exception of the polplasm.

In the centrifuged egg both cytochrome-oxidase and succino-dehydrogenase are localized in the layer of the polplasm; benzidin-peroxidase is present in the layers of yolk and of the hyaline plasm.

Zusammenfassung. — Auf Eiern der *Tubifex rivulorum* wurde mit histochemischen Methoden die Untersuchung der Cytochromoxydase der Succinodehydrogenase und der Benzidinperoxydase durchgeführt. Die ersten zwei Enzyme sind im Polplasma lokalisiert worden.

Das dritte ist im ganzen Ei festzustellen mit Ausnahme der polplasmatischen Eianteile. Im zentrifugierten Ei ist die Cytochromoxydase

(*) Ringraziamo il Prof. G. REVERBERI per avere diretto e consigliato le presenti ricerche.

und die Suxinodehydrogenase in der Polplasma-schicht festzustellen. Die Benzidinperoxydase ist hingegen in den Schichten des Dotters und des hyalinen Plasmas zu finden.

INTRODUZIONE

Le prime ricerche di topografia enzimologica embrionale precoce col metodo istochimico fanno capo al RIES (1937) ⁽¹⁾, a RANZI e FALKENHEIM (1937) ⁽²⁾, a REVERBERI e PITOTTI [1939 ⁽³⁾, 1940 ⁽⁴⁾], a LEHMANN (1941) ⁽⁵⁾, a PITOTTI (1947) ⁽⁶⁾, a SPIRITO (1938) ⁽⁷⁾, a RAVEN (1946) ⁽⁸⁾: molte di queste determinazioni non hanno ricevuto sufficiente attenzione in bibliografia, anche perchè la identificazione più precisa di alcuni enzimi e il meccanismo della loro funzione sono cose messe in chiaro solo negli ultimi anni.

Rapporti tra segregazione precoce di alcuni enzimi e differenzamento embrionale, furono avanzate già dal RIES (1937), e poi da RANZI (1938) ⁽⁹⁾ e da REVERBERI e PITOTTI [1939 ⁽³⁾, 1940 ⁽⁴⁾]. RIES suppose che la differenza tra uova a mosaico e uova regolative, cioè a determinazione precoce e a determinazione tardiva, dipendesse appunto dalla segregazione precoce o tardiva di determinate sostanze o enzimi e dalla loro localizzazione o meno: ma questo concetto non potè raffermarsi quando l'analisi fu estesa a un materiale più vasto. E tuttavia il fatto della localizzazione di alcuni materiali enzimatici in alcuni blastomeri dell'uovo ai primi stadi deve avere un qualche significato, almeno fisiologico. Oggi si può affrontare con minori incertezze il problema: il grande sviluppo della chimica dei fermenti ha fatto conoscere il meccanismo di azione di alcuni di essi e numerose sostanze che attivano o bloccano la loro attività: è possibile, forse, per questa strada venire a intendere la funzione riservata agli enzimi nello sviluppo.

L'uovo di *Tubifex* è un uovo a segmentazione determinata: si può predire fin dai primissimi stadi il destino dei singoli blastomeri; inoltre esso possiede una sostanza, chimicamente ancora non definita e forse eterogenea, il cosiddetto « polplasma », al quale gli esperimenti hanno attribuito una certa importanza organo-formativa. Inoltre, è un uovo che si sviluppa in condizioni ecologiche molto singolari; certo molto diverse da quelle che si verificano per le uova di Ctenofori o per le uova di alcune Ascidie, che sono galleggianti, e che hanno grande bisogno di ossigeno; l'uovo di *Tubifex* è, invece, deposto nel fango e

in condizioni di scarsissima ossigenazione. Uno studio comparativo della distribuzione di certe sorta di enzimi, p. e. ossidanti, in uova che si sviluppino in condizioni quanto mai diverse ecologicamente, potrebbe portare luce sull'importanza degli enzimi in rapporto con l'embriogenesi.

Ottime ricerche sulla distribuzione della indofenol-ossidasi nell'uovo di *Tubifex* sono quelle di LEHMANN: ricerche che possono definirsi « pioniere ». LEHMANN trovò che l'enzima è localizzato strettamente già nell'uovo indiviso, e che la sua localizzazione coincide con quella del « polplasma »: esso si ritrova, a stadi più avanzati nella 2d e poi nella 4d, da cui hanno origine le bande ecto-mesodermali dell'embrione.

Nel presente lavoro le ricerche di LEHMANN sono state riprese: ed oltre la distribuzione della indofenol-ossidasi (=citocromossidasi) è stata presa in considerazione la distribuzione della benzidin-perossidasi e della succino- deidrogenasi. I metodi seguiti furono sempre quelli istochimici.

CENNI SULLO SVILUPPO DELL'UOVO DI TUBIFEX.

La segmentazione, studiata ampiamente da PENNERS (1922) ⁽¹⁰⁾, è spirale, aritmica, e disuguale.

Si riportano in breve le linee generali dello sviluppo di tale uovo.

L'uovo insegmentato, di 0,3-0,5 mm. di diametro, presenta granuli di vitello distribuiti piuttosto uniformemente. Dopo l'emissione dei corpuscoli polari avvengono rimaneggiamenti dei plasmi che portano alla localizzazione di due cappe protoplasmatiche: di forma circolare al polo animale, e di disco irregolare al polo vegetativo.

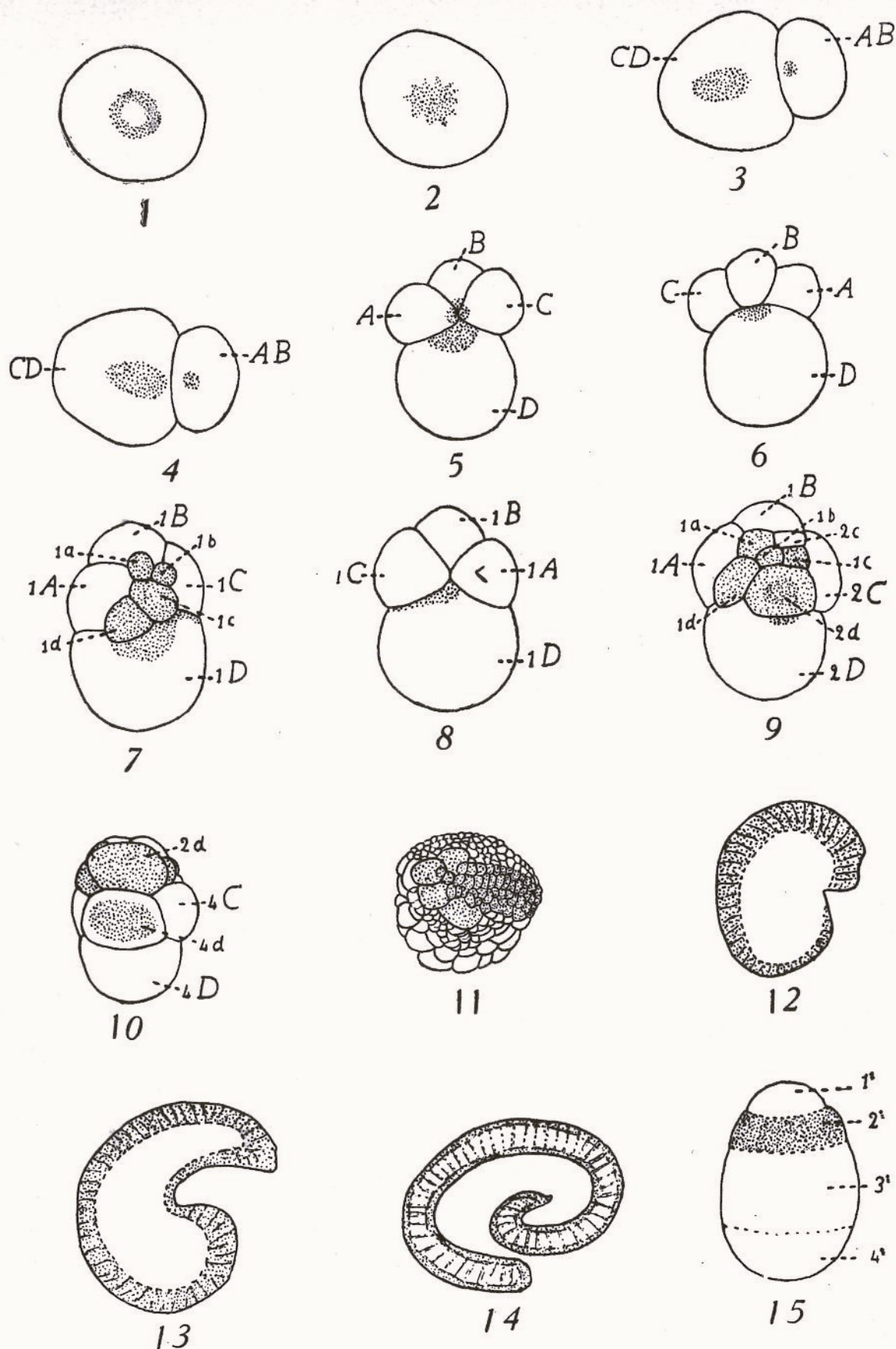
Il primo solco di divisione è molto irregolare e divide l'uovo in due blastomeri AB e CD. I plasmi polari vanno a finire sempre nel blastomero CD; a volte una piccola parte di tale plasma può interessare anche il blastomero AB.

Allo stadio di quattro blastomeri (A-B-C-D) il materiale polare si rinviene quasi tutto nel blastomero D.

Con la terza segmentazione si formano quattro macromeri (1A-1B-1C-1D) all'emisfero vegetativo e quattro micromeri (1a-1b-1c-1d) all'emisfero animale: questi ultimi, di natura plasmatica, ruotati in senso destrorso rispetto ai macromeri.

In seguito la 1D si divide e dà origine alla 2D e 2d. Quest'ultima è il I° somatoblasto, ricco di polplasma. Subito dopo si dividono anche la 1C, la 1B e la 1A rispettivamente in 2C 2c, 2B 2b, 2A 2a.

Nelle successive segmentazioni da 2D, 2C, 2B, 2A si formano il III° (3d-3c-3b-3a) ed il IV° microquartetto (4d-4c-4b-4a). La cellula 4d è il II° somatoblasto e contiene il resto del polplasma.



Tav. 4. - Nadi-ossidasi (= citocromossidasi): punteggiata la zona di reazione.

Fig. 1. - Uovo insegmentato, visto dal polo animale. Fig. 2. - Uovo insegmentato visto dal polo vegetativo. Fig. 3. - Stadio II visto dal polo animale. Fig. 4. - Stadio II visto dal polo vegetativo. Fig. 5. - Stadio IV visto dal polo animale. Fig. 6. - Stadio IV visto dal polo vegetativo. Fig. 7. - Stadio VIII visto dal polo animale. Fig. 8. - Stadio VIII visto dal polo vegetativo. Fig. 9. - Stadio X visto dal polo animale. Fig. 10. - Stadio XXIV visto dal polo animale. Fig. 11. - Stadio delle strisce germinali, visto di lato. Figg. 12, 13, 14 - Larva sempre più avanzata. Fig. 15. - Uovo centrifugato. 1° grasso, 2° polplasma, 3° tuorlo, 4° zona chiara.

I micromeri 4c-4b-4a contengono tuorlo a differenza degli altri micromeri di natura plasmatica.

La cellula 2d nelle successive divisioni dà origine al teloblasto (Tr e Tl). Contemporaneamente la 4d dà Myr e Myl che costituiscono le bande mesodermali del germe, le quali, spinte durante la gastrulazione nell'interno del germe, si collocano a destra e a sinistra sotto il gruppo teloblastico.

Le due strisce del germe sono date ciascuna da serie di cellule originatesi per proliferazione della cellula mesodermica (Myr o Myl) e dei derivati del teloblasto: neuroblasto e tre mioblasti secondari.

Successivamente le strisce del germe si allungano, girano in senso antero-posteriore e vengono a contatto lungo la linea ventrale, prima anteriormente e poi posteriormente; con l'ulteriore differenziamento il germe acquista la forma di verme incurvato dorsalmente e all'estremità anteriore presenta il tratto esofageo.

A) G-NADI-OSSIDASI (CITOCROMOSSIDASI).

E' stata usata la G-nadi-reazione: le uova, a diversi stadi di sviluppo, sono state poste in una soluzione di dimetil-p-fenilendiamina 1% ed α -naftolo 1%; a quest'ultimo erano aggiunte poche gocce di idrato sodico al 25%.

Nei controlli, la reazione è stata fatta in presenza di NaN_3 , inibitore della citocromossidasi.

In queste uova la reazione è stata sempre negativa.

I risultati confermano quanto ottenuto da LEHMANN (1941).

Nell'uovo fecondato e indiviso la colorazione appare strettamente localizzata ai poli animale e vegetativo in corrispondenza del polplasma. (Tav. I Figg. 1-2). Allo stadio II la reazione è positiva nella porzione del blastomero CD in cui è presente il polplasma; quando, durante la segmentazione, porzione del polplasma va in AB, la reazione è presente anche in esso (Figg. 3-4). Allo stadio IV è ancora nel blastomero D e in piccole aree di A, B, C (Figg. 5-6). Allo stadio VIII è sempre nella D e inoltre nei micromeri (Figg. 7-8). La colorazione del bleu di indofenolo è, allo stadio X, nella cellula 2d (1° somatoblasto) nella 2D e nei micromeri: 1a, 1b, 1d (Fig. 9).

All'epoca in cui si forma il quarto microquartetto la reazione si localizza nella 4d (II° somatoblasto), nella 2d e nei micromeri a contatto (Fig. 10). Quando si formano le bande del germe sono proprio esse che prendono la colorazione del bleu di indofenolo, (Fig. 11) e negli stadi successivi i loro derivati (Figg. 12-13).

Nella larva appaiono colorati il sistema nervoso e la muscolatura circolare e longitudinale: la colorazione è più intensa nelle regioni anteriore e posteriore (Fig. 14).

La reazione è stata eseguita anche su uova centrifugate.

PARSEVAL (1922) ⁽¹¹⁾, centrifugando l'uovo di *Tubifex* ha visto che il materiale ovulare si stratifica in quattro zone: 1) grasso, 2) polplasma, 3) tuorlo, 4) zona chiara.

In queste uova la reazione si localizza nella seconda zona: nel polplasma (Tav. I Fig. 15).

B) BENZIDIN-PEROSSIDASI.

La reazione istochimica della benzidin-perossidasi è stata eseguita su germi in tutti gli stadi di sviluppo: dall'uovo insegmentato fino allo stadio di larva.

Le uova furono poste in una soluzione acquosa satura di benzidina alla quale si aggiunsero poche gocce di acqua ossigenata.

La reazione (Tav. II) suggerisce che il fermento è diffuso pressochè uniformemente in tutto l'uovo fatta eccezione delle zone polplasmatiche occupate dalla citocromossidasi.

Nelle uova centrifugate la reazione è positiva solo nel III e IV strato: tuorlo e plasma (Tav. II Fig. 15): assente nella zona che dà la reazione dell'indofenolo.

C) SUCCINODEIDROGENASI.

La ricerca della succinodeidrogenasi è stata fatta usando la tecnica di SELIGMAN e RUTENBUR (1951) ⁽¹²⁾.

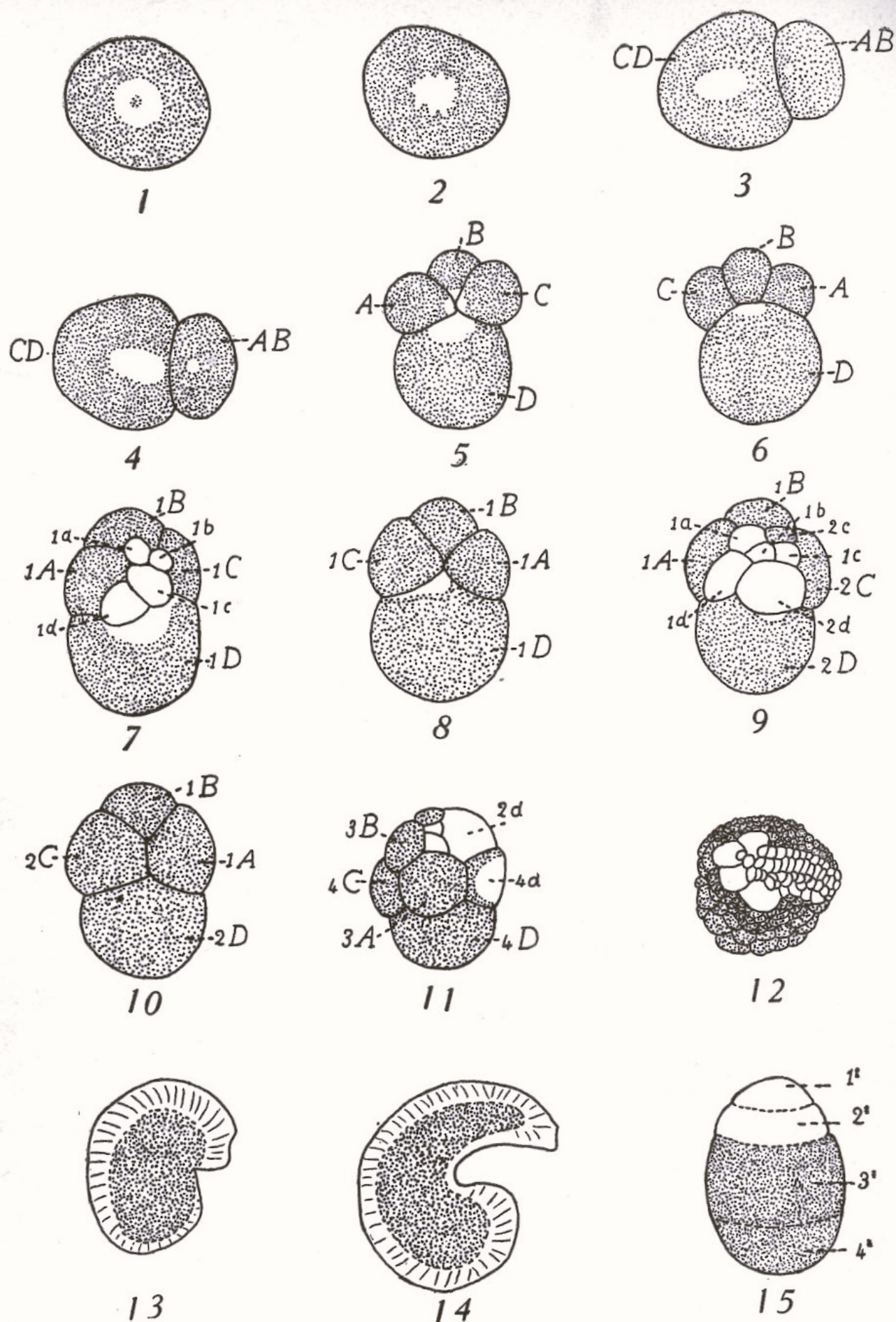
Si pongono le uova in una soluzione costituita per il 50% da trifeniltetrazolio 1% e per il 50% da succinato di Na 1%.

Il trifeniltetrazolio funge da accettore d'idrogeno trasformandosi in formazan. Il formazan è colorato in rosso mentre il trifenil-tetrazolio è giallo pallido. La colorazione rossa, dunque, indica la presenza dell'enzima.

Come controlli furono usate uova cui non fu aggiunto il substrato (succinato di Na). In essi non si è mai avuta comparsa di formazan, cioè colorazione rossa.

La reazione della succinodeidrogenasi nelle uova di *Tubifex* è strettamente localizzata: essa si sovrappone perfettamente alla reazione della citocromossidasi: si compie, cioè, nella zona del polplasma.

Nell'uovo insegmentato la reazione è strettamente localizzata ai



Tav. 2. - Benzidin-perossidasi: punteggiata la zona di reazione.

Fig. 1. - Uovo insegmentato visto dal polo animale. Fig. 2. - Uovo insegmentato visto dal polo vegetativo. Fig. 3. - Stadio II, visto dal polo animale. Fig. 4. - Stadio II visto dal polo vegetativo. Fig. 5. - Stadio IV visto dal polo animale. Fig. 6. - Stadio IV visto dal polo vegetativo. Fig. 7. - Stadio VIII visto dal polo animale. Fig. 8. - Stadio VIII visto dal polo vegetativo. Fig. 9. - Stadio X visto dal polo animale. Fig. 10. - Stadio X visto dal polo vegetativo. Fig. 11. - Stadio XXIV visto di lato. Fig. 12. - Stadio delle striscie germinali, visto di lato. Figg. 13, 14 - Larva sempre più avanzata. Fig. 15. - Uovo centrifugato.

due poli. Allo stadio II è positiva nel blastomero CD e come nel caso della citocromossidasi, alcune volte può anche interessare zone limitate del blastomero AB. Allo stadio IV è il blastomero D che svela la presenza della succinodeidrogenasi; anche piccole aree dei blastomeri A-B-C presentano la reazione. Allo stadio VIII la reazione interessa il blastomero D e i micromeri.

Allo stadio X la cellula 2d (I somatoblasto) la 2D e i micromeri (1a, 1b, 1c, 1d) presentano reazione positiva.

Proseguendo lo sviluppo la reazione interessa la 4d, la 2d e i micromeri a contatto.

Nella larva sono colorate le strisce germinali (cfr. Tav. I).

DISCUSSIONE

Con le reazioni istochimiche sopra riportate è possibile mettere in evidenza nell'uovo di *Tubifex* la distribuzione di tre sorta diverse di enzimi: la citocromossidasi, la succinodeidrogenasi e la benzidin-perossidasi. I primi due enzimi presentano una distribuzione estremamente localizzata; il terzo enzima invece è diffuso uniformemente in quasi tutto l'uovo: esso è assente solo nelle zone occupate dalla citocromossidasi e dalla succinodeidrogenasi. D'altra parte questi due enzimi presentano la stessa localizzazione: ciò non può recare alcuna sorpresa perchè è ben noto che ambedue gli enzimi sono situati nei mitocondri. Nel caso particolare di *Tubifex*, secondo le ricerche di LEHMANN (1954) ⁽¹³⁾, il polplasma, in cui avvengono le reazioni dell'indofenolo e del formazan, è ricco in mitocondri.

La benzidin-perossidasi nell'uovo di *Tubifex* non ha alcuna connessione con la zona a mitocondri: si comporta, invece, come un enzima « ubiquitario » (HOLTER 1949) ⁽¹⁴⁾: in altri casi [Ascidie, RIES 1937 ⁽¹⁾; REVERBERI e PITOTTI 1939 ⁽³⁾, 1940 ⁽⁴⁾; MANCUSO 1952 ⁽¹⁵⁾] invece, si comporta come un enzima strettamente localizzato e connesso con il plasma a mitocondri (semiluna gialla dell'uovo di Ascidie).

La localizzazione della citocromossidasi e della succinodeidrogenasi nel polplasma, di cui segue esattamente il destino lungo tutto il cell-lineage, presenta un interesse particolare in connessione col problema del significato della localizzazione degli enzimi.

E', infatti, noto, da numerose esperienze che il polplasma condiziona con la sua presenza la formazione di un embrione normale. Le qualità formative così singolari del polplasma sarebbero, allora, dovute agli enzimi che possiede? Il problema della determinazione e della morfogenesi assumerebbe nel caso positivo caratteristiche notevoli. Ma pro-

tabilmente la citocromossidasi e la succinodeidrogenasi nei somatoblasti dell'uovo di *Tubifex* non hanno funzione organoformativa: i dati biochimici suggeriscono che questi due fermenti sono impegnati nei cicli energetici ossidativi e che portano a compimento le reazioni attraverso le quali l'energia è liberata e utilizzata. Embriologicamente, tuttavia, il problema è aperto, e non è irrisolvibile dato che conosciamo diversi inibitori specifici che possono essere utilmente impiegati.

E' appunto su questa via che sono orientate le nostre ulteriori ricerche.

CONCLUSIONI

1) Sono state studiate, con metodi istochimici, le localizzazioni della G-Nadi-ossidasi (=citocromossidasi), della benzidin-perossidasi e della succinodeidrogenasi nell'uovo di *Tubifex rivulorum* a diversi stadi di sviluppo.

2) La G-Nadi-ossidasi (= citocromossidasi) e la succinodeidrogenasi sono presenti in tutti gli stadi, e sono localizzate in corrispondenza del polplasma.

3) La benzidin-perossidasi è diffusa uniformemente in quasi tutto l'uovo ad eccezione delle zone occupate dal polplasma.

4) Nell'uovo centrifugato la G-Nadi-ossidasi (= citocromossidasi) e la succinodeidrogenasi sono localizzate nella seconda zona: nel polplasma; la benzidin-perossidasi, invece, si trova nel III e IV strato: tuorlo e plasma.

Palermo — Istituto di Zoologia dell'Università, e Roma — Istituto Superiore di Sanità.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) RIES E. - Pubbl. Staz. Zool. Napoli, 16: 363 (1937).
- (²) RANZI S. e FALKENHEIM M. - Pubbl. Staz. Zool. Napoli, 16: 436 (1937).
- (³) REVERBERI G. e PITOTTI M. - Comm. Pont. Ac. Sci., 3: 469 (1939).
- (⁴) REVERBERI G. e PITOTTI M. - Pubbl. Staz. Zool. Napoli, 18: 250 (1940).
- (⁵) LEHMANN F. E. - Naturwiss., 29: 404 (1941).
- (⁶) PITOTTI M. - Pubbl. Staz. Zool. Napoli, 21: 93 (1947).
- (⁷) SPIRITO A. - Ric. Scient., 4: 297 (1938).
- (⁸) RAVEN CHR. P. - Arch. Néerl. Zool., 7: 496 (1946).
- (⁹) RANZI S. - Boll. Soc. It. Biol. Sp., 26: 120 (1938).
- (¹⁰) PENNERS A. - Zool. Jahrb. Anat., 43: 323 (1922).
- (¹¹) PARSEVAL M. v. - Roux Arch., 50: (1922).
- (¹²) SELIGMAN F. E. e RUTENBUR A. M. - Science, 113: 317 (1951).
- (¹³) LEHMANN F. E. - Nature, 173: 517 (1954).
- (¹⁴) HOLTER H. - Pubbl. Staz. Zool. Napoli, 21: 60 (1949).
- (¹⁵) MANCUSO V. - Rend. Ist. Sup. Sanità, 15: 263 (1952).