

28. Vincenzo MANCUSO. — Ricerche di topografia chimica nell'uovo di Gasteropodi Polmonati (\*).

**Riassunto.** — Su uova di *Physa rivularis Ph.* è stata condotta con metodi istochimici la ricerca della M-nadi-ossidasi, benzidin-perossidasi, dei lipidi e del glicogeno.

Per ciò che concerne i due fermenti considerati la loro presenza ha potuto accertarsi solo per gli stadi avanzati dello sviluppo: essi risultano localizzati in corrispondenza del bordo della ghiandola della conchiglia.

Lipidi e glicogeno sono presenti in corrispondenza della parte vegetativa dell'uovo.

**Résumé.** — Avec des méthodes histo-chimiques, on a fait, sur des oeufs de *Physa rivularis Ph.*, la recherche de la M-nadi-oxydase, benzinperoxydase, des lipides et du glycogène.

En ce qui concerne les deux ferments considérés, leur présence n'a pu être révélée que dans les phases avancées du développement: ils se trouvent localisés sur les bords de la glande de la coquille.

Lipides et glycogène se trouvent dans la partie végétative de l'oeuf.

**Summary.** — Studies on M-nadi-oxidase, benzidine-peroxidase, lipids and glycogen have been made with the aid of histo-chemical methods on the *Physa rivularis Ph.* eggs. As far as the two ferments under consideration were concerned, their presence could only be detected in advanced stages of development; they are found localised on the edges of the gland of the shell.

Lipids and glycogens are present in the vegetative part of the egg.

**Zusammenfassung.** — Mit histochemischen Methoden wurden am Ei von *Physa rivularis Ph.* die Untersuchung auf M-nadi-oxydase, Benzin-Peroxydase, auf Lipide und Glykogen durchgeführt.

Was die beiden in Frage stehenden Fermente anbetrifft, so hat ihre Anwesenheit nur für die vorgeschritteneren Entwicklungsstadien sichergestellt werden können: es ergab sich, dass sie am Rande der Drüse der Muschel lokalisiert sind.

Lipide und Glykogen finden sich im vegetativen Teil des Eies.

---

(\*) Ringrazio il Prof. Reverberi per aver diretto e consigliato le presenti ricerche.

## INTRODUZIONE

Sulla embriologia chimica dei Gasteropodi Polmonati possediamo conoscenze assai limitate. Le uniche ricerche riguardano le uova di *Limnaea* e sono state fatte da RAVEN (1945, 1946); più recentemente ha portato qualche contributo MINGANTI (1950).

Pubblico qui alcune ricerche sulla distribuzione della M-nadi-ossidasi, perossidasi, lipidi, glicogeno nelle uova di *Physa rivularis Ph.*

### 1) SVILUPPO.

I primi stadi di sviluppo di uova appartenenti a specie diverse del genere *Physa* sono stadi descritti da tempo da BROOKS (1879), FOL (1879), WIERZEJSKI (1905) e CONKLIN (1910). Sostanzialmente, le descrizioni fatte valgono pure per *Physa rivularis Ph.*

Riporterò qui in succinto, lo sviluppo di questo Gasteropodo, rimandando agli AA. sopra citati per notizie più dettagliate.

La prima segmentazione dà due blastomeri perfettamente uguali: appena formati essi si allontanano restando uniti soltanto mediante un sottile ponte. Ben presto però i due blastomeri si avvicinano e si costituisce tra loro la « cavità di segmentazione » il cui volume va gradatamente aumentando (Fig. 1, A). Variazioni di volume accompagnano tutte le successive segmentazioni: ogni volta che l'uovo si prepara a dividersi esso si riduce in volume, contemporaneamente diviene più opaco: ciò avviene per espulsione del liquido contenuto nella cavità di segmentazione; avvenuta la segmentazione il volume torna gradatamente ad aumentare per nuova formazione di liquido nella cavità di segmentazione e tutto l'uovo diviene più trasparente.

Il secondo solco di segmentazione, meridiano ed ortogonale al primo, dà i quattro blastomeri: A, B, C, D che sono sferici e di uguale grandezza: essi, in un primo tempo, giacciono su uno stesso piano: successivamente due blastomeri ruotano sugli altri due in senso opposto (Fig. 1, B). La cavità di segmentazione che durante la formazione del secondo solco si era ridotta, riprende ora gradatamente la sua ampiezza.

In prossimità della terza segmentazione il germe riduce di nuovo il suo volume, diviene opaco, e i blastomeri che lo costituiscono, dopo aver assunta una forma ovoidale, si dispongono secondo una spirale sinistrorsa (Fig. 1, C). 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: quest'ultimi girati in senso antiorario rispetto ai macromeri (Fig. 1, D). Avvenuta la terza segmentazione il volume totale del germe torna ad aumentare: la cavità di segmentazione torna gradatamente alla sua ampiezza; tutto il germe diviene più trasparente.

Anche l'approssimarsi della quarta segmentazione è preannunciata dalla riduzione graduale del volume del germe che diviene più opaco: intanto i macromeri assumono una forma ovoidale con l'asse maggiore inclinato verso sinistra: i blastomeri vengono così a descrivere una spirale destrorsa. La quarta segmentazione cade molto prima nei macromeri: da questi si ottengono i blastomeri 2a, 2b, 2c, 2d che sono spostati in senso orario rispetto a quelli di origine che si denominano ora 2A, 2B, 2C, 2D; si ha così uno stadio di dodici cellule (Fig. 1, E). Si dividono successivamente anche i micromeri: tale divisione è destrorsa.

Le successive segmentazioni si alternano ora sinistrorse ora destorse; si passa così alla blastula nella quale la differenza tra i blastomeri dell'emisfero animale e quelli dell'emisfero vegetale è piuttosto piccola. Nella gastrulazione si invaginano tutti i blastomeri dell'emisfero vegetale e si costituisce così il foglietto interno. Contemporaneamente ai processi di gastrulazione, nella parte opposta al blastoporo, si differenziano delle cellule trasparenti che secernono un liquido ialino la cui quantità aumenta in seguito gradualmente (FOL, 1879). Questo liquido si interpone dapprima tra cellula e cellula secretrice in spazi lenticolari da esse delimitati, successivamente, estendendosi anche alla base delle cellule, si forma una unica cavità: il seno nucale. Man mano che questa differenziazione procede, quella che sarà la parte opposta dell'embrione si accresce più rapidamente; tale sviluppo determina lo spostamento del blastoporo verso quella che sarà la parte anteriore, dove il blastoporo diverrà la bocca definitiva. A gastrulazione ultimata si ha una piccola larva, la *trocofora* (Fig. 1, F) caratterizzata dal velum, che dallo stomodeo si estende alle parti latero-dorsali, e che anteriormente si continua nella piastra apicale. Nella parte opposta allo stomodeo compare una piccola invaginazione, la ghiandola della conchiglia. All'interno intanto si rende evidente l'abbozzo dell'intestino, che, a questo stadio, si presenta come un piccolo cordone cellulare che va dalla parte anteriore alla ghiandola della conchiglia; la parte anteriore di tale abbozzo è circondata da piccole cellule: le cellule dell'albumen. Da questo stadio il volume del germe comincia ad aumentare e già la *trocofora avanzata* possiede un volume quasi doppio della giovane trocofora. Man mano che il volume aumenta tutto il germe si schiarisce sempre più. In seguito si ha ulteriore sviluppo del velum; si abbozza il piede; la ghiandola della

conchiglia secerne una sostanza birifrangente; la radula è ben differenziata con dentini visibili; le cellule dell'albumine si sono ulteriormente sviluppate ed avvolgono l'intestino che anch'esso si è ulteriormente differenziato: dalla bocca si parte l'esofago che anteriormente comunica con la tasca della radula e posteriormente immette nella cavità dello stomaco; attaccata alla superficie interna sinistra di quest'ultimo si nota

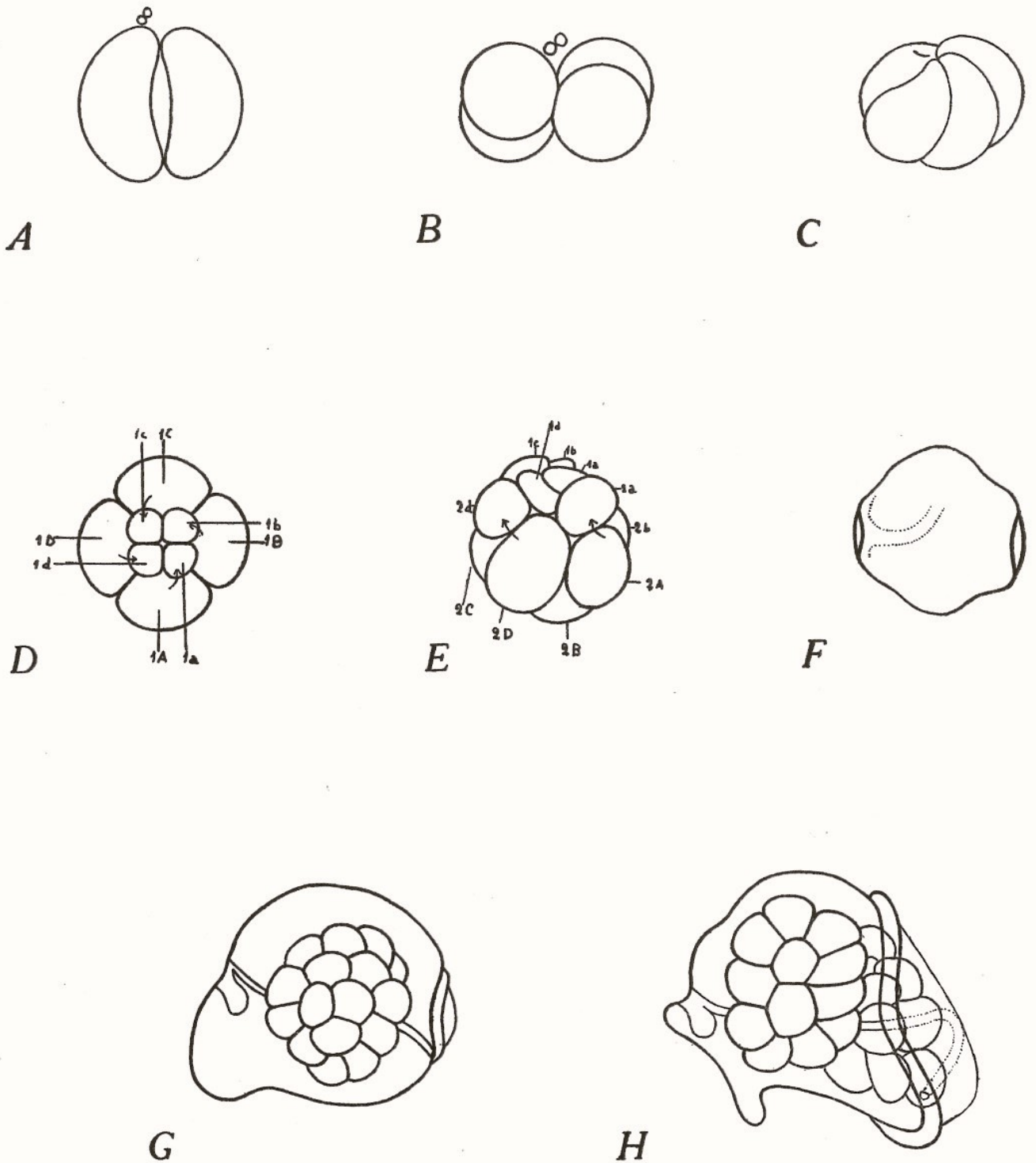


Fig. 1. — Sviluppo normale dell'uovo di *Physa rivularis* Ph. (vedi testo).

una piccola evaginazione che rappresenta l'abbozzo dell'epatopancreas; dallo stomaco si parte il retto, spostato leggermente verso sinistra e che termina con l'ano che si apre sulla parte sinistra del bordo del mantello.

Nello stadio di « *ippo* » (cfr. RAVEN 1946) (Fig. 1, H) la forma dello embrione è più vicina a quella dell'adulto, con organi e tessuti ben innanzi nei processi di differenziazione.

Sulla velocità di sviluppo dell'uovo di *Physa rivularis Ph.*, la temperatura esercita una profonda influenza; a 28°C la prima segmentazione si ha dopo 60' dalla deposizione; dopo 150', invece, alla temperatura di 16°C. A temperatura intorno ai 5°C la velocità di sviluppo è quasi nulla. Uova a stadi precoci fatte sviluppare a tale temperatura, vanno incontro a processi di alterazione e soltanto in piccola percentuale superano la gastrulazione, dando larve fortemente anomale. Uova invece, poste a tale temperatura dopo avere superato la gastrulazione, presentano in alta percentuale uno sviluppo normale sebbene molto rallentato.

Nei disegni gli embrioni sono stati orientati con la testa in alto e con la parte posteriore rivolta verso l'osservatore; la destra e la sinistra dell'embrione corrispondono alla destra e alla sinistra dell'osservatore.

## 2) REAZIONI ISTOCHIMICHE.

### A) *Benzidin-perossidasi.*

E' stata usata la nota tecnica della benzidina: le uova, fissate in formalina neutra 5%, venivano poste in una soluzione acquosa satura di benzidina alla quale si aggiungevano poche gocce di acqua ossigenata.

La reazione è stata portata dapprima su uova insegmentate, a II, IV, VIII blastomeri, gastrule a diversi stadi e trocofore giovani. La reazione in tutti questi stadi è risultata costantemente negativa. Solo nella trocofora avanzata si nota una limitata reazione positiva sul bordo della ghiandola della conchiglia. Questa reazione si conserva positiva nello stesso posto anche negli stadi di *veliger* e di *ippo*: in questi stadi la reazione è più marcata nel bordo sinistro della ghiandola.

### B) *M-nadi-ossidasi.*

E' stata usata la M-nadi-reazione: le uova, fissate in acetone a diversi stadi di sviluppo, erano poste in una soluzione costituita da parti uguali di p-fenilendiammina 0,1% e  $\alpha$ -naftolo 0,1%; a quest'ultimo

erano state aggiunte in precedenza poche gocce di idrato di sodio al 25 per cento.

I risultati ottenuti per la M-nadi ossidasi coincidono con quelli ottenuti per le perossidasi: in stadi precoci e fino a trocofora giovane la reazione è negativa. Le *trocofore avanzate* presentano invece, reazione positiva: questa è limitata al bordo della ghiandola della conchiglia. Anche nel *veliger* la reazione è strettamente limitata in tale territorio; lungo la circonferenza di tale territorio la reazione non ha uguale intensità: è più intensa a sinistra, meno intensa a destra. Anche nell'*ippo* giovane è il solo bordo della ghiandola della conchiglia che presenta una reazione elettiva; la reazione è più intensa nella parte sinistra di tale bordo.

### C) Glicogeno.

E' stata usata la tecnica di Bauer (cfr. GLICK, 1949). Le uova furono fissate in Bouin-Allen, o nel fissativo alcool-formolico previa saturazione dell'alcool con acido picrico, o in acido cromico 4%. Nei controlli il glicogeno veniva idrolizzato con amilasi salivare.

Nell'uovo che ha emesso il primo globulo polare la reazione è positiva in circa tre quarti dell'uovo, restando esclusa la porzione superiore dell'emisfero animale: essa è localizzata in granuli che appaiono colorati intensamente in rosso violetto. Nell'uovo che ha emesso il secondo globulo polare la reazione è presente in un terzo circa dell'uovo, e precisamente in un'ampia calotta al polo vegetativo (Fig. 2, A).

La stessa localizzazione si nota nell'uovo dello stadio II (Fig. 2, B) e dello stadio IV (Fig. 2, C): soltanto le calotte vegetali dei singoli blastomeri presentano grossi granuli intensamente colorati. Allo stadio VIII (Fig. 2, D) i granuli di glicogeno sono presenti solo nei macromeri e più precisamente al polo vegetativo. Nello stadio XII il glicogeno è distribuito in massima parte nei quattro macromeri, in minor parte anche nei micromeri 2a, 2b, 2c, 2d: i micromeri del polo animale risultano invece totalmente privi di granuli colorati. Nella *gastrula* la reazione è limitata solo al foglietto interno. Nelle *trocofore* la reazione è positiva nella massa delle cellule che circondano l'abbozzo dell'intestino e in alcune piccole cellule molto trasparenti poste tra lo stomodeo e l'abbozzo dell'intestino; è altresì positiva nel velum. Nello stadio di *veliger* (Fig. 2, E) la reazione del glicogeno risulta positiva per le grosse cellule dell'albume, per il foglietto interno dello stomaco, per l'abbozzo dell'epatopancreas e per il velum. Nell'*ippo* giovane la reazione è ancora presente nelle cellule dell'albume, nella parete interna dello stomaco, nell'abbozzo dell'epatopancreas e nel velum.

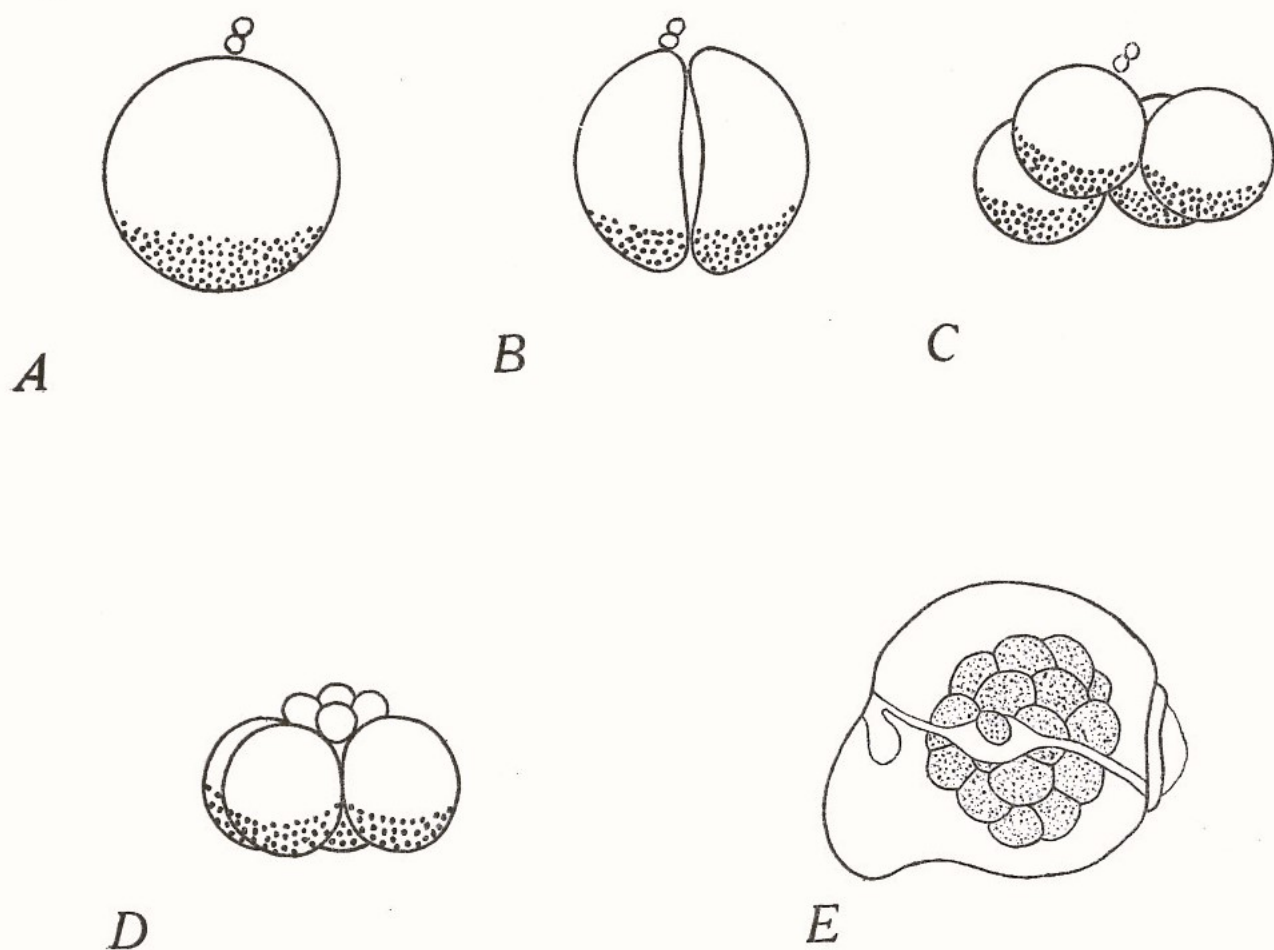


Fig. 2. - Reazione del glicogeno - Punteggiata la zona di reazione.

#### D) *Lipidi.*

I migliori risultati si sono avuti usando la tecnica di Jackson dell'acetic-carbol-Sudan III che permette lo studio istochimico dei lipidi in generale, in quanto il Sudan III si dissolve in essi colorandoli elettivamente (cfr. Glick 1949). I germi, a diverso stadio di sviluppo, erano posti direttamente nell'acetic-carbol-Sudan III.

Durante i processi di maturazione, si può assistere nell'uovo ad una vera e propria migrazione delle gocce di grasso verso il polo vegetale: al polo animale rimane una piccola calotta trasparente e completamente priva di grasso. Nell'uovo che ha emesso i globuli polari (Fig. 3, A) si possono distinguere goccioline di grasso di diversa grandezza, accumulate nei tre quarti vegetativi dell'uovo. Tale distribuzione si mantiene nell'uovo dello stadio II (Fig. 3, B) e dello stadio IV. Allo stadio VIII (Fig. 3, C) le gocce di grasso sono localizzate nei macromeri. Nello stadio XII si nota una colorazione intensa nei macromeri, debole nei blastomeri 2a, 2b, 2c, 2d, nulla nei micromeri del polo animale. Nella *gastrula* è il foglietto interno che risulta ripieno di goccioline di grasso mentre il fo-

glietto esterno ne è quasi completamente privo. Nella *giovane trocofora* si nota accumulo di gocce di grasso nelle cellule che circondano l'abbozzo dell'intestino; anche nel velum si osserva qualche goccia di grasso. Negli stadi successivi: *trocofora avanzata* (Fig. 3, D), *veliger* ed *ippo*, le gocce di grasso sono principalmente limitate alle cellule dell'albuma: anche il velum si presenta ben delineato da goccioline di grasso.

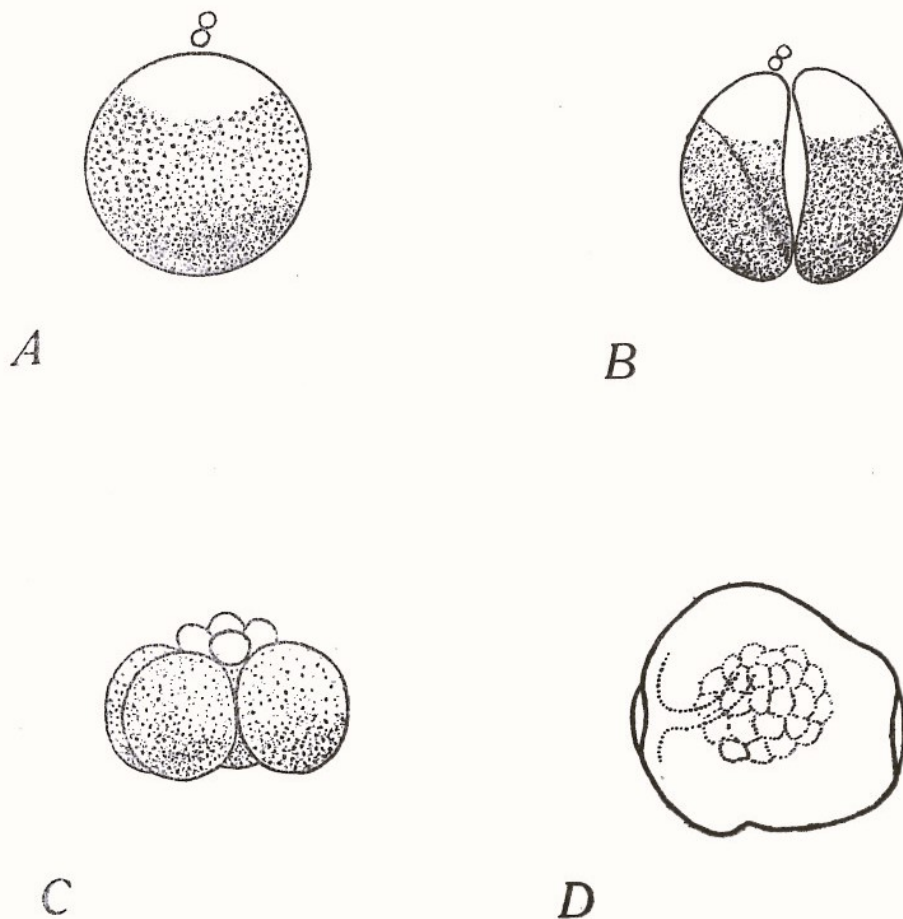


Fig. 3. — Colorazione dei Lipidi - Punteggiata la zona di colorazione.

Mettendo a confronto la colorazione negli ultimi stadi descritti con quella della *trocofora giovane* si nota che la prima è più debole: ciò suggerirebbe che il quantitativo dei lipidi lungo lo sviluppo si va riducendo, ma sarebbe opportuno integrare con dati quantitativi i dati istochimici.

#### DISCUSSIONE

1) La tecnica della benzidina e la M-nadi-reazione non sono tecniche specifiche (vedi critiche riportate da Brachet, 1947) in quanto diversi fattori possono alterare l'andamento delle reazioni; non sarebbe

perciò prudente trarne delle conclusioni senza una comparazione con controlli che nel caso presente furono costituiti da uova trattate in diversi stadi con KCN 0,1%.

Un'altra cosa da aver presente nei riguardi della localizzazione istologica degli enzimi qui studiati è la possibilità di una diffusione del colore della reazione. Nei nostri esperimenti le reazioni però hanno presentato sempre una localizzazione netta e ben definita, quindi riteniamo che la localizzazione cellulare da noi descritta corrisponda realmente alla localizzazione degli enzimi studiati.

Nelle uova di *Limnaea* Raven (1945, 1946) ha rinvenuto una reazione positiva per le fenolasi e le perossidasi in stadi assai precoci; nell'uovo di *Physa* invece, la reazione della benzidina e la M-nadi-reazione risultano positive solo in stadi avanzati (*trocofora avanzata*). Possiamo noi escludere la presenza di ossidasi e perossidasi negli stadi precoci dell'uovo di *Physa*? Non crediamo di poterlo fare per un duplice motivo: 1) perchè potrebbe darsi che gli enzimi siano presenti in quantità minime tali da non poter essere messe in evidenza con le reazioni da noi adoperate; 2) perchè i fissativi adoperati possono venire a denaturare alcuni enzimi che potrebbero intervenire nelle reazioni.

Per ciò che riguarda il fatto che nella giovane trocofora la ghiandola della conchiglia, pur essendo differenziata morfologicamente non dà reazione positiva, mentre la dà nella trocofora avanzata in cui esercita già una funzione, ci fa pensare che gli enzimi qui studiati siano legati più alla funzione che al differenziamento di tale ghiandola.

La maggiore quantità di granuli nella parte di sinistra del bordo della ghiandola è verosimilmente dovuta ad una attività più intensa della ghiandola in tale zona in relazione con il carattere sinistrorso della conchiglia.

2) Per mettere in evidenza il glicogeno è stata usata la tecnica di Bauer; tale tecnica però non è specifica per il glicogeno: la differenziazione del glicogeno da tutte le altre sostanze può essere fatta facendo digerire il glicogeno dall'amilasi salivare. Così utilizzata la tecnica di Bauer è considerata da diversi AA. (Lison, 1936; Glick, 1949; Panijel, 1950) come la tecnica più specifica e che dà i migliori risultati.

Per mettere in evidenza i lipidi è stata usata la tecnica di Jackson; tale tecnica è da preferire, tra quelle che utilizzano il Sudan III, in quanto svela quei lipidi considerati fino ad ora refrattari a tale sostanza (Glick 1949). Il Sudan III però, permette uno studio istochimico bensì specifico, ma generale dei lipidi: non è possibile cioè, con l'impiego di tale sostanza, scendere ad una analisi più precisa della costituzione chimica del grasso svelato.

Dai risultati esposti risulta che i lipidi e il glicogeno sono presenti all'emisfero vegetale dell'uovo: tali sostanze altamente energetiche si vengono a localizzare in questa zona dell'uovo per costituire semplicemente materiale di riserva, o piuttosto per mettere a disposizione la loro quantità di energia per i processi assai dispendiosi della gastrulazione, che in questa zona dell'uovo sono appunto i più attivi? Il problema non può risolversi con i soli dati istochimici e soltanto l'analisi sperimentale potrebbe dire una parola certa.

Secondo Raven (1946) la presenza di queste sostanze in determinati organi larvali suggerirebbe l'ipotesi che esse abbiano piuttosto il ruolo di sostanze energetiche che quello di contribuire alla sintesi di protoplasma vivente.

#### CONCLUSIONI

1) Con metodi istochimici fu indagata la localizzazione della M-nadi-ossidasi, della benzidin-perossidasi, del glicogeno e dei lipidi in generale nei diversi stadi di sviluppo di *Physa rivularis Ph.*

2) Per ciò che concerne i due fermenti considerati, la loro presenza ha potuto accertarsi solo per gli stadi avanzati dello sviluppo (da trocofora avanzata in poi) mai negli stadi precoci. Essi risultarono localizzati in corrispondenza del bordo della ghiandola della conchiglia: tale localizzazione è probabilmente in relazione con la funzione di tale organo.

3) Per ciò che concerne la localizzazione del glicogeno e dei lipidi, fu trovato che queste sostanze sono segregate lungo lo sviluppo solo in corrispondenza della parte vegetativa dell'uovo. Nelle larve il glicogeno è presente nelle cellule dell'albume, nell'abbozzo dell'epatopancreas, nel foglietto interno dello stomaco, nel velum; i lipidi sono presenti nelle cellule dell'albume e nel velum.

Palermo - Istituto di zoologia dell'Università.

Roma - Istituto Superiore di Sanità.

#### BIBLIOGRAFIA

- BRACHET, J.: Embryologie chimique. Paris, 1947.  
BROOKS, W., K.: Observations upon the early stages in the development of the fresh-water Pulmonates. Studies Biol. Lab. Johns Hopkins University, vol. 1, (1879).  
CONKLIN, E., G.: The effects of centrifugal force upon the organization and development of the eggs of fresh water Pulmonates. J. Expt. Zool., 9, 417 (1910).

- FOL, H. : Etudes sur le développement des Mollusques. III - Sur le développement des Gastéropodes Pulmonés. Archives Zool. Expt. Gen., 8, 103 (1879).
- GLICK, D. : Techniques of histo- and cytochemistry. New York, 1949.
- LISON, L. : Histochimie animale. Paris, 1936.
- MINGANTI, A. : Acidi nucleici e fosfatasi nello sviluppo della Limnaea. Riv. Biol., 42, 293 (1950).
- PANJEL, J. : Les problèmes de l'histochimie et la biologie cellulaire. Paris, 1951.
- RAVEN, P., CHR. : The development of the egg of Limnaea stagnalis L. from oviposition till first cleavage. Arch. Néerl. Zool., 7, 91 (1945).
- RAVEN, P., CHR. : The development of the egg of Limnaea stagnalis L. from oviposition till the trochophore stage, with special reference to its chemical embryology. Arch. Néerl. Zool., 7, 353 (1946).
- WIERZEJSKI, A. : Embryologie von Physa fontinalis L. Z. Wiss. Zool., 83, 502 (1905).
-