

ovaries or of fresh gonads. Nuclear and cytoplasmic mono- and diphosphatases are destroyed; nucleolar phosphatases on the contrary are unaltered or only slightly damaged.

The authors put forward the hypothesis that nucleolar phosphatases have a different kind of enzymatic active groups which might have a low competition factor in regard to mustard oil. Possibly the caryoclastic action of this substance is due, at least in part, to the destruction of alkaline phosphatases which are necessary to mitotic processes.

Distribuzione di fosfatasi alcaline in gonadi di Crostacei isopodi in rapporto al ciclo degli acidi nucleici

Ricerche della KRUGELIS¹ in testicolo di topo e in ovociti di alcuni invertebrati marini², utilizzando la tecnica istochimica di Gomori, hanno dimostrato la presenza di fosfatasi alcaline in cellule a carattere proliferativo con diversa distribuzione nei vari stadi, concludendo per la loro indipendenza, come localizzazione, dall'acido ribonucleico citoplasmatico.

Noi abbiamo condotto la nostra ricerca sugli ovociti in accrescimento e sugli spermatociti di alcuni Crostacei Isopodi.

Abbiamo ricercato le fosfatasi alcaline (p_H 9,5, substrati glicerofosfato di sodio ed acido timonucleico depolimerizzato), con la tecnica di Gomori, durante la spermatogenesi e l'ovogenesi di *Asellus aquaticus* e Cimotoidi (*Meinertia parallela* e *Anilocra physodes*). Gli stadi osservati sono stati per la spermatogenesi, le spermatogonie, gli spermatociti di I° e II° ordine, gli spermatidi e gli spermatozoi. Per l'ovogenesi, gli stadi da ovogonie a ovociti in diplotene e prima parte dell'auxocitosi, quando la cromatina entra nello «stadio diffuso».

I risultati generali sono stati i seguenti: presenza di una monofosfatasi alcalina, comune al citoplasma, nucleo e nucleolo, in quantità maggiore in questi ultimi due. Quanto alla localizzazione, essa appare diffusa e omogenea nel citoplasma, discontinua granulare e localizzata sulle strutture nel nucleo, compatta e perfettamente omogenea nel nucleolo. Cioè tutte figure perfettamente corrispondenti a quelle ottenute con i comuni coloranti nucleari.

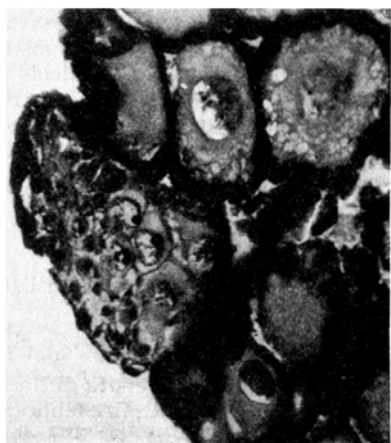


Fig. 1. - *Anilocra*, ovogonie e ovociti in accrescimento ($\times 285$).

I tempi di incubazione richiesti per mettere in evidenza le fosfatasi sono considerevolmente più brevi negli ovari che nei testicoli, il che fa supporre che la quantità delle fosfatasi sia maggiore nei primi. Una differenza è stata anche riscontrata fra i Cimotoidi e l'*Asellus*: in questo ultimo il tempo di incubazione richiesto è maggiore.

Spermatogenesi. Per quanto riguarda la spermatogenesi, sia in *Asellus* che in Cimotoidi, la quantità va diminuendo da spermatogonie a spermatociti, a spermatidi, i quali ultimi ne appaiono del tutto sprovvisti, eccetto che lungo la membrana esterna e particolarmente in una zona di essa. Gli spermatozoi appaiono di nuovo positivi.

Per quanto riguarda i nuclei di rivestimento dei testicoli di *Asellus*, o nuclei giganti poliploidi, da nostre osservazioni inedite con i comuni coloranti nucleari risulta che la cromatina può presentarsi in stadi diversi di dispersione; a questi corrispondono diversi aspetti delle fosfatasi.

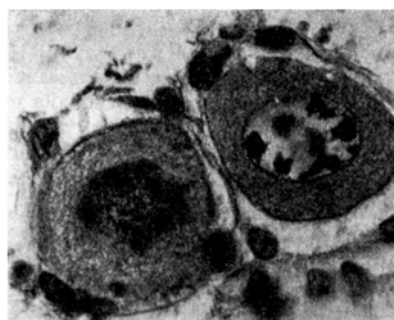


Fig. 2. - *Meinertia*, giovani ovociti ($\times 1030$).

Abbiamo classificato i dati in tre categorie:

Gruppo I: cromatina diffusa. Non è visibile una netta granulazione nel nucleo: la reazione delle fosfatasi è quasi nulla nel corpo nucleare, intensissima nei nucleoli (da uno a cinque).

Gruppo II: cromatina raggruppata in granuli molto evidenti: fosfatasi presente nei nucleoli e nelle zolle cromatiche.

Gruppo III: cromatina estremamente compatta ed addensata, granulazioni difficilmente visibili e nucleoli anche poco visibili e reazione delle fosfatasi intensissima e uniforme, in tutto il nucleo.

La reazione è sempre negativa nel citoplasma di queste cellule, ad eccezione di quelle del gruppo III, in cui è debolmente positiva.

Ovogenesi. Negli ovari di *Asellus* si nota una progressiva diminuzione di enzima da ovogonie ai vari stadi di accrescimento; si mettono in evidenza con la reazione di Gomori tipiche figure cromosomiche (fig. 3); il citoplasma subisce una notevolissima diminuzione di colorabilità passando dagli stadi molto giovanili, fortemente positivi, agli stadi più avanzati del tutto negativi. Per gli ovari di Cimotoidi le osservazioni sono parallele e sono state eseguite con maggiore particolarità date le maggiori dimensioni degli ovociti. Si nota sempre un nucleolo che reagisce con eguale intensità in tutti gli stadi. Nel resto del nucleo la fosfatasi è distribuita secondo le tipiche strutture cromosomiche, caratteristiche di ciascuna specie. L'aspetto dei bivalenti all'inizio dello «stadio diffuso» è infatti molto diverso e tipico nelle specie del genere *Meinertia*, e, rispettivamente, in *Anilocra*. Nella prima i bivalenti costituiscono piccoli blocchi a contorno irregolare (fig. 2), mentre in *Anilocra* conservano aspetto allungato, filamentoso (fig. 1 e 4). A queste figu-

¹ E. J. KRUGELIS, J. Roy. Micr. Soc. 60, 8 (1940).

² E. J. KRUGELIS, Biol. Bull. 93, 205 (1947).



Fig. 3. – *Asellus*, ovocite di media grandezza ($\times 1030$).

re, ottenute con i comuni coloranti nucleari, corrispondono esattamente le figure che si ottengono con la reazione Gomori.

Negli ovociti di massima dimensione osservata, in cui la vitellogenesi è già avanzata, la vescicola germinativa dà reazione debole.

Anche qui le figure sono identiche a quelle ottenute con i coloranti nucleari dell'acido desossiribonucleico.

Nel citoplasma la quantità di fosfatasi è notevole negli stadi giovanili e diminuisce fino a sparire o quasi quando è iniziata la vitellogenesi. I nuclei delle cellule di rivestimento, piccoli, diploidi, danno reazione intensissima a struttura granulare, e non mostrano alcun ciclo paragonabile a quello dei nuclei poliploidi dei testicoli.

Difosfatasi. Le difosfatasi sono presenti in piccola quantità nel nucleo e con distribuzione omogenea, in notevole quantità nel nucleolo su strutture filamentose all'interno di esso e su una fascia lungo la membrana nucleolare. Mancano nei nuclei follicolari.

Conclusioni. Dalle nostre osservazioni abbiamo innanzi tutto avuto prova che le monofosfatasi alcaline seguono, come localizzazione, l'acido desossiribonucleico. Abbiamo infatti osservato figure identiche a quelle ottenute con i comuni coloranti nucleari ed evidentissima è

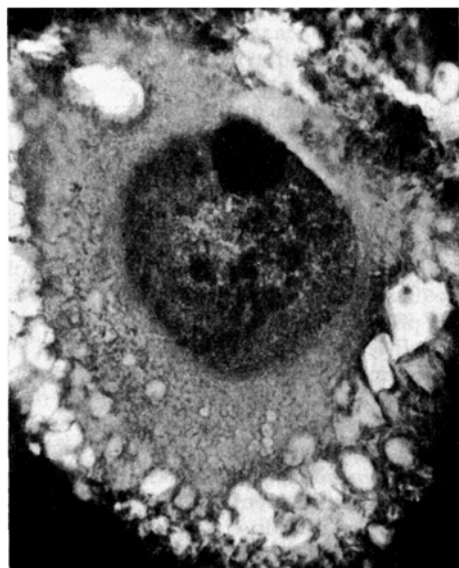


Fig. 4. – *Anilocra*, ovocite di media grandezza, in vitellogenesi ($\times 1030$).

la differenza di aspetto che presenta il nucleo di *Meinertia parallela* da quello di *Anilocra*, in cui le strutture cromosomiche sono nettamente differenti. Ciò conferma le osservazioni di DANIELLI¹ e KRUGELIS². Questo non può meravigliare qualora si pensi che le fosfatasi, in qualità di enzimi fosforilizzanti, devono presiedere alla sintesi e alla degradazione di composti fosforati quali sono gli acidi nucleici.

In vista di ciò, noi abbiamo interpretato il ciclo delle monofosfatasi come contemporaneo a quello degli acidi nucleici. Infatti le spermatogonie e le ovogonie appaiono più ricche in fosfatasi in quanto dovranno produrre una notevole sintesi di acidi nucleici per le successive mitosi e meiosi. Quando si giunge a spermatidi, praticamente tali sintesi sono terminate ed infatti essi danno una pallida reazione di Feulgen. Così anche negli ovociti i nuclei, giunti alla vitellogenesi, hanno terminato di metabolizzare acido timonucleico.

Parallelamente il citoplasma, negli stadi giovanili, è particolarmente ricco di enzima che servirà per la sintesi di acido ribonucleico, durante il prossimo enorme aumento di volume. Iniziata la vitellogenesi, tale sintesi si arresta (con l'assorbimento ultravioletto CASSPERSON³ aveva notato una diminuzione di acido ribonucleico parallela all'accrescimento dell'ovocita e tale osservazione era stata confermata per altre vie da BRACHET⁴) e la fosfatasi sparisce o quasi. Dobbiamo però rilevare che non abbiamo ancora controllata la distribuzione nel nostro materiale dell'acido ribonucleico.

L'unico punto oscuro sembrava la presenza nel nucleolo, che è Feulgen negativo, di una difosfatasi a tipo nucleare (substrato acido timonucleico). Nostre successive ricerche di inibizione di detti enzimi con iprite e sali di mercurio⁵, ci hanno dato prova che sia le mono che le difosfatasi alcaline del nucleolo si debbono considerare diverse da quelle nucleari e citoplasmatiche, in quanto resistono ad agenti così violenti.

Poiché la loro reazione appare immutata o quasi, noi abbiamo formulato l'ipotesi che esse abbiano più gruppi di attacco, cui è dovuta l'azione enzimatica. Alcuni di questi gruppi sarebbero insensibili o avrebbero un bassissimo fattore di competizione per l'iprite, conservando anche dopo l'azione di questa, una qualche attività.

Le difosfatasi nucleari, eccetto che nel nucleolo, hanno aspetto granulare e si localizzano sulle strutture cromosomiche.

In conclusione ci sembra di poter affermare:

1.° Che le monofosfatasi si trovano in esatta corrispondenza delle strutture nucleari Feulgen positive. Si trovano inoltre nel citoplasma e nel nucleolo dei giovani ovociti, e scompaiono dal primo nell'auxocitosi, mentre è in atto la vitellogenesi. Riteniamo che la localizzazione citoplasmatica sia in rapporto con la distribuzione dell'acido ribonucleico.

2.° Che le fosfatasi nucleolari, essendo di tipo diverso, devono essere considerate a parte da quelle nucleari e citoplasmatiche;

3.° Che le difosfatasi non seguono così strettamente la localizzazione degli acidi nucleici.

G. MONTALENTI e M. DE NICOLA

Istituto di Genetica dell'Università di Napoli e Centro di Citologia Genetica del C.N.R., il 2 febbraio 1948.

¹ J. F. DANIELLI, *Nature* 156, 294 (1946).

² E. J. KRUGELIS, *Genetics* 30, 12 (1945).

³ T. CASSPERSON, *Skand. Arch. Phys.* 73, Suppl. 8, 81 (1936).

⁴ J. BRACHET, *Embryologie chimique*, Bruxelles (1946).

⁵ G. MONTALENTI e M. DE NICOLA, questo fascicolo, pag. 314.

Summary

The distribution of alkaline phosphatases has been studied in male and female gonads of some isopod crustaceans by means of Gomori's reaction.

Monophosphatases are found on all Feulgen-positive nuclear structures, in the nucleolus and in the cytoplasm of young oocytes. They disappear from the cytoplasm in auxocytosis, during yolk formation, although they persist in the germinal vesicle. The authors think that the cytoplasmic localization is coincident with ribonucleic acid distribution.

From the experiments related in the following note, nucleolar phosphatases appear to be in some way different from the nuclear (*sensu stricto*) and cytoplasmic phosphatases.

Diphosphatases do not follow so closely the nucleic acid localization. They are absent from cytoplasm; in the nucleolus they are not distributed uniformly but show characteristic structure; in the nucleus they are not localized in the chromosomes but homogeneously diffused.

Zwei neuartige Erkrankungen bei Insekten

Im Winter 1942 erhielt ich von Prof. A. THIENEMANN einige Larven von *Camptochironomus tentans* aus dem Drecksee bei Plön, die mit zwei interessanten Infektionen befallen waren. Die kranken Larven hatten einen weißen, undurchsichtigen Fettkörper, der sich von dem grünlichen Fettkörper gesunder Larven deutlich unterschied. Ihre Bewegungen waren langsamer als die der gesunden Larven. Sie übten gegen Ende der Infektion nicht mehr die schwingenden Atmungsbewegungen aus und starben in 7–14 Tagen ohne auffällige Erschlaffung oder Verfärbung. In einem Teile der Larven fanden wir im Fettkörper eine große Menge eirunder, stark lichtbrechender Inklusionen von 5–10 μ Größe. Der Rest der Larven zeigte nach dem Durchbrechen der Haut eine milchige Lymphe und im Fettkörper fanden wir eine Infektion mit 0,2 μ großen kokkenartigen Organismen. Das Material wurde mit Sublimatalkohol und mit Zenker fixiert und geschnitten.

1. Eiförmige Inklusionen in *Camptochironomus tentans*

Auf Schnitten durch eine Reihe von Larven fanden wir den Fettkörper vollgestopft mit den eiförmigen Gebilden. Sie lagen zu 1–6 im Plasma der sonst nicht veränderten Fettgewebezellen. Der Zellkern war unbeschädigt, öfters durch die Inklusionen zur Seite geschoben. Im Unterschied zu den nukleolenhaltigen gesunden Zellen waren die Kerne der befallenen Zellen kompakt, mit dichtem Chromatinnetz; in einigen Fällen fanden sich Gruppen von Inklusionskörperchen auch in der Hämolymphe. Die kleinsten beobachteten Inklusionen waren rundlich oder abgerundet viereckig, etwa $2 \times 2 \mu$ groß. Kleinere Inklusionen waren nicht mit Sicherheit festzustellen, doch waren überdies viele kleine Kügelchen von 0,2–0,5 μ Größe im kranken Fettgewebe vorhanden. Sie unterschieden sich von Lymphgranula besonders durch stärkeres Lichtbrechungsvermögen, durch schlechte Färbbarkeit und durch Farbstoffspeicherung nach Ätzung, wie es bei Virusaggregaten der Polyedrie üblich ist. Die Inklusionen wuchsen bis auf 10–16 μ Größe, wobei sie meist eine eiförmige Gestalt annehmen. Nur wenige behalten ihre Oktaederform. Im Innern der Inklusionen fanden sich zahlreiche 0,1–0,2 μ große, stark lichtbrechende Körnchen, die sich von der kompakten Oberflächenschicht (Häutchen) der Inklusionen unterscheiden. Die Körnchen sind im Dunkelfeld gut und grell

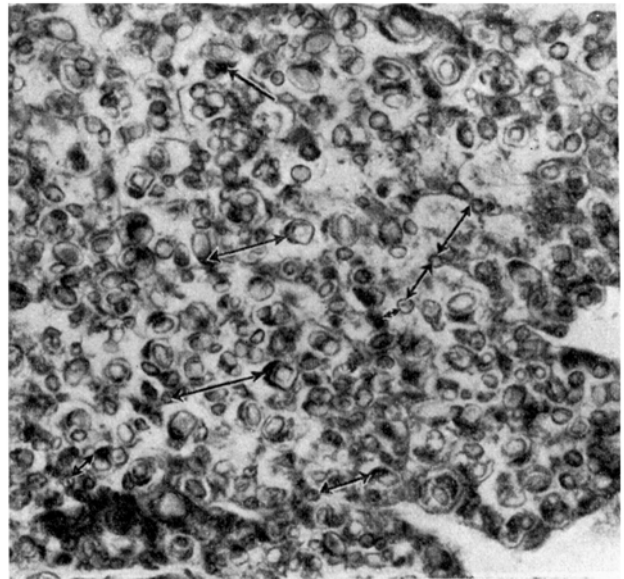


Abb. 1. Einschlusskörper in den Zellen des Fettkörpers. Pfeile zeigen die Kerne. Vergr. 500mal. Photo Fiala.

aufleuchtend zu sehen. Die Inklusionen sind auf diese Weise sehr leicht aufzufinden, selbst wenn sie durch die Lymphe verschwemmt wurden. Wir stellen fest, daß nur das Fettgewebe von der Infektion befallen ist und daß erst knapp vor dem Tode des Tieres die Inklusionen in die Hämolymphe übergehen. Dieses einzigartige Verhalten der Inklusionen führt uns zur Annahme einer nahen Verwandtschaft dieser Erkrankung mit dem Virus der Polyedrie. Die Inklusionen färbten sich nicht mit Sudan III und Scharlachrot, lösten sich nicht in organischen Lösungsmitteln, wie Chloroform, Azeton, Xylol, Alkohol, Tetrachloräthylen oder Dioxan. In schwachen Säuren blähten sie sich auf und wurden dann färbbar. Nach einer längeren Zeit lösten sie sich auf. In verdünnten Alkalien, wie KOH, NaOH, NH_4OH , gingen die Kristalle in 30–60 Minuten in Lösung; in Na_2CO_3 -Lösung wurden sie nur aufgebläht. Gleich wie in den Polyedern der Gelbsucht oder der Wipfelkrankheit färbten sich auch in unserem Material mit den Methoden von KOMAREK-BREINDL¹, BREINDL² und HEIDENREICH die sogenannten Virusagglomerate distinkt als kleine runde Körperchen von 0,2–0,1 μ Durchmesser. Je nach der Länge der Ätzung waren die Inklusionen bereits mit Körnchen angefüllt oder es waren nur noch wenige Körner in ihrer Mitte zu finden; die anderen waren bereits in Alkali aufgelöst. Die ausgefärbten Körnchen leuchteten alle auch im Dunkelfeld. Nach Ätzung mit Alkali leuchteten im Dunkelfeld weniger Inklusionskörnchen als vorher. Auf die Angaben von BERCHGOLD³ Bezug nehmend, können wir die gefärbten Granula als Agglomerate der Viruskörperchen betrachten, die mit dicken Schichten einer Proteinsubstanz bedeckt sind, welche die Rindenschicht der Einschlusskörper bildet. Wir kommen so zu einer Identität der Ausscheidungen, was zwar noch nicht für eine Identität der Viren sprechen muß. Dieses fragliche Virus unterscheidet sich von den polyedrischen Viren der Gelbsucht des Seidenspinners und der Wipfelkrankheit besonders darin, daß es in keiner Weise den Kern

¹ V. BREINDL und J. KOMAREK, Sitzungsber. d. königl. böhm. Ges. der Wiss. Cl, II (1923).

² V. BREINDL und O. JIROVEC, Mém. Soc. zool. tchécosl. 3 (1935).

³ G. BERCHGOLD, Biol. Zentralbl. 63, 1 (1943) (s. dort Literaturangaben).