

Fig. 2. Maximal intensity of fluorescence of the indole reagent ( $\Phi_m$ ) as a function of acetylcholine concentration (c).

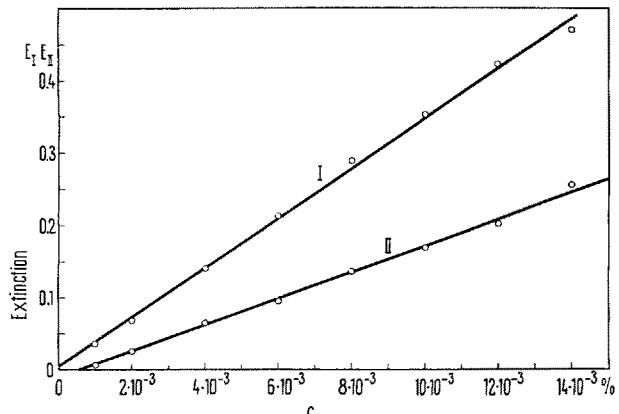


Fig. 3. Extinction of the solution of benzidine (I) and o-dianisidine (II) as a function of acetylcholine concentration (c).

The action of other cholinomimetic agents is under investigation, and, according to the first results, some of them act in a similar way as acetylcholine. The effects observed, which are being further studied, may constitute a basis for quantitative determinations in biological specimens.

**Zusammenfassung.** Acetylcholin wirkt als Aktivator auf Oxydationsreaktionen mit Wasserstoffperoxyd in alkalischer Lösung. Solche Wirkungen auf die Chemi-

lumineszenz des Luminols (3-Aminophthalhydrazid), auf die Oxydation des Indols, Benzidins und o-Dianizidins wurden durch Messungen der Lumineszenzintensität ( $\Phi$ ), bzw. der Extinktion (E) näher untersucht.

E. KUNEC-VAJIC and K. WEBER

Department of Pharmacology and Department of Forensic Medicine, Medical Faculty, University of Zagreb (Yugoslavia), 29th December 1966.

### La vitellogenesi in *Arbacia lixula* e *Sphaerechinus granularis* (Echin. Echin.)

Allo stato attuale esistono 3 orientamenti fondamentali per cercare di chiarire l'origine del vitello negli ovociti in accrescimento di numerose specie di Vertebrati e di Invertebrati: secondo un primo il vitello prenderebbe origine esclusivamente ad opera dell'ergastoplasma, secondo un altro in rapporto con l'apparato dei Golgi, secondo un terzo in intima relazione con i mitocondri. Il microscopio elettronico ha consentito di accettare in particolare che in *Paracentrotus lividus*, *Arbacia lixula*, *Sphaerechinus granularis*<sup>1</sup>, *Aplysia depilans*<sup>2</sup>, *Patella coerulea*<sup>3</sup>, e *Planorbis corneus*<sup>4</sup>, il vitello si forma in ogni caso per aggregazione di particelle ribonucleoproteiche, aggregazione che nelle prime 3 specie si verifica liberamente nel citoplasma, in *Patella* avviene entro le maglie del reticolo endocitoplasmatico, in *Aplysia* su dittosomi o corpi del Golgi preventivamente trasformatisi, ed in *Planorbis* entro mitocondri. Questa modalità di formazione del vitello lascia adito all'ipotesi che in generale nei globuli vitellini, almeno in una prima fase della loro formazione, si trovi ARN; questo fatto è stato già dimostrato nei globuli vitellini degli ovociti di *Aplysia* all'inizio della loro formazione<sup>5</sup>. La stessa specie peraltro aveva consentito di ammettere in precedenza<sup>6</sup> che le diverse affinità tintoriali rivelatesi col metodo Mallory nei globuli di vitello in fasi successive della loro costituzione, andavano forse attribuite ad un loro passaggio da uno stato di maggiore densità ad uno stato di minore densità. Altre ricerche infine effettuate ancora su *Aplysia*<sup>7</sup>,

come pure su *Planorbis*<sup>4</sup>, avevano permesso di individuare un rapporto fra zone del Golgi e sintesi del vitello, nel senso che si determinerebbero condizioni fisico-chimiche tali da provocare la precipitazione dell'argento dei relativi metodi impiegati.

Per confermare alcuni di detti risultati e per estendere le indagini sulla presenza di ARN nei globuli vitellini, abbiamo ritenuto ora di prendere in considerazione due specie di Echinodermi: *Arbacia lixula* e *Sphaerechinus granularis*.

Gli individui sono stati pescati rispettivamente nel mare di Ganzirri (Messina) e di Palmi (Reggio Calabria). I frammenti di gonade femminile appena prelevati sono stati posti nei liquidi fissativi. Sono stati usati l'Hollande con aggiunta di bichloruro di mercurio, il Bouin e l'Helly per i comuni metodi di colorazione, il Da Fano ed il Golgi 1908 per la messa in evidenza dell'apparato del Golgi ed il Regaud per il condrioma. I metodi di colorazione adottati sono stati il Galgano I, il Dominici e l'Unna-Pappenheim. Ai fini della dimostrazione dell'ARN, nei metodi Dominici e Unna è stata introdotta la digestione con ribonucleasi secondo Brachet.

<sup>1</sup> A. BOLOGNARI, Atti Soc. pelorit. Sci. fis. mat. nat. 6, 55 (1960).

<sup>2</sup> A. BOLOGNARI, Boll. Zool. 25, 171 (1958).

<sup>3</sup> A. BOLOGNARI, Boll. Zool. 25, 155 (1958).

<sup>4</sup> M. P. ALBANESE e A. BOLOGNARI, Experientia 20, 29 (1964).

<sup>5</sup> A. BOLOGNARI e A. DONATO, Acta histochem. 19, 285 (1964).

<sup>6</sup> A. BOLOGNARI, Archiv. zool. ital. 41, 261 (1956).

<sup>7</sup> A. BOLOGNARI, Boll. Zool. 31, 501 (1964).

Per la microscopia elettronica i frammenti di gonade sono stati fissati in  $\text{OsO}_4$  al 2% secondo Palade, ed inclusi in metacrilati ed in Epon.

L'osservazione al microscopio ottico ha consentito in tanto di rilevare che col metodo Galgano I in entrambe le specie i globuli vitellini inizialmente appaiono colorati in rosso ed alla fine in azzurro. Col metodo Dominici il citoplasma degli ovociti previtellogeneticci appare diffusamente colorato in azzurro; i primi globuli di vitello, allorché compaiono, si presentano anch'essi colorati in azzurro, ma in maniera più intensa. Alla fine della vitellogenesi, invece, i globuli si colorano in rosso. Col metodo Unna-Pappenheim gli ovociti previtellogeneticci manifestano una pironinofilia diffusa nel citoplasma. Essa si può altresì osservare nei globuli vitellini degli ovociti all'inizio della vitellogenesi, mentre nei globuli vitellini di quelli che si avviano al completo sviluppo, essa si va attenuando fin quasi a scomparire. La digestione con ribonucleasi ha soppresso tanto l'affinità per il blu di toluidina del Dominici che per la pironina dell'Unna, e ciò sia nel citoplasma fondamentale degli ovociti previtellogeneticci che nei globuli vitellini.

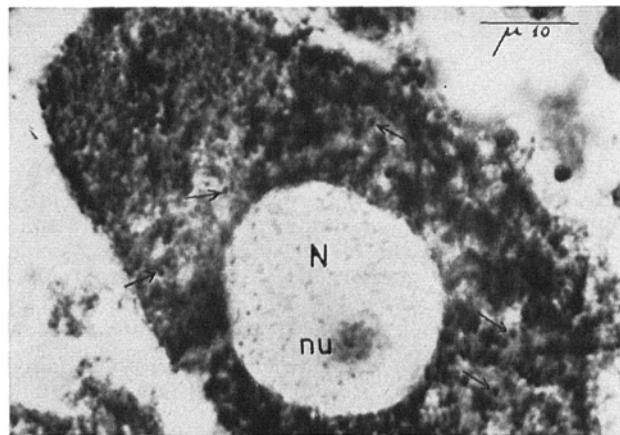


Fig. 1. Ovocita vitellogenetico di *Arbacia lixula* in seguito ad impregnazione argentica secondo Da Fano. Si notino i globuli vitellini (frecce) molto anneriti; N, nucleo; nu, nucleolo.

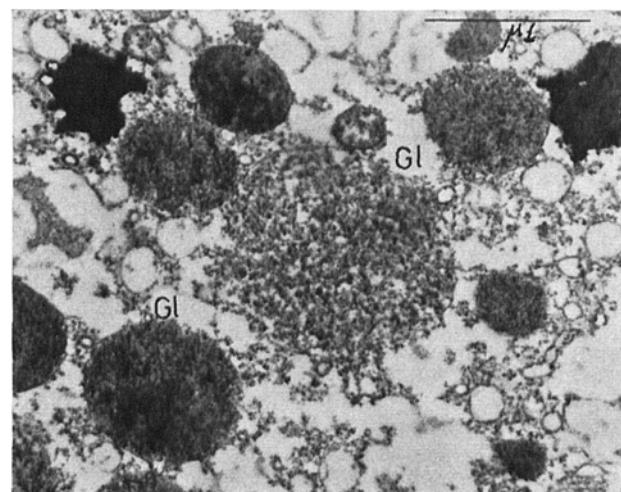


Fig. 2. Micrografia elettronica di porzione di citoplasma di ovocita di *Arbacia lixula*. Globuli a costituzione granulare (Gl) in varie fasi di formazione. Fissazione  $\text{OsO}_4$  1% inclusi in metacrilati.

Con i metodi di Da Fano e di Golgi nelle due specie considerate, mentre negli ovociti previtellogeneticci si ha una precipitazione di argento granulare nei punti più diversi del citoplasma, in quelli all'inizio della vitellogenesi la precipitazione avviene a livello dei globuli vitellini in formazione ed in maniera che essi appaiono ora totalmente anneriti (Figura 1) ora circondati da una sorta di alone nero. Verso la fine della vitellogenesi gli ovociti di solito non presentano più alcuna precipitazione argentica. Infine i preparati allestiti con la tecnica all'ematosilina ferrica, hanno messo in evidenza negli ovociti previtellogeneticci un numero considerevole di mitocondri; esso va via via diminuendo col procedere della vitellogenesi; alla fine dell'accrescimento ne residua un numero piuttosto ridotto.

Al microscopio elettronico è stata sostanzialmente rilevata negli ovociti previtellogeneticci una quantità molto accentuata di granulazioni ribonucleoproteiche (ribosomi) sparse nei punti più diversi dell'area citoplasmatica. L'inizio della vitellogenesi è poi contrassegnato da una aggregazione di dette granulazioni, che pertanto vanno man mano accrescendosi fino a costituire i caratteristici globuli vitellini (Figura 2).

Col procedere di detta aggregazione le granulazioni sparse vanno diminuendo, sicché verso il termine dell'accrescimento ovocitario sono notevolmente ridotte. I globuli appaiono ora isolati ora riuniti in gruppi variamente numerosi; alcuni di essi presentano una membrana avvolgente più o meno completa.

Da quanto avanti detto si ha quindi che nelle due specie prese in esame i globuli di vitello degli ovociti all'inizio della vitellogenesi manifestano caratteristiche diverse rispetto a quelli che si rinvengono negli ovociti alla fine del loro accrescimento.

In particolare le diverse affinità tintoriali in essi rilevate col metodo Mallory indicano, in analogia a quanto riscontrato in *Aplysia*<sup>6</sup>, che forse anche in *Arbacia* e *Sphaerechinus* avviene un passaggio delle sostanze costitutive dei globuli da uno stato di maggiore ad uno di minore densità. Altra analogia con *Aplysia* è stata rilevata in merito all'esistenza dell'ARN nei globuli vitellini all'atto della loro formazione, fatto questo che trova ulteriore conferma nell'aggregazione di granulazioni ribonucleoproteiche accertata al microscopio elettronico.

In quanto alle zone del Golgi, poi, dal momento che esse si rendono manifeste solo durante la previtellogenesi e l'inizio della vitellogenesi, si può dedurre, siccome già visto in *Aplysia* ed in *Planorbis*, che siano in rapporto con i processi di sintesi. Si avrebbe cioè che la precipitazione dell'argento sarebbe condizionata da particolari condizioni fisico-chimiche del citoplasma connesse con la formazione del vitello. Alla fine dell'accrescimento, infatti, non si rilevano più dette zone.

**Summary.** The researches carried out both under the light and electron microscopes permitted us to ascertain that, in Echinodermata *Arbacia lixula* and *Sphaerechinus granularis*, yolk globules form by aggregation of ribonucleoproteic particles. It appears that the globules themselves in the first stage of their formation show such physico-chemical conditions as to condition the precipitation of silver in the method used to reveal Golgi apparatus.

ANTONINA DONATO CELI,  
LOREDANA D'ESTE e DIANA TETI

*Istituto di Zoologia e di Anatomia comparata dell'Università di Messina (Italia), 12 settembre 1966.*