
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

GIUSEPPINA BENAZZI LENTATI, VALERIO BERTINI

Controllo genico immediato sulle dimensioni di zigoti ibridi di planarie

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 32 (1962), n.5, p. 741–751.

Accademia Nazionale dei Lincei

http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1962_8_32_5_741_0

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

Biologia. — *Controllo genico immediato sulle dimensioni di zigoti ibridi di planarie* (*). Nota di GIUSEPPINA BENAZZI LENTATI e VALERIO BERTINI, presentata (**) dal Corrisp. M. BENAZZI.

INTRODUZIONE. — Da lavori precedenti risulta che l'incrocio fra esemplari del biotipo diploide, funzionante da femmina, ed esemplari del biotipo triplo-esaploide di *Dugesia lugubris* produce individui che nelle linee somatica e maschile sono diploidi, mentre in quella femminile sono diploidi e tetraploidi. Questi esemplari hanno dato numerosi discendenti colle loro stesse caratteristiche ed altri che sono invece triploidi nella linea somatica, esaploidi in quella femminile, diploidi in quella maschile⁽¹⁾ (Benazzi e Benazzi Lentati, 1959; Mirolli e Nocentini, 1959). In definitiva questi ibridi interrazziali, presi nel loro complesso, danno tre tipi di ovociti: diploidi, tetraploidi, esaploidi. Recentissime ricerche (Benazzi Lentati, 1962) hanno poi dimostrato che questi tre tipi di ovociti possono essere sia anfimittici che pseudogamici, per cui da uno stesso esemplare ad ovociti diploidi e tetraploidi originano i seguenti pseudozigoti e zigoti: 1° pseudozigoti aploidi da ovociti diploidi pseudogamici; 2° zigoti diploidi da ovociti diploidi anfimittici; 3° pseudozigoti diploidi da ovociti tetraploidi pseudogamici; 4° zigoti triploidi da ovociti tetraploidi anfimittici. Si comprende pertanto come nella cultura in massa siano comparsi anche esemplari triploidi i quali, potendosi pure sviluppare per anfimissi o per pseudogamia, daranno pseudozigoti triploidi e zigoti tetraploidi (solo i primi interessano la presente nota).

Dobbiamo ora rilevare che le dimensioni degli ovociti risultano, anche ad un primo esame, correlate col grado di ploidia. Ricerche statistiche di Mirolli (1956) hanno dimostrato che il carattere « dimensioni degli ovociti » varia, nella intensità della manifestazione, anche nell'ambito di uno stesso biotipo e che la variabilità aumenta col grado di ploidia. Richiamandosi a ricerche precedenti, in particolare a quelle di Barigozzi su *Artemia* (1940-1953) Mirolli ritiene che, quale carattere quantitativo, le dimensioni degli ovociti siano controllate da complessi genici.

In relazione a tali ultimi reperti ci è parso interessante studiare le dimensioni degli zigoti derivati da ovociti diploidi e tetraploidi e degli pseudozigoti derivati da ovociti tetraploidi ed esaploidi; tanto più che uno di noi, studiando appunto i processi di anfimissi e pseudogamia di questi ibridi, aveva notato evidenti differenze fra le dimensioni degli zigoti e degli pseudozigoti a diverso grado di ploidia, come appare dalle figg. 1 e 2 (Tav. I).

(*) Ricerca eseguita nell'Istituto di Zoologia e Anatomia comparata della Università di Pisa.

(**) Nella seduta del 12 maggio 1962.

(1) Essi ricostituiscono il biotipo paterno naturale, il cui ciclo fu descritto da PIERAGNOLI (1954).

MATERIALE E TECNICA. - Gli ibridi presi in esame discendono da due esemplari F_1 , in seguito a successivi incroci. Abbiamo isolato individui che precedentemente avevano dato o solo nati diploidi o nati sia diploidi che triploidi (controllati mediante l'esame del corredo degli ovociti). Ognuno degli esemplari scelti è stato diviso in quattro parti, in modo da avere quattro rigenerati; ogni gruppo di rigenerati è stato allevato isolatamente. Abbiamo proceduto alla misurazione: 1° degli ovociti non fecondati deposti dai rigenerati e da quelli dei loro discendenti che si rivelarono triploidi nella linea somatica e pertanto esaploidi nella femminile, 2° degli zigoti provenienti dagli stessi rigenerati, prelevandoli in momenti successivi, dalla deposizione del bozzolo fino alla 12^a ora. Oltre a questi rigenerati abbiamo scelto due planarie di accertato corredo triploide ed a costante sviluppo pseudogamico; esse sono triploidi nella linea somatica ed esaploidi in quella femminile; anche da questi esemplari abbiamo ottenuto due gruppi di rigenerati che ci hanno fornito pseudozigoti triploidi (nati da pseudogamia degli ovociti esaploidi) le cui dimensioni sono state confrontate con quelle degli zigoti triploidi, nati da anfigamici degli ovociti tetraploidi del primo gruppo di rigenerati. Infine, sempre per controllo, abbiamo studiato zigoti e pseudozigoti di esemplari che dettero sempre e solo nati a corredo diploide.

Quando è stato possibile, abbiamo accertato il corredo cromosomico degli zigoti (nei casi in cui si trovavano in prometafase, metafase od anche anafase); naturalmente il più delle volte abbiamo potuto solo stabilirne le dimensioni.

Per calcolare nel modo più esatto le dimensioni degli ovociti e degli zigoti, sarebbe stato necessario ricorrere al metodo di Mirolli, misurare cioè i diametri in goccia pendente, poiché si tratta di elementi che si presentano come sfere o sferoidi prolati (sec. Smith, come risulta dal lavoro di Mirolli). Con questo procedimento, tuttavia, non si riesce a contare i cromosomi degli zigoti, che sono lunghi, sottili, sovente attorcigliati e divisi in cromatidi e semicromatidi (cfr. Benazzi Lentati, 1959). Perciò tenendo conto che i bozzoli sono sempre, all'incirca, delle stesse dimensioni, li abbiamo aperti, ognuno, in una goccia di acido acetico 2 % per dissociare le cellule vitelline, aggiungendo successivamente una goccia di aceto-carminio; le gocce erano prelevate mediante due anse a diametro determinato (rispettivamente mm 6 e 4). Sovrapponevamo, poi, senza esercitare pressione, un coprioggetto 21 × 26. Avremmo potuto tentare di stabilire, per ogni elemento, prima i diametri in goccia pendente e poi il corredo cromosomico, rimontando su portaoggetti normale; ma questo procedimento comporta una tal perdita di elementi che è del tutto sconsigliabile. Il metodo da noi seguito determina indubbiamente un certo schiacciamento; tuttavia la compressione è pressoché eguale ed uniforme in tutti i preparati (come dimostra pure il fatto che per i vari tipi di ovociti, o di zigoti, le misure si mantengono entro limiti ben definiti). Si può quindi presumere che il volume non cambi a seguito della compressione (elementi rotti, con fuoriuscita di materiale, non sono stati presi in considerazione). Ogni elemento appare pertanto come un disco a contorno circolare od ovoidale, di

cui abbiamo misurato il diametro (o i due diametri) al microscopio ⁽²⁾. I valori corrispondenti al prodotto dei diametri (a^2 o $a \times b$) possono essere considerati indicativi dei rispettivi volumi ⁽³⁾. Per ogni categoria di elementi abbiamo raggruppato i dati desunti dai diversi rigenerati, avendone accertata la corrispondenza. Questi dati sono poi stati raccolti in classi, il cui intervallo di ampiezza è stato scelto di $\mu^2 1000$. Per ciascun tipo di elemento (ovocita o zigote) sono state calcolate la media ($\bar{x}$) e la deviazione standard (s); per il confronto fra le medie è stato usato il test « t » di Student.

RISULTATI. — Il grafico n. 1 è stato costruito in base ai valori indicativi delle dimensioni degli ovociti a 4'', 8'', 12'' ⁽⁴⁾. Si vede che le dimensioni dei plusvarianti a 4'' si sovrappongono a quelle dei minusvarianti a 8'', come i plusvarianti a 8'' si sovrappongono ai minusvarianti a 12''. Tuttavia le tre curve sono nettamente differenziate. Appare una maggior variabilità col-l'aumento del grado di ploidia. Le mode delle 3 curve corrispondono rispettivamente a $\mu^2 4.500$, $\mu^2 8.500$, $\mu^2 13.500$; le medie ($\bar{x}$) rispettivamente a 4.973, 8.791, 13.611; le deviazioni standard (s) a 1.120, 1.460, 2.061 ⁽⁵⁾.

(2) Le misure sono state effettuate con Oc. micrometrico 2 M, su stativo Zeiss Standard GFL, Ob. a secco 40/0,65, optavar 3° grado; con questo ingrandimento ogni divisione dell'oc. microm. corrisponde all'incirca a $\mu 1,6$.

(3) Abbiamo voluto sincerarci della esattezza di tale impostazione, sottoponendo il quesito ai proff. Vesentini e Checcucci, dell'Istituto Matematico della Università di Pisa, che qui sentitamente ringraziamo. Ci è stata da loro suggerita una formula per calcolare il diametro breve che rappresenta lo spessore degli ovociti compressi fra i due vetrini:

$$c = \frac{d^3}{a^2}$$

dove d rappresenta il diametro dedotto dalle misure in goccia pendente ed a il diametro sec. il nostro metodo. Un certo numero di misure ci ha permesso di stabilire che il valore di c è pressoché costante e che pertanto può essere tralasciato nei nostri calcoli. Di conseguenza il valore di a^2 può essere indicativo dei volumi (considerati quindi anche a meno di $\pi/6$). Il valore approssimativo di c , per gli ovociti a 4'' è:

$$c = \frac{d^3}{a^2} = \frac{175.616}{4.973} = \mu 35,1$$

per gli ovociti a 8'' è:

$$c = \frac{300.763}{8.791} = \mu 34,2$$

per gli ovociti a 12'' è:

$$c = \frac{456.533}{13.611} = \mu 33,5.$$

Naturalmente non è stato calcolato il valore di c per gli zigoti, data la impossibilità di accer-tarne il numero cromosomico in goccia pendente. Dall'esposizione ulteriore risulterà tuttavia la coincidenza di dati fra ovociti e zigoti, anche tenendo conto del solo valore di a^2 .

(4) Il numero complessivo degli ovociti a 4'' è = 442; a 8'' = 298; a 12'' = 193.

(5) Il confronto fra le medie indica una differenza molto significativa: per gli ovoc. a 4'' ed a 8'', « t » = 40,08; per gli ovoc. a 8'' e a 12'', « t » = 30,36.

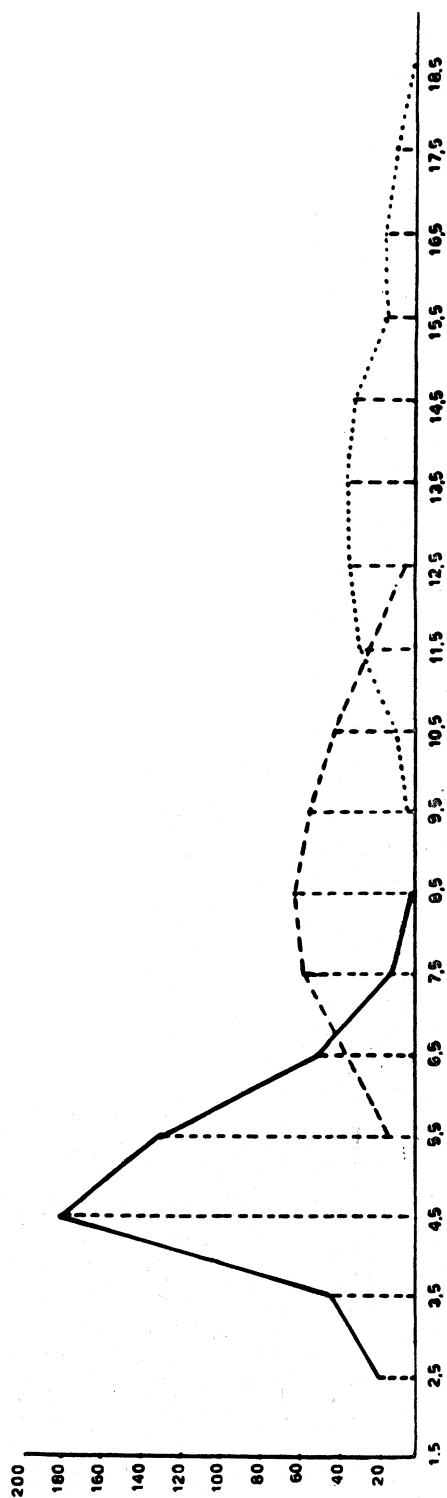


Grafico n. I. – In ordinata il numero degli ovociti; in ascissa le misure centrali delle classi in μ^2 . La linea continua rappresenta gli ovociti a 4''; quella tratteggiata gli ovociti a 8''; quella punteggiata gli ovociti a 12''.

Dal grafico risulta che il numero degli ovociti a 4'' è superiore al numero degli altri; ciò è dovuto al fatto che ogni individuo depone più ovociti diploidi che tetraploidi e che il numero dei nati, per anfigmisi, dagli ovociti tetraploidi è sempre scarso e quindi è scarso, rispetto agli altri, il numero dei loro ovociti esaploidi.

Il grafico n. 2 riporta i dati raccolti sulle dimensioni degli zigoti ⁽⁶⁾, limitatamente a quelli di cui è stato possibile accertare il numero cromosomico; la prima curva rappresenta gli zigoti a 8 crom., la seconda gli zigoti a 12 crom. Le mode delle 2 curve sono rispettivamente: μ^2 4.500, μ^2 11.500; le medie ($\bar{x}$): 6.000 e 12.333; le deviazioni standard (s): 1.400, 1.941 ⁽⁷⁾.

Gli zigoti a 8 crom. provengono in parte da ovociti diploidi anfimittici ed in parte da ovociti tetraploidi pseudogamici; si comprende pertanto la differenza delle medie fra zigoti ed ovociti. Gli zigoti a 12 crom. originano da ovociti tetraploidi anfimittici e le loro dimensioni si avvicinano a quelle degli ovociti esaploidi di cui al grafico n. 1 ⁽⁸⁾. Sono pertanto superiori a quelle degli ovociti da cui originano e simili a quelle degli pseudozigoti triploidi derivati da ovociti esaploidi pseudogamici: *vi è dunque un incremento di volume rispetto all'ovocita a 8''*. Per stabilire quando tale incremento inizia, abbiamo calcolato le dimensioni degli zigoti in funzione del tempo intercorrente fra deposizione del bozzolo e metafase od anafase della 1ª divisione di segmentazione, cioè fin verso la 12ª ora. Dalla Tabella I risulta che fin verso la 4ª ora tutti gli zigoti hanno le dimensioni degli ovociti da cui provengono, comprese fra μ^2 2.500 e μ^2 10.500; dalla 4ª ora circa compaiono zigoti di dimensioni superiori e l'incremento si fa sempre più evidente fino alla 10ª-12ª ora, coincidendo il massimo di volume colla metafase della 1ª divisione di seg., come dimostrano gli zigoti di cui fu possibile contare i cromosomi. Si hanno pertanto *zigoti e pseudozigoti a 8 cromosomi, che per tutto il periodo considerato conservano le dimensioni iniziali e zigoti a 12 crom. in cui queste si accrescono gradualmente*.

Abbiamo ritenuto opportuno effettuare due controlli, i cui risultati sono riportati nelle Tabelle II e III. La Tabella II dimostra che gli zigoti provenienti da un gruppo di rigenerati, che non hanno mai dato nati triploidi nel corredo somatico, non presentano misure gradualmente crescenti, essendo queste contenute entro i limiti corrispondenti a quelli degli ovoc. a 4'' ed a 8''. La Tabella III dimostra come gli pseudozigoti triploidi (provenienti da ovociti esaploidi pseudogamici) abbiano già inizialmente quelle stesse misure che gli zigoti triploidi provenienti da ovociti tetraploidi anfimittici raggiungono dalla 4ª ora circa.

(6) Il numero complessivo degli zigoti a 8 crom. è = 145; a 12 crom. = 66.

(7) Anche in questo caso il confronto fra le due medie è significativo, per un valore di « t » = 25,96.

(8) Come si vede i valori sono lievemente inferiori. Il confronto fra le medie per gli ovociti a 12'' e per gli zigoti a 12 crom. dà un valore di « t » = 1,2.

La diminuzione dei volumi può essere forse dovuta alla espulsione dei due polociti.

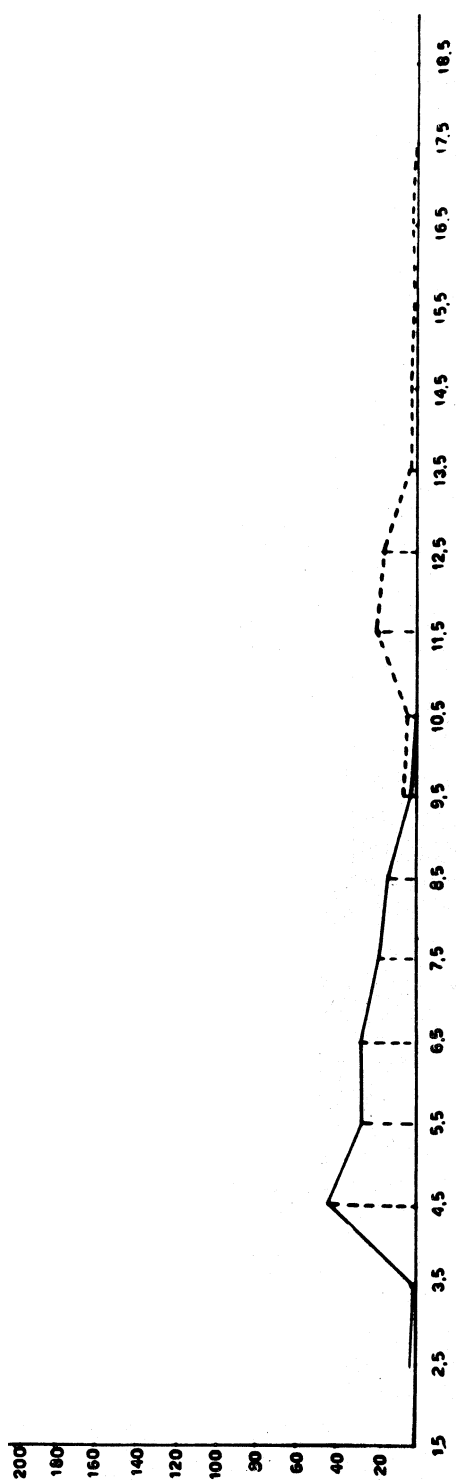


Grafico n. 2. – In ordinata il numero degli elementi; in ascissa le misure centrali delle classi in μ^2 . Linea continua: zigoti e pseudozigoti a 8 crom.; linea tratteggiata: zigoti a 12 crom.

TABELLA I.

In ordinata le ore; in ascissa i valori in χ^2 delle singole classi; i punti rappresentano zigoti e pseudozigoti.

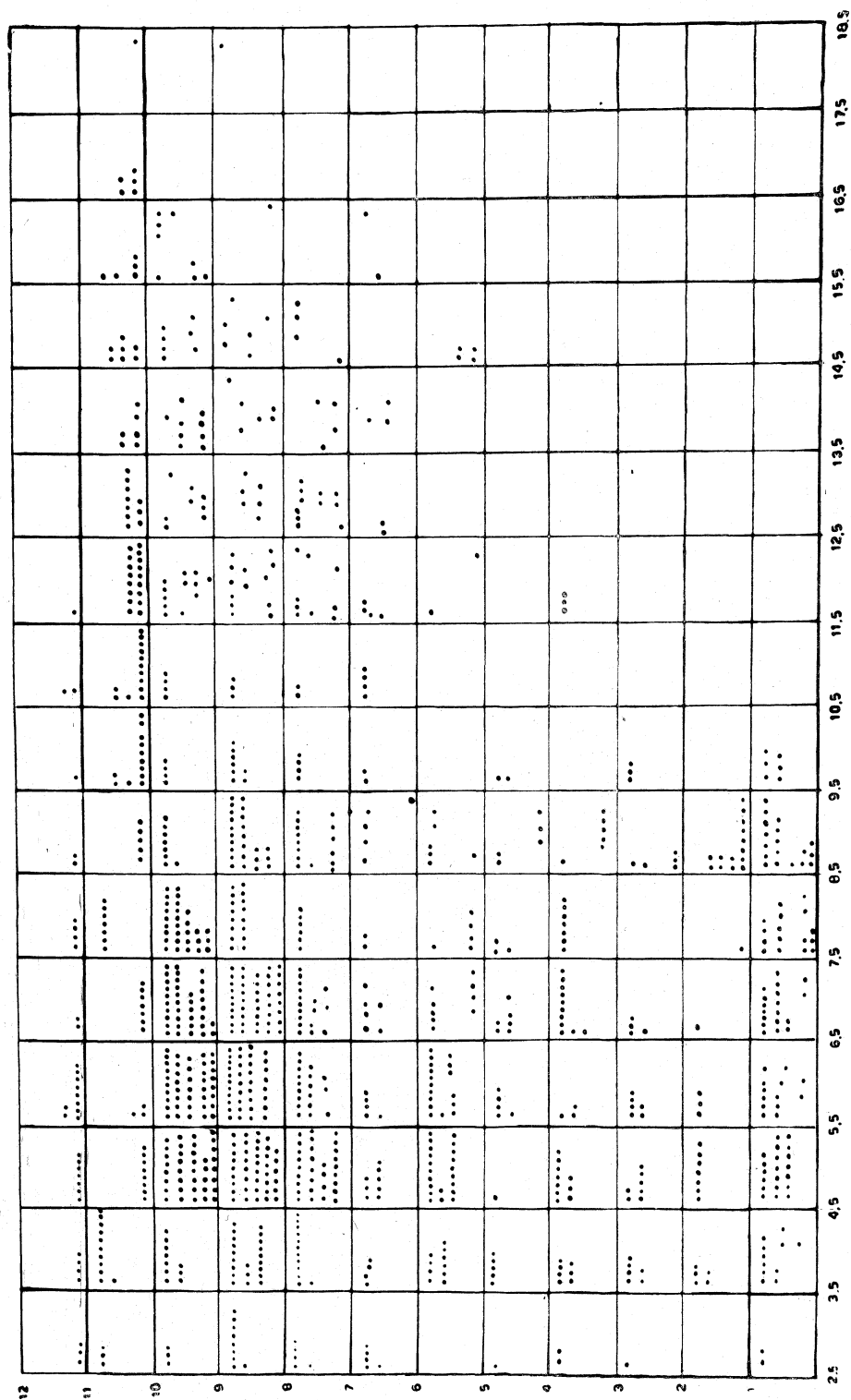


TABELLA II.

In ordinata le ore; in ascissa i valori in μ^2 delle singole classi; i punti rappresentano zigoti e pseudozigoti.

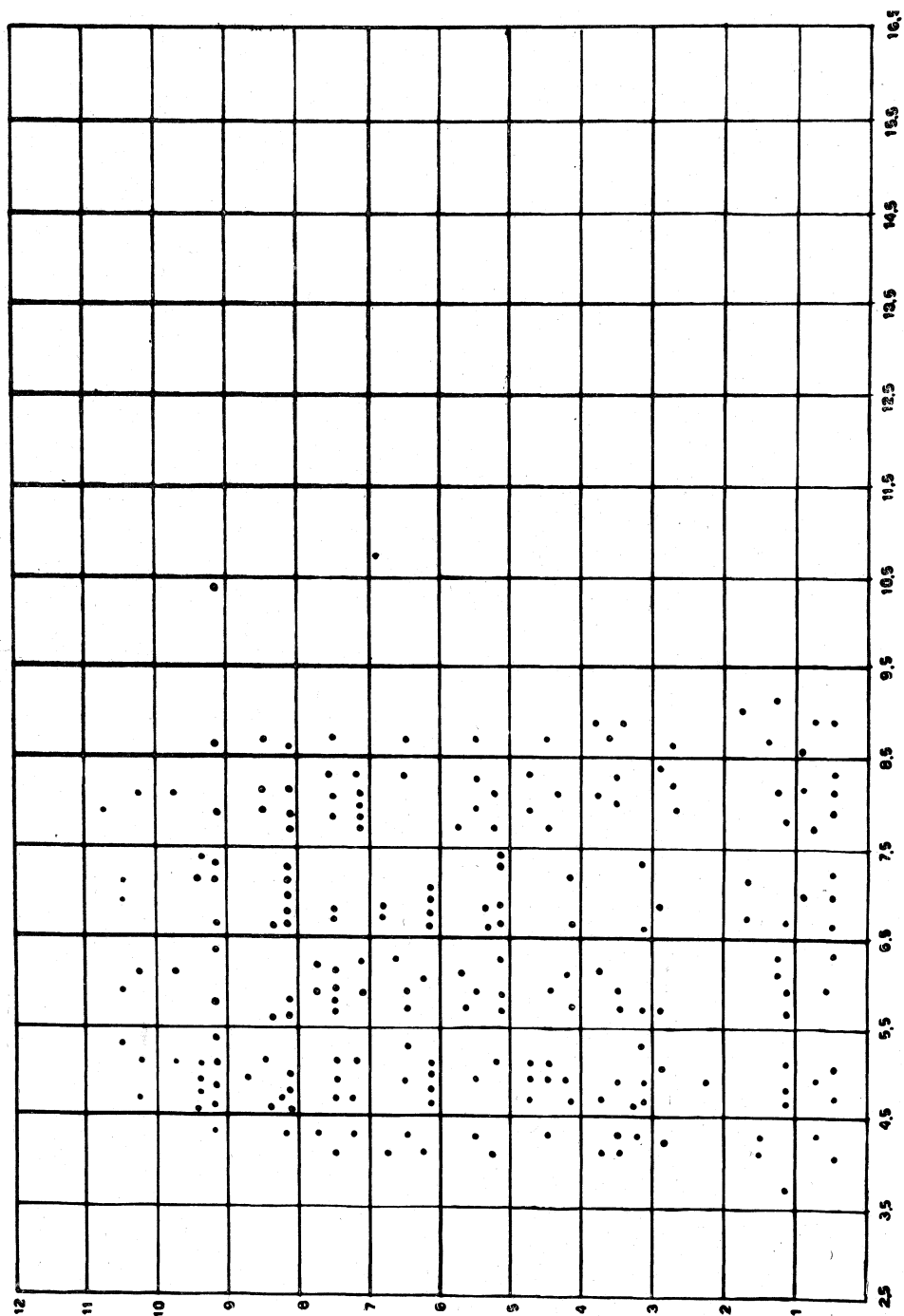
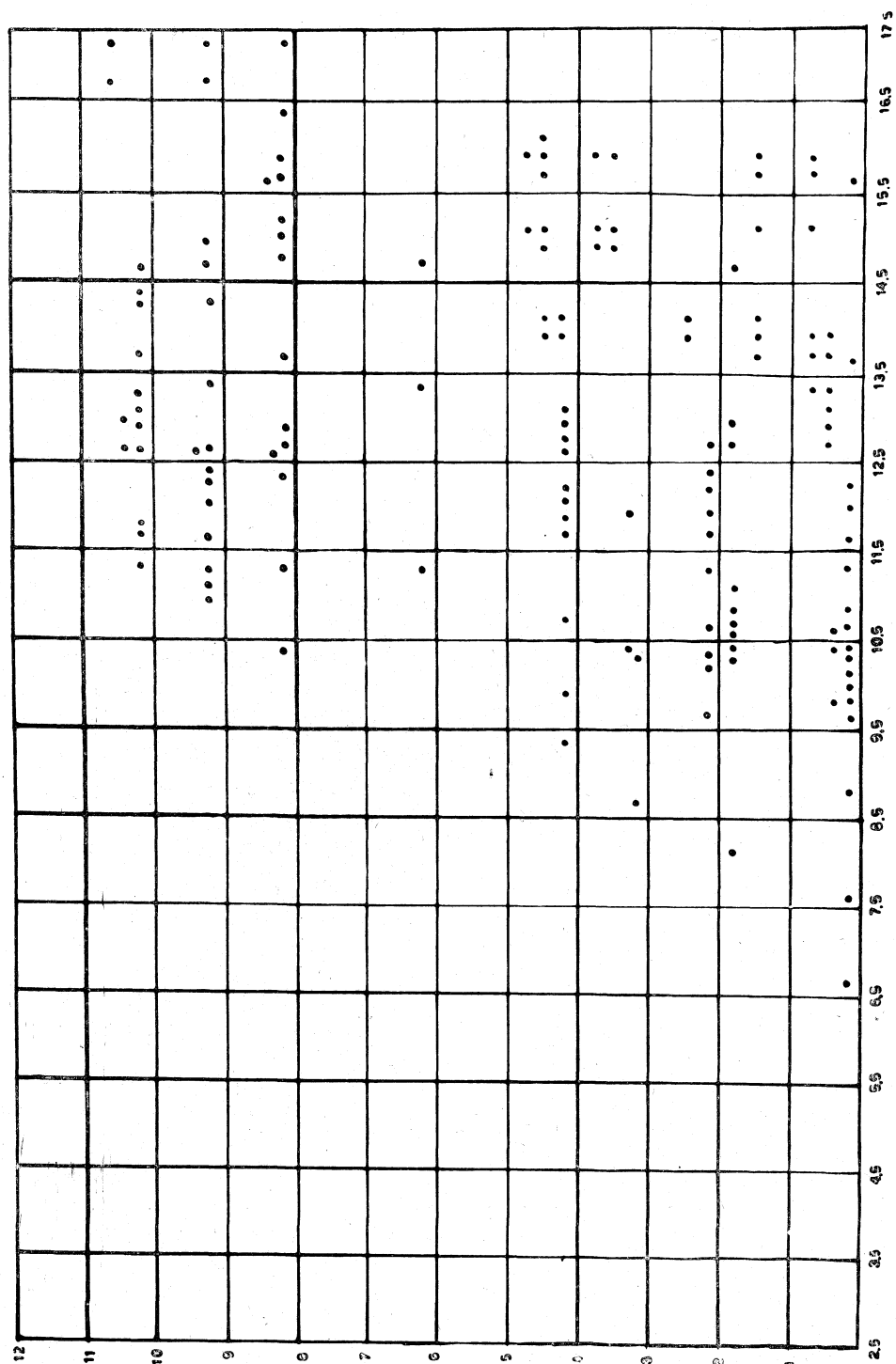


TABELLA III.

In ordinata le ore; in ascissa i valori in μ^2 delle singole classi; i punti rappresentano gli pseudozigoti.



CONCLUSIONI. - Gli ovociti diploidi danno, per anfimissi, zigoti diploidi, le cui dimensioni, come ovvio, corrispondono a quelle degli stessi ovociti. Gli ovociti tetraploidi danno, per pseudogamia, pseudozigoti diploidi, le cui dimensioni sono quelle degli stessi ovociti tetraploidi. Tutti questi elementi superano la 1ª divisione di segmentazione: bisogna pertanto ammettere che lo stesso tipo cellulare può compiere normale mitosi pur con rapporto nucleo-plasmatico variabile entro limiti molto ampi o, in altri termini, che la massa critica (sec. Mazia, 1961) è molto diversa, nei due tipi di elementi, che pure hanno lo stesso numero cromosomico.

Gli ovociti tetraploidi danno, per anfimissi, zigoti triploidi, con dimensioni superiori a quelle degli ovociti da cui provengono, per quanto questi ultimi abbiano più alto grado di ploidia; tali dimensioni corrispondono a quelle degli pseudozigoti triploidi derivati da ovociti esaploidi pseudogamici. Basandoci sulle attuali conoscenze circa il determinismo delle dimensioni cellulari, si può presumere che i geni introdotti in più collo spermio esplicino una *azione immediata* nel regolare le dimensioni; si tratta cioè di un controllo molto precoce, esercitato prima della anfimissi, che avviene in genere alla prometafase o metafase della 1ª divisione di segmentazione. Si potrebbe obiettare che l'incremento di volume sia dovuto alla introduzione della testa spermatica ed al suo rigonfiamento. In tal caso però l'incremento dovrebbe manifestarsi al momento della evoluzione della testa spermatica in pronucleo e non dopo parecchie ore; d'altra parte lo stesso incremento dovrebbe essere visibile nello zigote diploide, che discende da uovo aploide fecondato. Si consideri poi che l'ovocita tetraploide possiede quattro assetti, come ovvio, mentre lo zigote ne possiede solo tre; si deve pertanto ritenere che la segmentazione di uno zigote triploide sia legata ad un determinato rapporto nucleo-plasmatico e che tale rapporto (quando non esiste inizialmente, come nel caso degli pseudozigoti triploidi) si instaura sotto il controllo dei complessi genici in più introdotti colla fecondazione⁽⁹⁾. L'azione genica si rende quindi manifesta solo quando il rapporto fra gli assetti, invece di essere 1 : 1, come di norma, è 2 : 1 o, generalizzando, di più assetti materni contro uno paterno⁽¹⁰⁾. *Il valore della massa critica dello zigote è pertanto superiore a quello dell'ovocita dopo l'auxocitosi, pur avendo l'ovocita grado di ploidia superiore.*

L'azione genica sulle dimensioni non deve essere esprimibile solo come un rapporto di proporzionalità (semplice od esponenziale, a sec. dei vari AA.) ma deve avere una base assai più complessa. Mazia (1961) osserva che i fattori che determinano il potenziale di accrescimento cellulare non sono necessariamente misurabili dal contenuto in DNA o dal numero cromosomico, seb-

(9) Non si può neppure pensare al ristabilimento di un equilibrio turbato dalla emissione dei due polociti, come viene dimostrato dai valori delle dimensioni degli ovociti diploidi e dei loro zigoti.

(10) Ricordo che, pur non essendo stato possibile farne oggetto di ricerca metodica, gli zigoti tetraploidi (provenienti da anfimissi di ovociti esaploidi) accrescono il loro volume rispetto all'ovocita e che simili fatti si hanno in fecondazioni di ibridi interrazziali di *D. bernazzii*.

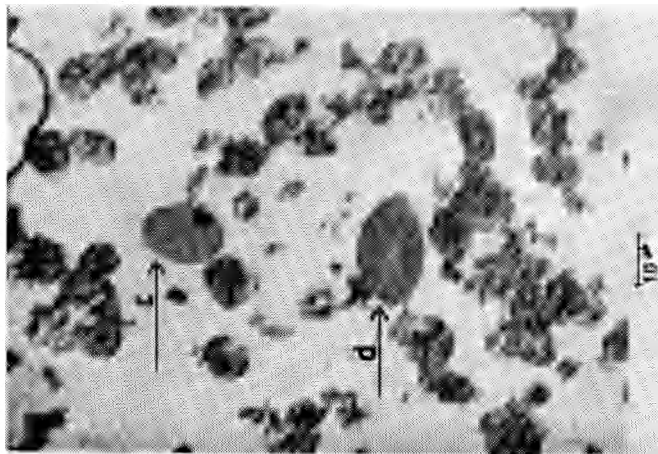


Fig. 2. – Zigoti presenti nello stesso bozzolo.
Le frecce indicano: *c*, pseudozigote a 8 cromosomi da ovocita tetraploide pseudogamico; *d*, zigote a 12 cromosomi da ovocita tetraploide anfinitico.

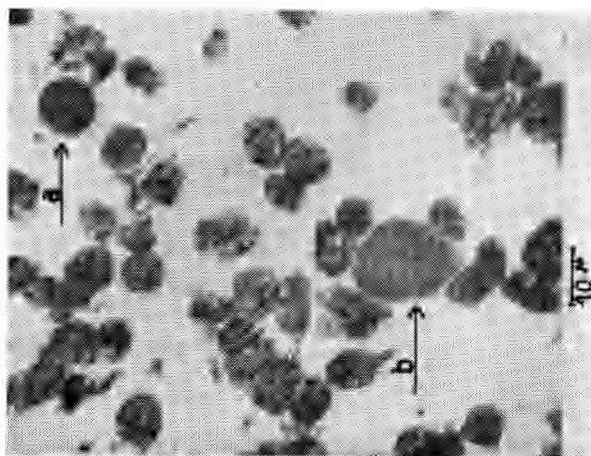


Fig. 1. – Zigoti presenti nello stesso bozzolo.
Le frecce indicano: *a*, zigote a 8 cromosomi da ovocita diploide anfinitico; *b* zigote a 12 cromosomi da ovocita tetraploide anfinitico.

bene siano certamente collegati agli elementi genetici o agiscano parallelamente ad essi. Questa affermazione, dedotta essenzialmente dai risultati di ricerche compiute su protozoi e batteri, può trovare un'altra base nei nostri reperti.

Ricordiamo in ultimo che negli pseudozigoti la testa spermatica può essere precocemente espulsa o restare nello zigote e scomparire durante le prime divisioni di segmentazione. Essa però non evolve in pronucleo, ma appare come un groviglio di filamenti, che possono essere anche contabili, dimostrando il numero base 4; essi non hanno mai l'aspetto di veri cromosomi e soprattutto non sono provvisti di nucleolo. Orbene, in queste condizioni, il DNA dello spermio non esercita alcun controllo sulle dimensioni degli pseudozigoti; fatto che conforta l'affermazione che quando l'uovo è pseudogamico, non vi è alcuna azione, anche se solo precoce, da parte dello spermio, eccetto quella del tutto iniziale di attivare e regolarizzare la meiosi, come risulta da nostre precedenti ricerche. Neppure è paragonabile lo stato dello spermio in uovo pseudogamico con quello dei sopranumerari in uova polispermiche, nelle quali è stata messa in evidenza, almeno in certi casi, una azione genica, se pur localizzata nel tempo (cfr. Waddington, 1956). È vero, tuttavia, che in caso di singamia poliandrica (in topi) la massa stessa del nucleo non pare aumentare (Austin e Braden, 1955); gli Autori affacciano l'esistenza di un meccanismo compensatore piuttosto che una eliminazione di cromosomi, che non è stata vista in casi del genere.

BIBLIOGRAFIA.

- C. R. AUSTIN e A. W. H. BRADEN (citato da MARSHALL'S, *Physiology of Reproduction*, vol. 1^o, parte II, 1960).
- C. BARIGOZZI, « *Scientia Genetica* », vol. 2^o, 42 (1940).
- C. BARIGOZZI e A. DI PASQUALE, « *Heredity* », vol. 7, 389 (1953).
- M. BENAZZI e G. BENAZZI LENTATI, « *Atti Soc. Tosc. Sc. Nat.* », (Ser. B), vol. 66, 45 (1959).
- G. BENAZZI LENTATI, « *Caryologia* », vol. 12^o, 482 (1959).
- G. BENAZZI LENTATI, « *Acta Embriol. Morph. exp.* », vol. 5^o, fasc. 2 (in corso di stampa).
- D. MAZIA, in *The Cell.*, vol. 3^o, 1961, Academic Press. N. York.
- M. MIROLI, « *Atti Soc. Tosc. Sc. Nat.* » (Ser. B), vol. 62, 156 (1956).
- M. MIROLI e A. NOCENTINI, *ibidem*, vol. 66, 58 (1959).
- U. PIERAGNOLI, *ibidem*, vol. 61, 18 (1954).
- C. H. WADDINGTON, in *The Developmental Biology conference series*, The University of Chicago Press, 1956.