
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

VITTORIO PARISI, GIUSEPPE ZANANDREA

Ricerche preliminari sull'impiego dell'immunodiffusione nello studio delle affinità sistematiche nei Petromizoni

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 35 (1963), n.1-2, p. 89-93.*
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1963_8_35_1-2_89_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/>

Zoologia. — *Ricerche preliminari sull'impiego dell'immunodiffusione nello studio delle affinità sistematiche nei Petromizoni* (*). Nota (**) di VITTORIO PARISI e GIUSEPPE ZANANDREA presentata dal Corrisp. P. PASQUINI.

In questo studio preliminare sono state esaminate con tecniche immunologiche le affinità tra le tre specie italiane di *Lampetra*: *L. planeri* (Bloch), *L. fluviatilis* (L.), *L. zanandreae* Vladykov, che sono state confrontate con *Petromyzon marinus* L.

L'esame è stato ristretto al siero; il sangue è stato prelevato direttamente dal cuore di individui provenienti da differenti località (Tabella I).

TABELLA I.

Stazioni e periodo di raccolta.

<i>L. fluviatilis</i>	♀, ♂	Napoli	marzo 1962
<i>L. planeri</i>	♀, ♂, amm.	Pescara	febbraio 1962, Napoli dicembre 1962
<i>L. zanandreae</i>	♀, ♂, amm.	Torino	febbraio 1962
<i>Petromyzon marinus</i>	♀	Napoli	aprile 1962

amm. = ammoceti.

La preparazione degli antisieri è stata eseguita secondo le usuali metodiche: per ogni antisiero sono state fatte 7 iniezioni endovenose a conigli maschi durante un mese; sono stati così preparati due antisieri contro maschi di *L. zanandreae* ed un antisiero contro maschi di *L. fluviatilis* (Tabella II).

TABELLA II.

Antisiero	Numero iniezioni	ml siero iniettato	Periodo
anti- <i>zanandreae</i>	7	0,52	21/2/62-24/3/62
anti- <i>fluviatilis</i>	7	0,50	16/4/62-10/5/62

(*) Lavoro eseguito con contributi del C.N.R. Istituti di Zoologia delle Università statali di Milano e Roma.

(**) Pervenuta all'Accademia il 10 luglio 1963.

Sono state utilizzate micropiastre (diametro dei pozzetti 3 mm, distanza tra essi 2 mm) di agar 1 % sciolto in NaCl 0,9 % tamponato con fosfati a pH 7.

Le piastre sono state tenute per 12 h a 37°C e quindi lavate, essiccate e colorate con Amidoschwarz 10 B.

Le immunoelettroforesi sono state eseguite secondo la metodica di Grabar; le lastre di agar sono state sottoposte per 1 h ad una differenza di potenziale di 11 V per cm e 15 mA per striscia, usando il Gel-Phor. Mediante

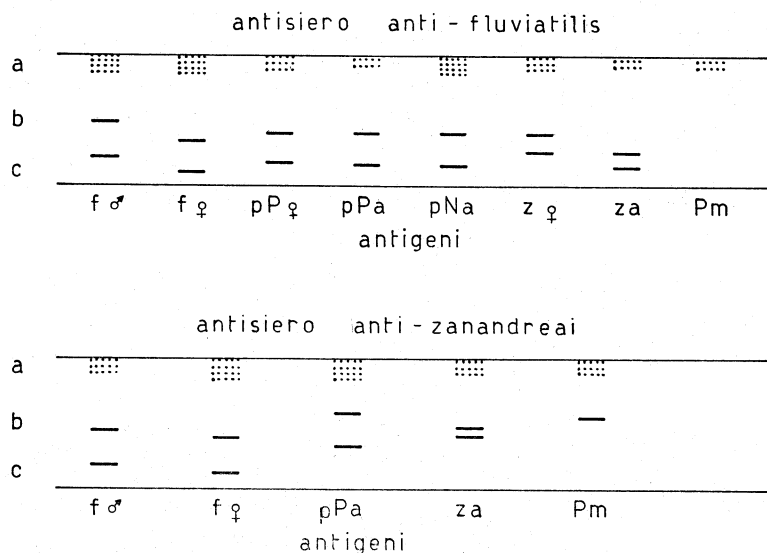


Fig. 1. - Schema delle risposte, in micropiastre, dei sieri dei Petromizzonti.

f ♂ = *fluviatilis* ♂; f ♀ = *fluviatilis* ♀; pP ♀ = *planeri* ♀ di Pescara; pPa = ammoceti di *planeri* di Pescara; pNa = ammoceti di *L. planeri* di Napoli; z ♀ = *zanandreae* ♀; za = ammoceti di *zanandreae*; Pm = *P. marinus*.

l'immunoelettroforesi e le semplici elettroforesi in agar si è controllato la composizione dei sieri.

In alcune prove gli antisieri sono stati assorbiti a 37°C per 1 h e per 12 h a 4°C; sono stati utilizzati vari rapporti Ag/Ab onde avere un assorbimento ottimale.

Il problema principale è stato quello di vedere se le tre specie di *Lam-petra* sono differenziabili con metodo immunologico.

Tuttavia questo problema, data la grande affinità sistematica delle specie in studio, è complicata dalla possibile interferenza del sesso e degli stadi che si utilizzano nei confronti.

Nelle micropiastre i sieri di *L. fluviatilis* e *L. zanandreae* formano contro i propri antisieri tre archi principali: a, b, c, essendo c quello più vicino al pozzetto dell'antigene. La risoluzione di questi tre archi dipende grandemente dalle concentrazioni relative dell'antigene e dell'antisiero; in condizioni ottimali inoltre a si suddivide in due archi.

Questi archi tuttavia non corrispondono a frazioni omogenee ed infatti con l'immunolettroforesi in *L. zanandreae* ad esempio si possono mettere in evidenza almeno 8 archi di precipitazione.

Nella fig. 1 sono schematizzate le risposte delle varie specie; dall'esame di essa emerge subito la grande somiglianza tra le tre specie di *Lampetra* e d'altra parte la netta differenza tra esse e *Petromyzon*.

Confrontando le differenti specie di *Lampetra* (tenendo conto anche degli stadi) si è visto che gli archi corrispondenti per tutte le coppie considerate si uniscono sempre senza dar luogo ad un evidente « spur », (con questo termine si indica la non completa fusione di archi corrispondenti ad antigeni

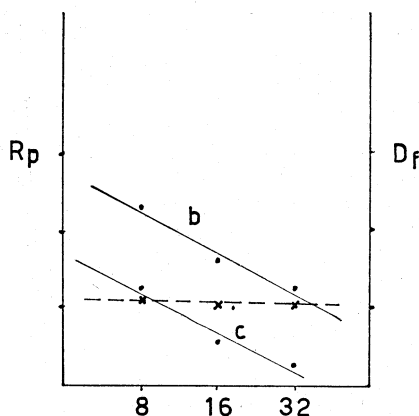


Fig. 2. - Valutazione delle differenze (D_f) tra gli archi *b* e *c*.

Ascisse: diluizione dell'antigene (siero di *L. fluviatilis* ♀ contro antisiero anti-*fluviatilis* ♂); ordinate: R_p = rapporto tra la distanza dei pozzetti e la distanza dell'arco dal pozzetto dell'antigene (linee *a*, *b*); D_f = differenza tra i rapporti relativi agli archi (linea tratteggiata). Si noti come D_f resti costante in questo intervallo di concentrazioni dell'antigene.

non completamente uguali), indicando con ciò una sostanziale identità delle frazioni.

Le differenze tra le varie specie sono a carico: 1° della diversa intensità degli archi di precipitazione (purtroppo non esprimibile in valori quantitativi) e 2° delle differenti concentrazioni relative delle frazioni.

Per quanto concerne il primo punto va detto che gli archi corrispondenti all'antigene omologo sono sempre più intensi di quelli eterologhi.

La determinazione delle concentrazioni relative delle frazioni è stata fatta in base alle seguenti considerazioni: come è noto, se si ha un antigene *a*, la distanza tra arco di precipitazione da esso formato e pozzetto dell'antigene è proporzionale, entro un certo intervallo di concentrazioni, alla concentrazione dell'antigene *a*, naturalmente in condizioni standard.

Se si hanno due antigeni *a* e *b*, e si preparano diverse soluzioni con concentrazioni relative diverse dei due antigeni, si avranno differenti distanze tra gli archi di precipitazione.

Assumendo per dimostrato che in specie vicine un dato antigene ha una stessa velocità di diffusione ed uno stesso punto di equivalenza, si può, dalla misura delle distanze tra gli archi, avere precise informazioni sulle concentrazioni relative dei differenti antigeni.

Nel caso presente ciò può essere fatto con l'unica riserva prima accennata sulla composizione degli archi.

Nella Tabella III sono raggruppati i dati relativi ai due archi *b* e *c* più facilmente misurabili. Nel grafico 2 è riportato un esempio di tali determinazioni.

Per ogni arco è stato determinato il rapporto D_a/D_b (ove D_a distanza tra l'arco ed il pozzetto dell'antigene e D_b distanza tra il pozzetto dell'antigene e quello dell'antisiero) e quindi la differenza tra i rapporti relativi agli archi *b* e *c*.

Questa differenza, entro certi limiti di concentrazione assoluta, è costante per le diverse specie.

TABELLA III.

Differenze tra rapporti dei due archi b e c nelle diverse specie.

Antisiero	Antigene						
	fl. ♂	fl. ♀	p.P. ♀	p.P.am.	p.N. am.	z. ♀	z. am.
anti- <i>fluviatilis</i>	0,294	0,237	0,218	0,297	0,312	0,177	0,155
anti- <i>zanandreae</i>	0,250	0,274		0,225			quasi uniti

fl.: *fluviatilis*; p.P.: *planeri* Pescara, p.N.: *planeri* Napoli, z: *zanandreae*, am.: ammoceti.

Dall'esame della tabella emerge chiaramente come *L. zanandreae* si discosti nettamente dalle altre due specie, questo fatto risulta ancora più evidente nei confronti del proprio antisiero.

Si è voluto vedere se, mediante l'assorbimento, fosse possibile porre in evidenza la presenza di frazioni specie specifiche; le uniche difficoltà incontrate si riferiscono alla scarsità di materiale per cui non è stato possibile attuare tutti i confronti.

Nella Tabella IV viene riportato un esperimento relativo ad ammoceti di *L. planeri* provenienti da Napoli e di *L. zanandreae*.

Gli archi che restano dopo l'assorbimento sono stati indicati con *c'* e *b'* in quanto pur corrispondendo agli archi *c* e *b*, con i quali si uniscono, possono essere diversi da quelli ottenuti con sieri non assorbiti per quanto è stato prima detto sul loro significato.

TABELLA IV.

Risultati degli assorbimenti.

Antisiero	Antigene	
	Ammoceti <i>L. planeri</i>	Ammoceti <i>L. zanandreae</i>
assorbito		
anti- <i>fluviatilis</i>		
{ APN	---	---
{ AZ	b', c'	---
anti- <i>zanandreae</i>		
APN	---	b', c'

APN = ammoceti di *L. planeri* Napoli.AZ = ammoceti di *L. zanandreae*.

--- = nessun arco.

In conclusione i dati fin qui raccolti sembrano autorizzare le seguenti affermazioni:

1° i sieri delle tre specie di *Lampetra* sono in parte differenti dal siero di *P. marinus*;

2° le specie del genere *Lampetra* esaminate sono tra loro molto simili dal punto di vista immunologico e le differenze riscontrate si riferiscono alla diversa intensità degli archi (più intensi gli omologhi), alla differente concentrazione dei vari antigeni ed alla presenza di frazioni in parte dissimili;

3° *L. zanandreae* appare occupare, riguardo al punto 2, una posizione a sé stante come risulta dalla Tabella III e dagli assorbimenti (Tabella IV);

4° tra individui di *L. planeri* provenienti da Napoli e individui della stessa specie raccolti a Pescara non vi sono differenze apprezzabili.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] ADINOLFI M., CHIEFFI G., SINISCALCO M., *Haemoglobin Pattern of the Cyclostome Petromyzon planeri during the course of Development*, « Nature », 184, 1325-1326 (1959).
- [2] CHIEFFI G., SINISCALCO M., ADINOLFI M., *Modificazioni elettroforetiche dell'emoglobina durante lo sviluppo degli Ittiopsidi*, « Acta Embryol. Morphol. Exper. », 3, 338-339 (1960).
- [3] CROWLE A. J., *Immunodiffusion*. Academic Press 1961.
- [4] ZANANDREA G., *Studies on European Lampreys*, « Evolution », 15, 523-534 (1961).