
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

MARIO RATTAZZI

**Gli aminoacidi liberi negli embrioni di *Rana*
esculenta e *Bufo vulgaris*. Determinazione
quantitativa in uova normali e in uova fecondate con
spermi irradiati**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 36 (1964), n.1, p. 75–85.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1964_8_36_1_75_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/>

Embriologia chimica. — *Gli aminoacidi liberi negli embrioni di Rana esculenta e Bufo vulgaris. Determinazione quantitativa in uova normali e in uova fecondate con spermatozoi irradiati* (*). Nota di MARIO RATTAZZI, presentata (**) dal Corrisp. G. MONTALENTI.

Nel corso dello sviluppo embrionale, la gastrulazione rappresenta uno stadio critico, durante il quale è possibile mettere in evidenza l'inizio della sintesi dell'RNA [1, 2, 3], di numerosi enzimi [4, 5 a, 5 b], di nuove proteine [6, 7, 8, 9, 10, 11], e l'aumento notevole della scissione del materiale vitellino ad opera delle catepsine [12].

È noto come disturbi maggiori o minori avvengano « spontaneamente » alla gastrulazione in una certa percentuale degli embrioni di anfibi, e come tutti o quasi i trattamenti sperimentali ai quali le uova fecondate possono venire sottoposte diano luogo a malformazioni riportabili a disturbi della gastrulazione. Né diverso effetto ha la fecondazione delle uova con spermatozoi eterologhi (ibridazione) o sottoposti all'azione di raggi X: gli embrioni che ne risultano cessano di svilupparsi allo stadio di blastula avanzata o inizio di gastrula.

Quale sia il denominatore comune di questi fenomeni non è noto, ma è verosimile che gli acidi nucleici ed i meccanismi di sintesi proteiche debbano esservi implicati [12, 13]. In particolare numerosi lavori a carattere biochimico o citochimico sugli ibridi letali hanno mostrato che il metabolismo degli acidi nucleici è profondamente alterato sia per quel che riguarda il DNA [14, 15], sia l'RNA [16, 17, 18, 19, 20, 21]. Assai meno studiato è, invece, il metabolismo proteico degli ibridi letali: la Metzger [22] ha dimostrato negli ibridi *R. pipiens* ♀ × *R. silvatica* ♂ la caduta del livello di attività della fosfoproteinfosfatasi alla gastrulazione; Ranzi [11] ha dimostrato, col metodo della salatura frazionata, che le proteine degli ibridi *B. viridis* ♀ × *B. vulgaris* ♂ hanno caratteri fisicochimici simili a quelli delle proteine di embrioni trattati con cloruro di litio; e, con metodi immunologici, che si nota in questi ibridi un ritardo della comparsa degli antigeni materni.

Mancano, invece, dati biochimici sugli effetti della fecondazione di uova normali con spermatozoi irradiati (peraltro assai ben studiati dal punto di vista morfologico [23, 24 a, b, 25]), se si eccettua il lavoro su soggetto affine del Brachet [22 e 16], il quale trovò che, nelle uova di *Rana* fecondate con spermatozoi esposti all'azotoiprite l'incorporazione di glicina nelle proteine era assai maggiore che nei controlli.

(*) Ricerca eseguita presso l'Istituto di Genetica dell'Università di Napoli, diretto dal prof. Giuseppe Montalenti, usufruendo di una borsa di studio del C.N.E.N.

(**) Nella seduta dell'11 gennaio 1964.

Mi è parso, perciò, interessante indagare sulle eventuali alterazioni del metabolismo proteico negli embrioni il cui sviluppo è bloccato a causa dell'irradiazione degli spermatozoi, prendendo in considerazione le possibili variazioni qualitative o quantitative nel *pool* degli aminoacidi liberi, e ciò allo stadio di gastrula, quando più evidenti sono gli effetti del trattamento.

MATERIALE E TECNICHE.

Sono state usate, per questa ricerca, uova di *Rana esculenta* e *Bufo vulgaris*, ottenute da esemplari in accoppiamento e, per *Rana*, anche con ovulazione provocata [27].

Gli spermatozoi sono stati ottenuti tritando i testicoli degli animali in capsule di vetro, senza aggiungere acqua o soluzione di Ringer. Di ogni coppia di testicoli, uno forniva spermatozoi per l'irradiazione e l'altro era usato per i controlli.

L'irradiazione è stata eseguita con un apparecchio da plesioterapia (230 V, 5 mA, distanza *f/0* 48 mm, 0,1 Cu, 200 r/m, esp. 6') per una dose di 1200 roentgen; misure con dosimetro a ionizzazione d'aria.

Dopo l'irradiazione gli spermatozoi, mobilizzati con acqua di fonte, erano usati per la fecondazione secondo la tecnica di Rugh [28]. Avvenuta la rotazione delle uova, i beckerini che le contenevano venivano chiusi con una rete di nailon e posti in acqua corrente ($14^{\circ}\text{C} \pm 1$). Le uova di controllo venivano raccolte allo stadio di tappo vitellino, e le uova trattate sei ore dopo, così da escludere quelle che si sviluppavano normalmente (10% circa). Liberata dalla gamba e asciugata su carta bibula, le uova erano poste in provette (50 uova di *Rana* e 10 di *Bufo* per provetta) e omogenate in presenza di 1 ml di acido tricloroacetico al 10%. Questo era allontanato con sei lavaggi in etere solforico (5 ml, 3000 giri \times 2'), ottenendosi anche una parziale estrazione dei lipidi [29]. Dopo centrifugazione, a 20.000 giri per 15', il soprannatante veniva rimosso e conservato a -20°C insieme a quello dei due successivi lavaggi con acqua distillata (5' a 20.000 giri). Le soluzioni di aminoacidi così ottenute venivano desalificate col metodo elettroforetico di Nicol [30] modificato (tampone acetato di ammonio a pH 10,8 e pH 3; estrazione sotto vuoto a 50° per 24 h; eluizione con alcool isopropilico al 10% in acqua).

Le cromatografie, bidimensionali, sono state eseguite su carta Whatman 3MM (cm 40×50), analizzando, in ogni cromatografia, la miscela di aminoacidi estratta, per *Rana*, da 50 uova e, per *Bufo*, da 10 uova.

Primo solvente: butanolo, ac. acetico, acqua 12:3:5; secondo solvente: fenolo, soluzione satura in acqua [31]. Il secondo solvente veniva allontanato con un lavaggio con etere solforico [32].

I cromatogrammi venivano trattati con ninidrina (0,5% in acetone) e il colore sviluppato a freddo (2 h) e rinforzato a caldo (100° , 15').

Gli aminoacidi sono stati identificati aggiungendo alla miscela in esame aminoacidi noti, in eccesso (0,1 ml di soluzioni contenenti 5 micromoli/ml di

ogni aminoacido). Gli aminoacidi noti, scelti a gruppi di quattro con R_f ben diversi l'uno dall'altro, davano macchie più dense che si sovrapponevano a quelle del campione da esaminare, permettendone l'identificazione.

Le macchie venivano eluite individualmente con alcool etilico (50% in acqua), e l'eluato portato a volume di 4 ml. I solventi usati per la cromatografia non hanno permesso, in alcuni casi, di eluire separatamente cistina e cisteina, glicina e serina, valina e metionina, per cui questi aminoacidi sono stati misurati a coppie.

Il « bianco » era dato dall'eluato di una zona del cromatogramma di area pari a quella media delle macchie.

L'intensità del colore delle soluzioni è stata determinata con lettura allo spettrofotometro (Beckman DU 2400) a 570 $m\mu$. Come standard venivano usati gli eluati di tre macchie, ottenute con quantità crescenti (0,02 ml; 0,06 ml; 0,1 ml) di una soluzione di leucina (1 micromole/ml) deposte su ogni cromatogramma prima della colorazione con ninidrina [33, 34].

È stata inoltre eseguita la determinazione dell'azoto totale in lotti di dieci uova, sia normali che trattate, con nesslerizzazione diretta e lettura allo spettrofotometro a 450 $m\mu$; curva di taratura: quantità note di solfato d'ammonio.

RISULTATI.

Dal lato morfologico, i risultati ottenuti sono sovrapponibili ai dati di Rugh [25] il quale, con la stessa dose da noi usata (1200 r) otteneva una percentuale lievemente minore di esogastrule, ma usando raggi X non filtrati e perciò meno penetranti.

Nei nostri esperimenti, il 90 % delle uova trattate cessava di svilupparsi allo stadio di gastrula e, se non utilizzato per la determinazione degli aminoacidi, andava incontro a degenerazione dopo circa 24 ore. Il rimanente 10 % si sviluppava in maniera anormale, dando luogo ad embrioni mostruosi del tipo descritto da Rugh (loc. cit.).

Per quel che riguarda gli aminoacidi liberi degli embrioni *normali*, i risultati sono in accordo con i pochi dati che oggi si hanno sull'argomento. Nella Tabella I sono riportati gli aminoacidi trovati in Rana e Bufo, insieme ai dati di Kutsky [35], per *Rana pipiens*, della Deuchar [36] per *Xenopus laevis*, di Chen [37] per *Triton alpestris*.

Come si vede, ogni aminoacido presente in Bufo e Rana è presente in una o più delle specie già studiate. L'acido cisteico è probabilmente prodotto dall'ossidazione della cisteina, dovuta al metodo di desalficazione usato.

Dal lato quantitativo, è interessante notare come in Rana la treonina sia particolarmente abbondante, mentre in Bufo la concentrazione dei vari aminoacidi è piuttosto uniforme. I risultati sono schematizzati nelle figg. 1 e 2, nelle quali l'altezza di ogni colonnina è proporzionale ai valori delle letture allo spettrofotometro. Si noti, nella fig. 1 (Rana) la presenza di un composto non identificato, che è comparso in quantità non misurabile accanto all'acido aspartico con valori di R_f uguali a quelli della glutammina.

TABELLA I.

Aminoacidi liberi presenti nelle uova di varie specie di anfibii secondo i dati di Kutsky (K), Deuchar (D), Chen (C) e della presente ricerca (R).

AMINOACIDO	<i>Rana</i> <i>esc.</i> (R)	<i>Rana</i> <i>p.</i> (K)	<i>Bufo</i> <i>vulg.</i> (R)	<i>Hyla</i> <i>r.</i> (K)	<i>Xenopus</i> <i>L.</i> (D)	<i>Triton</i> <i>al.</i> (C)
Alanina	X	X	X	X		X
Alfa alanina					X	
Beta alanina					X	
Arginina	X	X	X	X		X
Acido aspartico	X	X	X	X	X	X
Acido cisteico	X		X			
Cisteina	X		X			
Cistina	X		X		X	X
Fenilalanina	X	X	X	X		
Glicina	X	X	X	X	X	X
Ac. glutammico	X	X	X	X	X	X
Glutammina	?	X		X	X	
P-aminobutirrico						X
Isoleucina	X	X	X	X		X
Istidina			X			X
Leucina	X	X	X	X	X	X
Lisina	X	X	X	X		X
Metionina	X	X sulf. X?	X			X
Prolina						X
Serina	X	X	X	X		X
Tirosina		X		X		X
Treonina	X	X	X	X		X
Valina	X	X	X	X	X	X

Il confronto tra gli aminoacidi liberi presenti nelle uova normali e nelle uova trattate ha dato i seguenti risultati.

In *Rana*, nelle uova *trattate* sono aumentati acido aspartico, valina + metionina, fenilalanina, cistina + cisteina, ac. glutammico, glicina + serina,

leucina + isoleucina; aumentato è pure il composto non identificato; compare in tracce l'istidina (non dimostrabile nei controlli); diminuiti risultano invece acido cisteico e treonina, ed è scomparsa l'alanina.

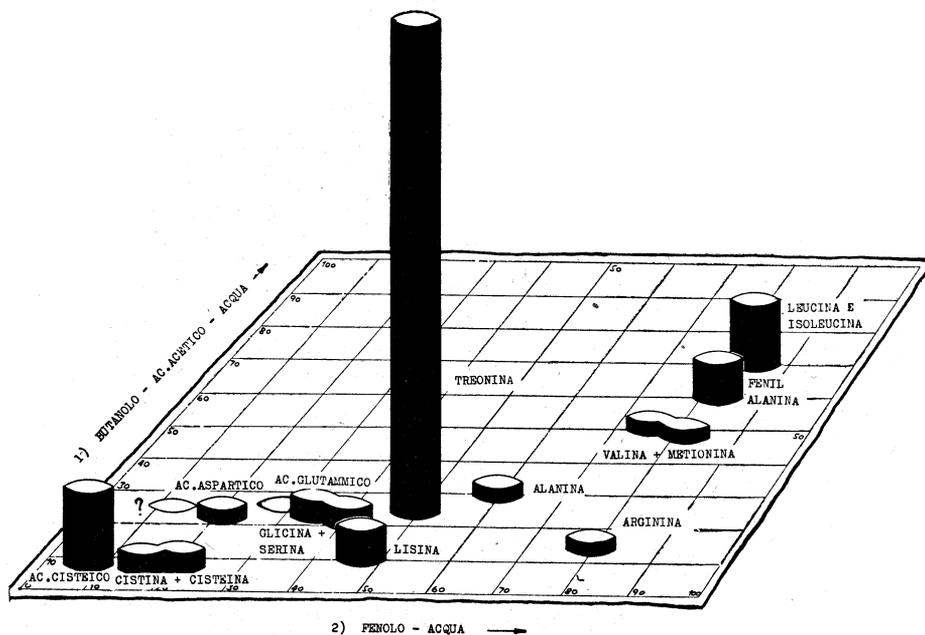


Fig. 1. - Schema quantitativo del contenuto in aminoacidi liberi di 50 uova di Rana.

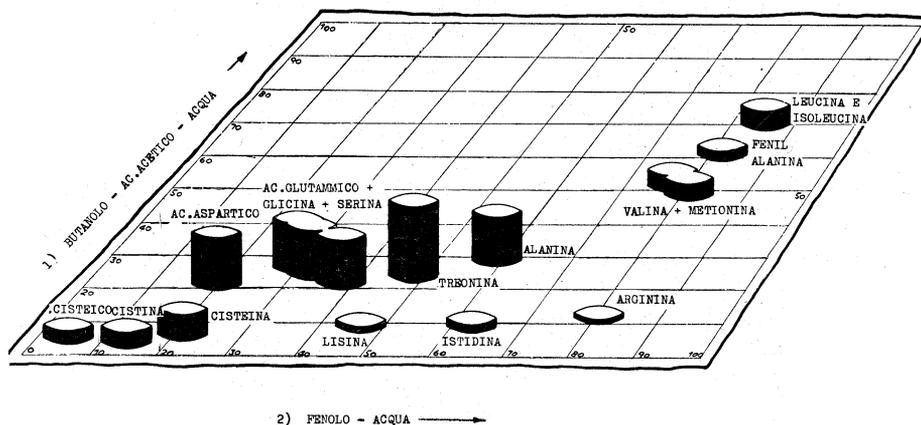


Fig. 2. - Schema quantitativo del contenuto in aminoacidi liberi di 10 uova di Bufo.

I dati numerici del confronto sono riportati nella Tabella II, in cui la quantità di ogni aminoacido è espressa in millimicromole di leucina. I valori rappresentano la media delle determinazioni eseguite su dodici cromatografie per le uova controllo e dodici per le uova trattate (Tot.: 1200 uova

di Rana e 240 uova di Bufo). Si noti come le differenze tra controlli e trattati siano altamente significative all'analisi statistica (metodo del T di Student). I dati della tabella sono schematizzati nella fig. 3, in cui, per ogni aminoacido, la mezza colonna di sinistra rappresenta il valore trovato nei trattati e la mezza colonna di destra quello dei controlli

TABELLA II.

Contenuto in aminoacidi liberi di 50 uova di Rana normali (cont.) e 50 uova trattate (trat.) e confronto delle differenze.

(12 + 12 cromatografie; tot.: 1200 uova).

AMINOACIDO	Lotto	Media contenuto in millimicromoli di leucina	Confronto	« P » della differ.
Ac. cisteico	cont. trat.	47.360 ± 0,84 37.288 ± 1,60	Diminuito nei trat.	< 0,001
Cistina + cisteina	cont. trat.	23.256 ± 1,00 35.596 ± 1,56	Aumentato nei trat.	< 0,001
Ac. aspartico	cont. trat.	8.912 ± 1,64 24.208 ± 1,40	Aumentato nei trat.	< 0,001
Ac. glutamm.	cont. trat.	non misurabile 94.564 ± 3,00	Aumentato nei trat.	
Glicina + serina	cont. trat.	26.948 ± 1,96 47.940 ± 2,24	Aumentato nei trat.	< 0,001
Lisina	cont. trat.	21.464 ± 0,84 34.912 ± 1,52	Aumentato nei trat.	< 0,001
Treonina	cont. trat.	303.520 ± 15,96 220.376 ± 2,84	Diminuito nei trat.	< 0,001
Alanina	cont. trat.	8.916 ± 1,63 assente	Assente nei trat.	
Istidina	cont. trat.	assente non misurabile	Compare nei trat.?	
Arginina	cont. trat.	7.964 ± 1,36 30.272 ± 1,56	Aumentato nei trat.	< 0,001
Valina + metionina	cont. trat.	14.452 ± 1,60 30.428 ± 1,20	Aumentato nei trat.	< 0,001
Fenilalanina	cont. trat.	23.416 ± 1,32 105.372 ± 5,04	Aumentato nei trat.	< 0,001
Leucina + isoleucina	cont. trat.	39.448 ± 1,48 55.324 ± 2,56	Aumentato nei trat.	< 0,001
Non identif. (glutamina?)	cont. trat.	non misurabile 33.332 ± 4,32	Aumentato nei trat.	

In Bufo, nelle uova *trattate*, sono aumentati : cistina, cisteina, ac. cisteico, lisina, istidina, arginina, valina + metionina, fenilalanina, leucina + isoleucina ; compare un composto non identificato (con i valori di Rf della ciste-

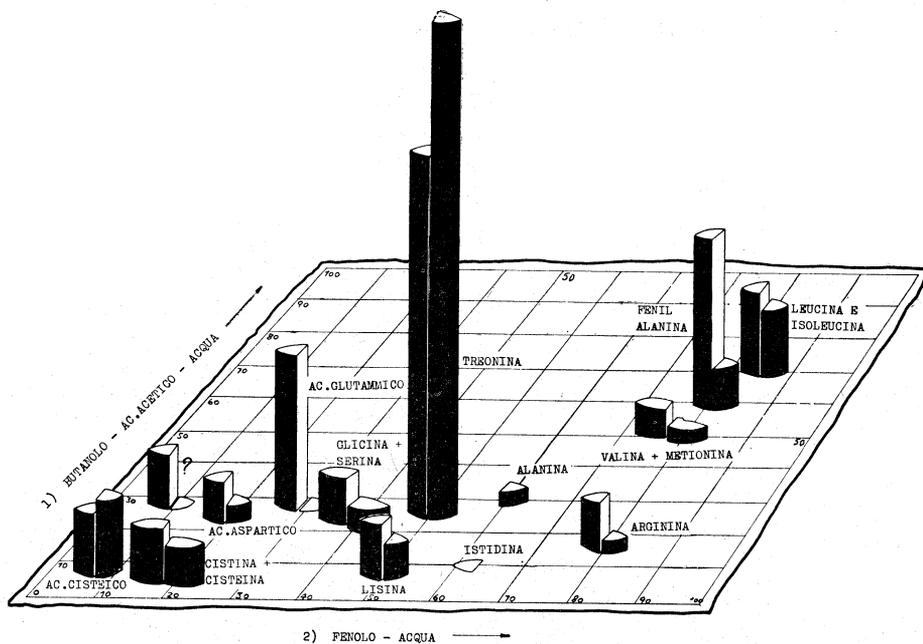


Fig. 3. - Schema quantitativo delle differenze in aminoacidi liberi di 50 uova di Rana normali (a destra) e 50 uova trattate (a sinistra).

amina) non dimostrabile nei controlli ; sono diminuiti invece : acido aspartico, treonina, il gruppo ac. glutammico + glicina + serina ; è, come in Rana, scomparsa l'alanina.

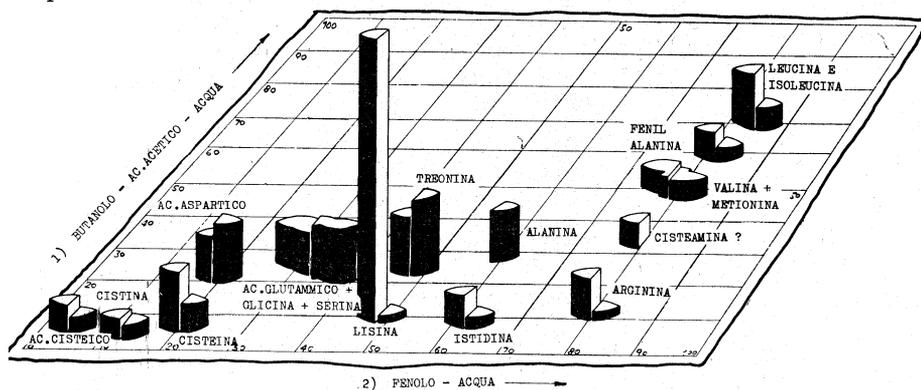


Fig. 4. - Schema quantitativo delle differenze in aminoacidi liberi di 10 uova di Bufo normali (a destra) e 10 trattate (a sinistra).

I dati numerici sono riportati nella Tabella III per cui valgono le stesse osservazioni fatte per la Tabella II. Va rilevato, però, che le differenze di contenuto in valina + metionina e cistina non sono statisticamente signi-

ficative. I dati della tabella sono schematizzati nella fig. 4 (a sinistra i valori dei trattati, a destra quelli dei controlli).

TABELLA III.

Contenuto in aminoacidi liberi di 10 uova di Bufo normali (cont.) e 10 uova trattate (trat.) e confronto delle differenze.

(12 + 12 cromatografie, tot.: 240 uova).

AMINOACIDO	Lotto	Media contenuto in millimicromoli di leucina	Confronto	« P » della differ.
Ac. cisteico	cont. trat.	8.419 ± 1,08 12.844 ± 1,40	Aumentato nei trat.	< 0,01
Cistina	cont. trat.	9.048 ± 0,92 9.672 ± 0,56	Aumentato nei trat.	< 0,1 non sign.
Ac. aspartico	cont. trat.	33.476 ± 0,92 26.012 ± 1,72	Diminuito nei trat.	< 0,001
Cisteina	cont. trat.	16.628 ± 2,12 36.124 ± 1,04	Aumentato nei trat.	< 0,001
Glicina + serina + ac. glu- tammico	cont. trat.	88.323 ± 2,92 76.636 ± 2,08	Diminuito nei trat.	< 0,001
Lisina	cont. trat.	4.340 ± 0,48 172.824 ± 8,48	Aumentato nei trat.	< 0,001
Treonina	cont. trat.	46.916 ± 12,16 34.028 ± 2,04	Diminuito nei trat.	< 0,01
Alanina	cont. trat.	30.872 ± 2,04 assente	Assente nei trat.	
Istidina	cont. trat.	4.872 ± 0,48 15.768 ± 0,64	Aumentato nei trat.	< 0,001
Arginina	cont. trat.	3.181 ± 2,20 24.952 ± 1,00	Aumentato nei trat.	< 0,001
Valina + metionina	cont. trat.	21.448 ± 1,08 22.520 ± 1,00	Aumentato nei trat.	< 0,1 non sign.
Non identif.	cont. trat.	assente 15.172 ± 1,56	Compare nei trat.	
Fenilalanina	cont. trat.	5.612 ± 1,24 16.252 ± 0,88	Aumentato nei trat.	< 0,001
Leucina + isoleucina	cont. trat.	12.396 ± 1,76 29.276 ± 0,52	Aumentato nei trat.	< 0,001

Complessivamente, le differenze osservate tra controlli e trattati sono fino ad un certo punto concordanti nelle due specie: la maggior parte degli aminoacidi, infatti, è aumentata nei trattati, sia pure in proporzioni diverse, ed in entrambe le specie è diminuita la treonina e scomparsa l'alanina. Discordanti, invece, sono i valori dell'acido cisteico (aumentato in Bufo, diminuito in Rana) e dell'acido aspartico, acido glutammico-serina-glicina (diminuiti in Bufo, aumentati in Rana).

Va notato, inoltre, che l'aumentata concentrazione di quasi tutti gli aminoacidi non è dovuta a differenze di volume tra le uova controllo e le uova trattate. La determinazione dell'azoto totale, infatti, ha dato i valori riportati nella Tabella IV, con differenze statisticamente non significative.

TABELLA IV.

Azoto totale in uova di Rana e di Bufo.

(Sei determinazioni con dieci uova trattate e dieci controllo).

	Trattati	Controlli
Rana	mg 1,470 ± 0,003	mg 1,472 ± 0,004
Bufo	mg 2,503 ± 0,002	mg 2,502 ± 0,003

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.

La concentrazione dei singoli aminoacidi liberi, nel corso dello sviluppo dell'embrione di anfibio, presenta notevoli variazioni da stadio a stadio [35, 36, 37, 38].

Si può, in generale, dire che acido aspartico, acido glutammico e glicina, presenti in quantità notevole all'inizio della segmentazione, diminuiscono gradualmente fino a raggiungere un livello minimo allo stadio di gastrula. Triptofano, leucina e valina, invece, si mantengono ad un livello piuttosto basso fino alla gastrulazione, per aumentare in seguito. I rimanenti aminoacidi, però, non seguono un andamento comune, ma presentano oscillazioni notevolmente diverse da specie a specie.

Si può, quindi, ragionevolmente pensare che la scissione delle proteine del vitello (da cui con ogni probabilità deriva direttamente la maggior parte degli aminoacidi liberi dell'embrione) proceda in modo relativamente indipendente dalla sintesi di nuove proteine; o, quanto meno, che esistano delle soglie minime e massime al di là delle quali scatta un sistema di attivazione o di inibizione delle scissioni. Se così non fosse, la concentrazione dei vari aminoacidi dovrebbe rimanere più o meno costante nel tempo. I

dati di Gustavson e Hjelte [39] e di Kavanau [40, 41] sul riccio di mare, sembrerebbero confermare un tale punto di vista.

L'ipotesi che dette l'avvio a questa ricerca era che le numerose mutazioni, sia geniche sia cromosomiche, prodotte dall'irradiazione nel genoma dello spermatozoo, inibissero il normale differenziamento dell'uovo principalmente attraverso un blocco delle sintesi proteiche. Per quanto detto sopra, era logico attendersi un aumento della concentrazione degli aminoacidi a monte del blocco metabolico. I dati raccolti sembrano, fino ad un certo punto, in accordo con l'ipotesi.

Sia in Rana sia in Bufo, infatti, la maggior parte degli aminoacidi subisce un aumento nelle uova trattate. Questo non è uniforme per tutti gli aminoacidi, e per qualcuno è particolarmente notevole (in Rana: acido glutammico, fenilalanina, composto non identificato; in Bufo: lisina, ac. cisteico, ved. figg. 3 e 4) e riflette probabilmente un diverso ritmo di scissione e di utilizzazione di questi composti, o eventualmente una loro aumentata (o anormale?) sintesi.

Gli aminoacidi che, apparentemente assenti nei controlli, compaiono solo nei trattati (istidina in Rana, cisteamina? in Bufo) sono forse presenti anche nelle uova normali, ma in quantità tali da rimanere al disotto dei limiti di risoluzione della tecnica impiegata.

L'ipotesi di un semplice accumulo di metaboliti a monte del blocco dei processi di sintesi è invece contraddetta dalla diminuzione, nelle uova trattate, di alcuni aminoacidi (in Rana: treonina ed alanina; in Bufo: ac. aspartico, ac. glutammico + glicina + serina, treonina, alanina). Anche qui, la diminuzione non è uniforme, ma particolarmente sensibile, in entrambe le specie, per l'alanina, che apparentemente scompare nelle uova trattate. È però possibile pensare, per spiegare queste diminuzioni, che gli aminoacidi in questione vengano utilizzati per altri processi metabolici (deaminazione e glicogenesi, transaminazioni) o incorporati in proteine incomplete o abnormi.

È interessante ricordare che Roodyn e Mandel [42] hanno dimostrato come, in *Bacillus cereus*, bloccando la crescita dei batteri con 8-azaguanina, l'assorbimento della metionina, della cistina, della lisina, della valina e dell'istidina è inibito, quello dell'acido aspartico e della leucina non è modificato, mentre l'assorbimento della serina e dell'alanina è fortemente aumentato. Secondo gli Autori, tale risultato suggerisce, più che un blocco totale delle sintesi proteiche, una loro disorganizzazione.

Anche i dati qui presentati permettono di giungere soltanto ad una simile conclusione. Indubbiamente, il metabolismo proteico dell'uovo è gravemente danneggiato per effetto dell'irradiazione dello spermatozoo. Il danno può derivare da fattori diversi: diminuita o cessata incorporazione di aminoacidi nelle proteine, aumentata sintesi di alcuni aminoacidi, diminuita sintesi di altri, diversa utilizzazione di altri ancora, formazione di proteine anomale non utilizzabili dalla cellula.

Non è per ora possibile stabilire quali o quanti di questi fattori, e in quale misura, siano responsabili dei fenomeni osservati.

L'autore desidera ringraziare il prof. Eduardo Scarano per le critiche ed i suggerimenti che gli ha dato durante lo svolgimento di questo lavoro.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] J. BRACHET, « Enzymologia », 10, 87 (1941).
 [2] P. B. KUTSKY, « J. Exper. Zool. », 115, 429 (1950).
 [3] D. E., ROUNDS, R. A. FLICKINGER, « J. Exper. Zool. », 137, 479 (1958).
 [4] S. LØVTRUP, « C. R. Carlsberg, Lab. sect. chem. », 29, 262 (1955).
 [5] a) URBANI, « Ric. Sci. », 27, 1549 (1957); b) URBANI, « Rend. Istituto Lombardo », 829, 69 (1957).
 [6] F. FRIEDBERG, R. M. EAKIN, « J. Exper. Zool. », 110, 33 (1949).
 [7] R. M. EAKIN, P. KUTSKY, W. BERG, « Proc. Soc. Exp. Biol. Med. », 78, 502 (1951).
 [8] M. TIEDERMANN, « Naturwiss. », 41, 535 (1954).
 [9] R. S. COOPER, « J. Exper. Zool. », 107, 397 (1948).
 [10] R. M. CLAYTON, « J. Embryol. Exp. Morphol. », 1, 25 (1953).
 [11] S. RANZI, « Année Biol. », 33, 523 (1957).
 [12] E. M. DEUCHAR, « J. Embryol. Exp. Morphol. », 6, 223 (1958).
 [13] J. BRACHET, *The Biochemistry of development*, Pergamon Press, London (1960).
 [14] B. C. MOORE, « J. Morphol. », 101, 227 (1957).
 [15] J. R. GREGG, S. LØVTRUP, « Biol. Bull. », 108, 29 (1955).
 [16] J. BRACHET, « Arch. Biol. », 65, 1 (1954).
 [17] T. J. KING, R. BRIGGS, « Anat. Rec. », 117, 556 (1953).
 [18] B. C. MOORE, « J. Morphol. », 101, 209 (1957).
 [19] M. STEINERT, « Bull. Soc. Chim. Biol. », 33, 549 (1951).
 [20] P. S. CHEN, « Experientia », 10, 182 (1954).
 [21] F. ZELLER, « Roux Arch. Entw. Mech. », 148, 311 (1956).
 [22] L. METZGER-FREED, « Jour. Cell. Comp. Physiol. », 135, 75 (1954).
 [23] C. R. BARDEEN, « J. Exper. Zool. », 4, 1 (1907).
 [24] a) O. HERTWIG, « Sitzugsb. K. Pruss. Akad. Wiss. », 24, Feb., 23 Juli 1910; b) O. HERTWIG, « Arch. Mikrosk. Anat. », 77, 1 e 97 (1911).
 [25] R. RUGH, « Proc. Am. Phil. Soc. », 81 [3], 447 (1939).
 [26] J. BRACHET, *Biochemical Cytology*, Academic Press, New York (1957).
 [27] L. S. RAMASWANI, A. B. LAKSMAN, « Nature », 131, 1210 (1958).
 [28] R. RUGH, *Experimental Embryology*, Burgen, Minneapolis (1948).
 [29] R. M. L. DAWSON et al., *Data for biochemical research*, University Press, Oxford (1959).
 [30] J. C. NICOL, « Science », 129, 1549 (1959).
 [31] J. SMITH, *Chromatographic techniques*, Heinemann, London (1958).
 [32] L. FOWDEN, J. R. PENNEY, « Nature », 165, 846 (1950).
 [33] R. J. BLOCK, K. W. WEISS, *Aminoacid handbook*, Thomas, Springfield (1956).
 [34] R. J. BLOCK, E. L. DURRUM, G. ZWEIG, *A manual of paper chromatography and paper electrophoresis*, Academic Press, New York (1955).
 [35] P. KUTSKY et al. « J. Exp. Zool. », 124, 263 (1953).
 [36] B. M. DEUCHAR, « Nature », 176, 259 (1955).
 [37] P. S. CHEN, « Exp. Cell Res. », 10, 675 (1956).
 [38] E. M. DEUCHAR, « Biol. Rev. », 37, 378 (1962).
 [39] T. GUSTAFSON, M. B. HJELTE, « Exp. Cell Res. », 2, 474 (1951).
 [40] J. L. KAVANAU, « J. Exper. Zool. », 122, 285 (1953).
 [41] J. L. KAVANAU, « Exp. Cell. Res. », 7, 530 (1954).
 [42] D. V. ROODYN, M. G. MANDEL, « Feder. Proc. », 18, 439 (1959).