

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

# RENDICONTI

---

VITTORIO PARISI, SANDRA SCAGNETTI, MARA  
BOZZOLATI, MARINA FAGLIONI

## Ricerche sulle proteine dell'emolinfa e dell'uovo di *Austropotamobius pallipes* (Ler.)

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 46 (1969), n.2, p. 209–212.*  
Accademia Nazionale dei Lincei

<[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1969\\_8\\_46\\_2\\_209\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1969_8_46_2_209_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/>



### SEZIONE III

(Botanica, zoologia, fisiologia e patologia)

**Zoologia.** — *Ricerche sulle proteine dell'emolinfa e dell'uovo di Austropotamobius pallipes (Ler.)*. Nota di VITTORIO PARISI (\*), SANDRA SCAGNETTI, MARA BOZZOLATI e MARINA FAGLIONI, presentata (\*\*) dal Corresp. S. RANZI.

SUMMARY. — An electrophoretic and immunological study on the crayfish hemolymph, carried out in various periods of the year, has made it possible to prove the presence of ovo-verdin in female hemolymph at the vitellogenesis stage.

This suggests that ovo-verdin, presumably synthesized in the hepatopancreas, probably passes from hemolymph to the growing oocytes, just as happens in the cases of hemocyanin.

In una precedente Nota [5] si è posto in evidenza come nelle uova di astaco appena emesse dalla femmina sia presente, in rilevante quantità, emocianina. Si è quindi pensato ad un passaggio di emocianina dall'emolinfa alla gonade e quindi agli oociti in accrescimento. In questo lavoro (\*) vengono riportati alcuni dati relativi all'accumulo di proteine emolinfatichè nella gonade di astaco e in particolare negli oociti.

Nella emolinfa di astaco sono presenti [5] tre frazioni proteiche evidenziabili sia elettroforeticamente che all'ultracentrifuga analitica (componenti con  $s_{20}$  pari a 23,4; 16,3; 5,3; componenti G, H, K secondo Eriksson-Quensel *et al.* [3]; di queste frazioni la più concentrata corrisponde al componente più veloce ed è emocianina. Le altre due frazioni danno la reazione del rame (messa in evidenza con alizarina S nel precipitato immunologico in micropiastre con antisiero anti-emolinfa totale). Si può dimostrare che con pH superiore a 10, G si trasforma quantitativamente in H e K fino ad ottenere in soluzione il solo componente K. D'altra parte facendo l'elettroforesi di plasma (emolinfa dopo coagulazione) si osserva una diminuzione della frazione 2 (fig. 1) e talvolta la quasi totale sua sparizione. Tale frazione corrisponde quindi al fibrinogeno dei Decapodi. Infine anche nell'astaco si può porre in evidenza la presenza di eteroagglutinine trovate da Tyler *et al.* [7] in *Palmurus interruptus* (noi le abbiamo messe in evidenza mediante emazie di coniglio). Queste eteroagglutinine, in base ai dati di Tyler *et al.*, dovrebbero appartenere alla frazione elettroforeticamente più lenta.

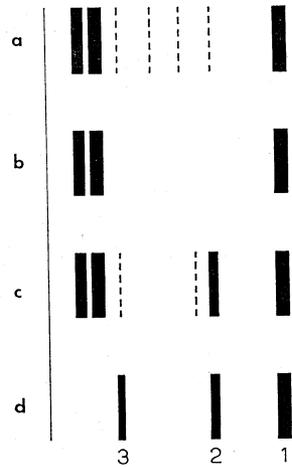
La composizione proteica della emolinfa dell'astaco appare quindi molto più complessa di quanto ritenuto in passato; probabilmente vi sono altre pro-

(\*) Ricerche eseguite nel Laboratorio di Zoologia dell'Università di Milano con contributi del C.N.R.

(\*\*) Nella seduta dell'8 febbraio 1969.

teine non ancora poste in evidenza; al riguardo si tenga presente che Bryan [2] ha messo in evidenza che nella emolinfa dell'astaco vi è zinco legato a proteine diverse dalle emocianine.

Fig. 1. - Ferogrammi su cellogel (elettroforesi per 1 h, 30'; 125 V e 10 mA per striscia): *a* = gonade di femmina in vitellogenesi; *b* = uova; *c* = emolinfa di femmina in vitellogenesi; *d* = emolinfa di maschio e di femmina. 1, 2, 3 sono componenti dell'emolinfa; 1 è senz'altro emocianina.



Risulta complesso allo stato attuale delle ricerche omologare le diverse frazioni evidenziabili con i vari metodi; la separazione su colonna di Sephadex G 200 (fig. 2) mostra la presenza di due frazioni che sono attualmente allo studio con diversi metodi.

Negli astaci, almeno in quelli in allevamento, nei mesi invernali è possibile mettere in evidenza nell'emolinfa delle femmine due nuove frazioni proteiche (fig. 1). Questa frazione ha  $s_{20}$  pari a 10,8 praticamente identico a quello del maggior componente dell'estratto di uovo di astaco cioè l'ovoverdina.

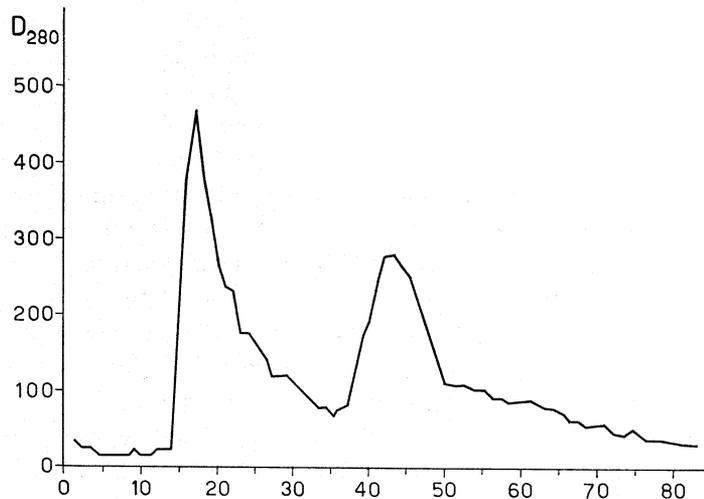


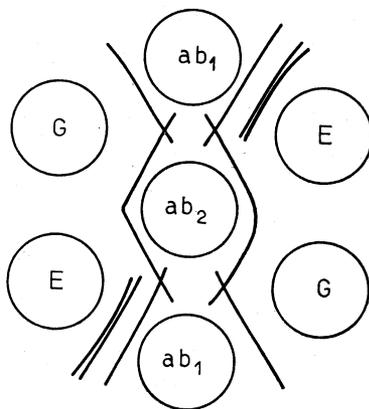
Fig. 2. - Separazione su colonna di emolinfa di maschio: colonna di Sephadex G 200 alta 33,5 cm.; emolinfa e Sephadex in acqua bidistillata; concentrazione proteica 8,0 mg/ml. In ascisse il numero d'ordine delle provette, in ordinate l'assorbimento a 280 mμ.

Lo spettro di assorbimento dell'emolinfa di queste femmine dà una prova indiretta della presenza di una carotenoproteina (o meglio di un complesso proteina-carotenoidi, cfr. Zagalsky *et al.* [8]), simile alla ovoverdina (massimi a 340 m $\mu$  e a 465 m $\mu$ , il primo corrisponde alle emocianine).

La presenza di un complesso carotenoidi-proteina non deve essere confusa con la presenza di carotenoidi liberi come avviene anche nell'astaco, e in tutti e due i sessi, in rapporto alla muta.

La preparazione di un antisiero anti-ovoverdina (preparata dall'uovo dopo omogeneizzazione in NaCl 10% (l'antisiero è stato preparato nel coniglio mediante una unica iniezione sottocutanea con adiuvante Freund della Difco) ha permesso di dimostrare l'identità di tale frazione con l'ovoverdina (fig. 3).

Fig. 3. - Immunodiffusione in micro-piastra (diametro dei pozzetti 3 mm, distanze fra essi 3 mm) in agar 1% in NaCl 0,9%. Reazione a temperatura ambiente per 16 ore.  $ab_1$  = antisiero anti-emolinfa di astaco;  $ab_2$  = antisiero anti-uova di astaco; E = emolinfa di femmina in vitellogenesi; G = gonade della stessa.



L'ovoverdina è presente nell'emolinfa delle femmine con oociti in accrescimento (rapporto peso fresco gonade/peso fresco corpo più elevato, 0,05) mentre è assente in femmine con tale rapporto inferiore a 0,01.

Si può quindi ammettere un passaggio di ovoverdina dall'emolinfa negli oociti in accrescimento e, in base ai dati di allevamento (mancano dati raccolti in natura), tale passaggio avviene durante i mesi invernali nei quali quindi la femmina, con i piccoli della precedente ovodeposizione attaccati ai pleopodi, si prepara alla deposizione tardo-autunnale.

Resta tuttavia da chiarire la sede della biosintesi della ovoverdina; vecchi dati di Smith [6] relativi a *Carcinus maenas* avevano mostrato che durante la vitellogenesi vi è una mobilitazione di carotenoidi dell'epatopancreas che vengono riversati nell'emolinfa.

Non ci è stato possibile mettere in evidenza nell'epatopancreas una quantità tale di ovoverdina da dimostrare inequivocabilmente che l'epatopancreas sia la sede di tale biosintesi, in quanto l'ovoverdina ivi evidenziata con varie tecniche può essere dovuta ad ovoverdina che contamina l'organo prelevato.

I dati fin qui raccolti mostrano chiaramente che nell'oocita si accumulano diverse proteine materne; innanzitutto l'emocianina, componente normale dell'emolinfa, oltre ad una altra frazione emolinfatica (corrispondente al

terzo arco immunodiffusionale, cfr. Parisi [5]), i cui rapporti con l'emocianina sono da chiarire. Infine l'ovoverdina, che appare nell'emolinfa solo durante la vitellogenesi.

Il significato di tale accumulo è probabilmente quello di fornire carotenoidi all'embrione in accrescimento (per la biosintesi della crustacianina ma verosimilmente anche per altre esigenze fisiologiche) nel caso della ovoverdina e rame (nei Crostacei Decapodi l'assunzione del rame avviene probabilmente per via alimentare come nei Molluschi) nel caso della emocianina. Il passaggio di ovoverdina può d'altra parte essere paragonato a quello delle lipoproteine nei Vertebrati (cfr. Zagalsky *et al.* [8]).

Resta da chiarire la sede della biosintesi sia della ovoverdina che della emocianina; dati preliminari di immunofluorescenza (con isotiocianato di fluoresceina [4] copulato con antisieri specifici) non sono utilizzabili al fine di poter affermare che sia l'epatopancreas l'organo responsabile di tale biosintesi. L'epatopancreas infatti possiede una fluorescenza naturale simile a quella dell'isotiocianato utilizzato, come del resto anche la gonade (la fluorescenza è praticamente limitata agli oociti); sono in corso esperimenti con altre sostanze a fluorescenza rossa.

#### LAVORI CITATI.

- [1] BRYAN G. W., « J. Exp. Biol. », 46, 281-296 (1967).
- [2] BRYAN G. W., « J. mar. biol. Ass. U. K. », 48, 303-321 (1968).
- [3] ERIKSSON-QUENSEL J. B. e SVEDBERG T., « Biol. Bull. », 71, 498-574 (1936).
- [4] LA CAVERA, « A. Med. Leg. Assicur. », 14, 1-49 (1966).
- [5] PARISI V., AMBROSOLI G. e SOZZI E., « Rend. Ac. Naz. Lincei, Sc. fis. mat. nat. », 37, 491-495 (1964).
- [6] SMITH G., « Quart. J. Microscop. Sc. », 57, 251-265 (1911).
- [7] TYLER A. e SCHEER B. T., « Biol. Bull. », 89, 193-200 (1945).
- [8] ZAGALSKY P. F., CHEESMAN D. F. e CECCALDI H. J., « Comp. Biochem. Physiol. », 22, 851-871 (1967).