
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

MARISA LEONARDI CIGADA, FIORENZA ILARIA DE
BERNARDI, ANNA MARIA SCARPETTI BOLZERN

**Sintesi di acido ribonucleico e di proteine in embrioni
di Anfi bi trattati con solfocianuro**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 55 (1973), n.6, p. 755–763.*
Accademia Nazionale dei Lincei

http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1973_8_55_6_755_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. — *Sintesi di acido ribonucleico e di proteine in embrioni di Anfibi trattati con solfocianuro* (*). Nota di MARISA LEONARDI CIGADA, FIORENZA LARIA DE BERNARDI e ANNA MARIA SCARPETTI BOLZERN, presentata (**) dal Socio S. RANZI.

SUMMARY. — The action of LiCl on RNA and protein synthesis in Amphibian embryos was studied previously. In this paper the NaSCN effect, which appears in opposition to the LiCl effect, was examined on the same material; this was shown by morphological research as well as by experiments on the protein in solution.

Xenopus laevis and *Rana esculenta* embryos were used and were treated, at late blastula stage, with NaSCN in tap water at increasing concentrations from 1,5 mM to 6,0 mM. After three hours of treatment the rearing mediums were diluted 1 : 100 with tap water and the embryos were maintained overnight in this diluted solution.

A first series of experiments of incorporation of ³H-uridine in *Xenopus* treated embryos (embryos treated with NaSCN concentrations higher than 2,5 mM and near to those morphologically active) showed that the quantity of RNA synthesized during the incubation-time was generally superior to the control. On the contrary, at lower concentrations the incorporation was reduced (fig. 1).

The sucrose gradients analysis of RNA revealed that the greater quantity of RNA, discovered in extract of 3,0 mM NaSCN treated embryos, was due for the most part to an 18 S fraction and to high molecular weight precursors; the increase of the 28 S fraction was lower (fig. 2). On comparing the results obtained by measuring uridine incorporation in RNA and from the analysis of sucrose gradients, it can be supposed that the larger quantity of RNA present in treated embryos was due to an increase of synthesis. This was also confirmed by the results of experiments of hydrolysis *in vitro* of NaSCN treated RNA by ribonuclease (fig. 3).

A second series of experiments on incorporation of labelled precursors in proteins of *Xenopus* and *Rana* embryos treated with NaSCN showed an increased synthesis at low salt concentrations. The highest increase was observed at concentrations of 1,5 mM for *Xenopus* and 2,5 mM for *Rana* (fig. 4).

È ormai ben noto che nello sviluppo degli Anfibi, degli Echinodermi e di altri animali LiCl e NaSCN hanno azione antitetica.

Rimandando a quanto esposto da Ranzi (1957) per gli Anfibi: il cloruro di litio produce riduzione della corda, mentre il solfocianuro induce ipersviluppo di essa. Alla riduzione della corda si associano inibizioni del capo, la più evidente delle quali è costituita dalla ciclopia; all'ipersviluppo della corda si associa un ingrandimento dell'encefalo. Indipendentemente dalla presenza della corda l'epidermide presuntiva può per azione di NaSCN svilupparsi in formazioni encefaliche (Ranzi e Tamini, 1940), mentre, sempre per azione di NaSCN, mesoderma ventrale può svilupparsi in corda (Ôgi, 1958). È più recente la dimostrazione che per azione di LiCl l'ectoderma può trasformarsi in entoderma (Engländer e Johnen, 1967).

(*) Ricerche eseguite nell'Istituto di Zoologia dell'Università statale di Milano. Contributo del CNR, n. 72.00004.04.

(**) Nella seduta del 15 dicembre 1973.

Il LiCl induce una stabilizzazione delle molecole proteiche per cui queste divengono meno facilmente metabolizzabili, mentre il NaSCN induce una denaturazione per cui le molecole proteiche sono più facilmente attaccate dagli enzimi che le metabolizzano (Ranzi, 1962).

In precedenti note (De Bernardi e coll., 1969; Leonardi Cigada e coll., 1972, 1973) studiammo l'azione del LiCl sulle sintesi delle proteine e dell'acido ribonucleico negli embrioni di Anfibi; vogliamo qui esaminare l'azione del NaSCN sulla sintesi di proteine e acido ribonucleico in embrioni di *Xenopus* e di *Rana*.

Sono stati utilizzati embrioni di *Xenopus laevis* Daudin provenienti da uova ottenute mediante iniezione di ormone gonadotropo (Pregnyl, Organon) ed embrioni di *Rana esculenta* L. ottenuti per deposizione naturale. Gli embrioni, liberati dagli involucri gelatinosi, erano trattati con sei differenti concentrazioni di NaSCN (1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 5,0; 6,0 mM) in acqua di fonte allo stadio di blastula avanzata (st. 9 di Nieuwkoop e Faber, 1956) per 3 ore a 18° C; i liquidi di allevamento erano quindi diluiti 1 : 100 con acqua di fonte e gli embrioni erano lasciati per una notte nella concentrazione di NaSCN così ottenuta. Un lotto di embrioni tenuti in acqua di fonte serviva come controllo. Tutti i liquidi di allevamento contenevano penicillina (200 U.I./ml) e streptomicina (100 µg/ml) onde evitare sviluppo batterico.

Incorporazione di precursori marcati nell'RNA. 30 embrioni per ogni lotto, trattati come sopra descritto, venivano posti nel mezzo dissociante privo di Ca^{++} e Mg^{++} come descritto da Landesman e Gross (1968). Quando la dissociazione appariva completa all'esame microscopico (60-90 minuti circa) gli embrioni venivano incubati con 20 µC/ml di uridina tritiata (Radiochemical Centre, Amersham; a.s. 5,0 C/mmole) in un mezzo di cultura completo. L'incubazione era condotta per 2 ore a 18° C; al termine si prelevavano 3 campioni di 10 embrioni ciascuno. L'RNA veniva separato secondo il metodo descritto da Schmidt (1957) modificato secondo Gould (1969) mediante estrazione con acido tricloroacetico (TCA) 5% freddo, delipidazione ed idrolisi alcalina con KOH 0,3 N a 37° C per 18 ore. Dopo acidificazione per precipitare DNA e residui proteici, l'idrolizzato veniva neutralizzato e posto nei vials dello scintillatore con l'aggiunta di 10 ml di miscela triton-toluene (1 : 2).

Gradienti di saccarosio. Per l'analisi dell'RNA su gradienti di saccarosio gli embrioni (300 per ogni lotto) furono incubati con 10 µC/ml di $NaH^{14}CO_3$ (Radiochemical Centre, Amersham; a.s. 42,4 mC/mmole) per 5 ore a 26° C; l'RNA fu estratto con fenolo in tampone acetato 0,1 M ed analizzato su gradiente lineare 5%-20% come precedentemente descritto (Leonardi Cigada e coll., 1972). Le frazioni (1 ml) raccolte furono lette allo scintillatore con la miscela triton-toluene.

Idrolisi enzimatica dell'RNA. L'idrolisi enzimatica è stata condotta su RNA di lievito purificato sciolto in tampone acetato 0,1 M (1 mg/ml). La soluzione veniva trattata per una notte a 0° C con NaSCN ad alcune delle concentrazioni usate per il trattamento degli embrioni (1,5; 2,5; 5,0 mM). L'idrolisi fu condotta con ribonucleasi pancreatica (Sigma) alla concentrazione 1,25 µg/ml a 25° C. Dalla miscela di reazione si prelevava 1 ml ogni tre minuti a partire dal momento in cui era stato aggiunto l'enzima. L'RNA era precipitato con acetato di uranile e acido perclorico; la quantità dell'RNA idrolizzato era valutata mediante lettura allo spettrofotometro a 260 nm.

Incorporazione di precursori marcati nelle proteine. Gli embrioni controllo e trattati con NaSCN come descritto sopra (75 per ogni lotto) sono stati incubati per 5 ore a 26° C con idrolizzato proteico ^{14}C (Radiochemical Centre, Amersham; a.s. 57 mC/matomo C) 0,7 µC/ml. Alla fine dell'incubazione gli embrioni venivano omogenizzati in liquido di Weber ed Edsall con aggiunta di urea 30%. Gli omogenati venivano lasciati una notte a 0° C e quindi centrifugati in Servall per 15' a 3000 r.p.m. Il pellet era diviso in 2-3 frazioni e distribuito su filtri di carta Watman 3 MM; il supernatante era diviso in frazioni di 0,2 ml ciascuna e fatto adsor-

bire sui filtri. I filtri venivano fatti asciugare all'aria e quindi sottoposti ad una serie di lavaggi con TCA, etere ed etanolo secondo il metodo di Mans e Novelli (1961); infine erano posti nei vials dello scintillatore con 5 ml di soluzione scintillante (toluene-PPO-dimPOPOP).

Misura dell'azoto proteico. La quantità di proteine totali negli embrioni di *Xenopus* trattati con NaSCN come sopra descritto è stata valutata con il metodo dell'azoto proteico di Parnas (1924). Campioni di 50 embrioni ciascuno furono liofilizzati; le polveri vennero pesate ed incenerite fino a completa conversione dell'azoto in $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. I campioni inceneriti venivano poi distillati in corrente di vapore con 10 cc di NaOH 30% + Na tiosolfato 20%. Il distillato era quindi titolato con HCl 0,01 N; si determinava quindi la quantità di acido necessario al viraggio della soluzione (1 ml HCl 0,01 N = 0,143 mg N).

Una prima serie di esperimenti è stata condotta misurando l'incorporazione di uridina tritiata nell'RNA di embrioni di *Xenopus* che erano stati trattati, allo stadio di blastula avanzata, con varie concentrazioni di NaSCN. I risultati ottenuti dalla lettura della radioattività sono stati tutti riportati in valori percentuali rispetto al controllo cui era stato attribuito il valore 100 (fig. 1).

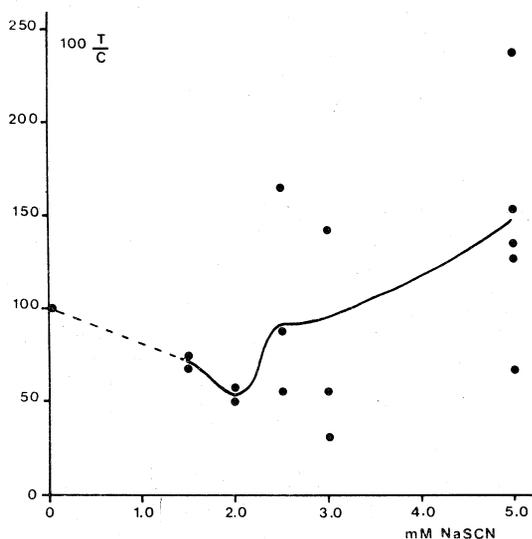


Fig. 1. - Incorporazione di uridina tritiata nell'RNA di embrioni di *Xenopus laevis* trattati con diverse concentrazioni di NaSCN. Al controllo è stato attribuito il valore 100.

Negli embrioni trattati con basse concentrazioni di NaSCN la quantità di RNA sintetizzato durante il periodo di incubazione è nettamente inferiore al controllo (ca 50% alla concentrazione 2,0 mM). Con l'aumentare della concentrazione l'incorporazione subisce un incremento che è particolarmente marcato dopo un trattamento con 5,0 mM NaSCN. La percentuale di esperimenti che hanno dato questi risultati ben si accorda con la percentuale di esperimenti nei quali si sono ottenuti embrioni con corda grande.

L'aumento di incorporazione osservato alle concentrazioni più elevate a cui sono stati sottoposti gli embrioni ha fatto pensare alla possibilità di un incremento di sintesi in qualche particolare frazione dell'RNA. Per verificare questa ipotesi si è fatto ricorso all'analisi dell'RNA su gradienti di saccarosio (5%-20%). Per l'analisi su gradiente si è scelto di trattare gli embrioni con la concentrazione di sale 3,0 mM, alla quale la quota di incorporazione di uridina

era risultata più elevata del controllo. Come precursore marcato abbiamo inoltre scelto la $^{14}\text{CO}_2$ a cui l'embrione ha un'elevata permeabilità per verificare eventuali alterazioni nel meccanismo di incorporazione dovuti al metodo di incubazione con uridina. Il profilo di densità ottica a 254 nm dell'estratto di RNA degli embrioni controllo mostra le tre frazioni caratteristiche 4 S, 18 S e 28 S (fig. 2).

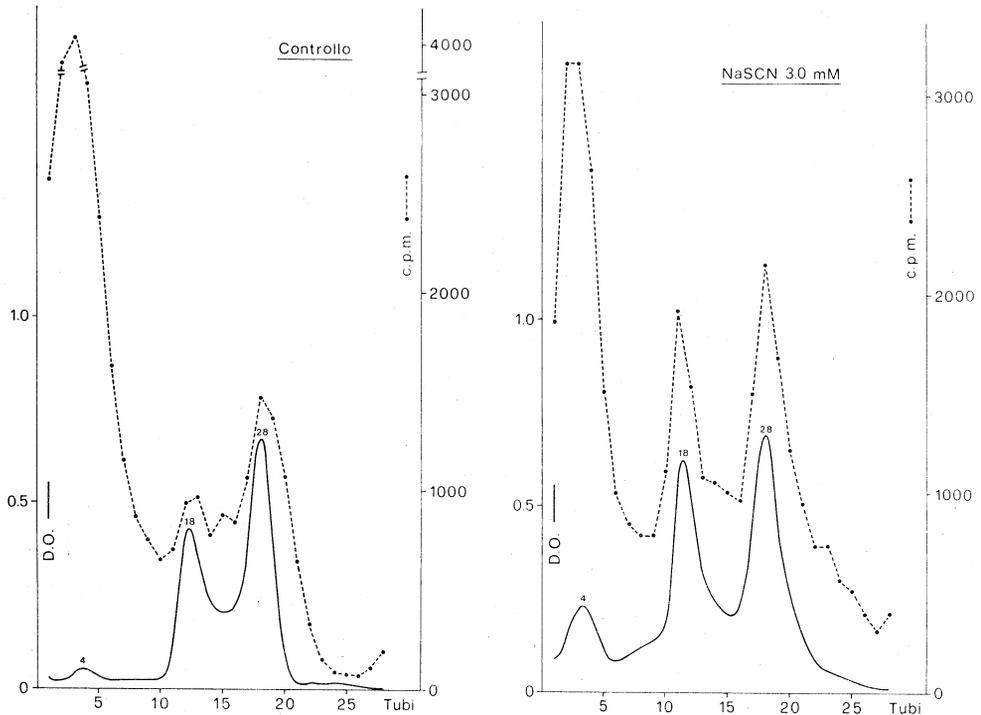


Fig. 2. - Diagrammi di sedimentazione su gradienti di saccarosio (5%-20%) di RNA estratto da embrioni di *Xenopus laevis*; a sinistra: controllo; a destra: trattati con NaSCN 3,0 mM.

Il profilo di radioattività mostra che la quantità maggiore di RNA formato durante il periodo di incubazione, dagli embrioni controllo, si trova nella frazione 4 S. Noto è l'incorporazione nella frazione 28 S e minore nel 18 S. Tra queste due frazioni si nota una punta dovuta probabilmente ad un precursore del 18 S a coefficiente di sedimentazione circa 22 S. Il profilo di densità ottica del gradiente trattato con NaSCN 3,0 mM non presenta sostanziali differenze rispetto al controllo, tranne che per la maggiore altezza delle punte 4 S e 18 S. Il profilo di radioattività, invece, rivela un'incorporazione nettamente superiore al controllo in tutte le frazioni. In particolare, l'incremento maggiore di incorporazione si nota nella frazione 18 S e nella zona a coefficiente di sedimentazione superiore a 30 S, dove si evidenziano i precursori ad alto peso molecolare dell'RNA ribosomiale. Non si nota aumento di incorporazione a carico del precursore 22 S.

Comparando i dati di incorporazione del precursore marcato e quelli dell'analisi su gradiente dell'RNA si può notare che la maggior quantità di RNA marcato che si trova nell'estratto di embrioni trattati con NaSCN 3,0 mM è costituita in buona parte dalla frazione 18 S la cui punta, che rappresenta la radioattività, ha un'altezza doppia rispetto al controllo; l'incremento è meno marcato nella frazione 28 S, che nel trattato aumenta di circa 1/3 rispetto al controllo. Questo fatto induce a pensare che il trattamento con NaSCN abbia favorito la sintesi della frazione 18 S la cui formazione secondo Penman (1966) è più rapida. L'azione accelerante del solfocianuro sul metabolismo dell'RNA si verificherebbe però solo a concentrazioni di sale piuttosto elevate (2,5-3 mM); le concentrazioni inferiori non hanno questo effetto e tendono anzi a far diminuire la quantità di RNA marcato.

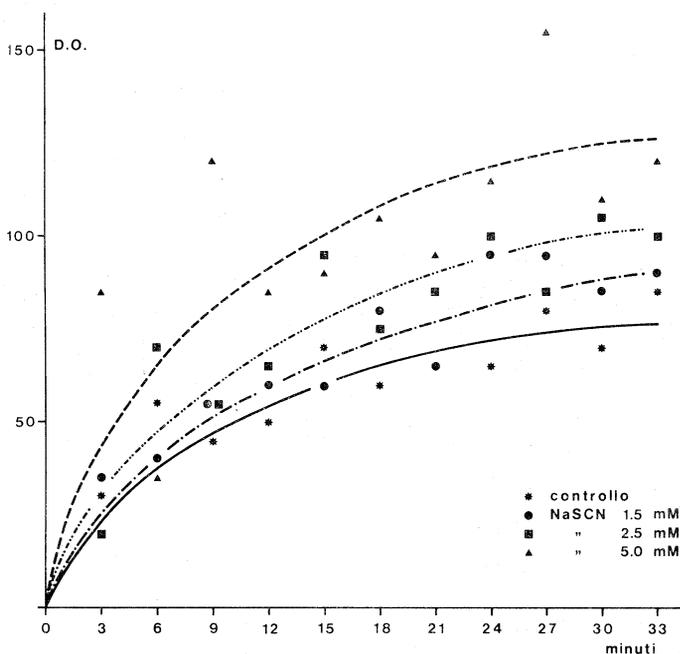


Fig. 3. - Idrolisi enzimatica di RNA di lievito trattato per una notte con diverse concentrazioni di NaSCN. Linea continua: controllo; linee tratteggiate: trattati.

Accanto a questi esperimenti ne sono stati eseguiti altri *in vitro* per verificare se il NaSCN avesse influenza sul processo di idrolisi dell'RNA da parte della ribonucleasi. Abbiamo perciò trattato l'RNA di lievito con alcune delle concentrazioni di NaSCN usate per il trattamento degli embrioni scegliendo quelle che avevano dato risultati più significativi nella variazione dell'incorporazione e le abbiamo poi sottoposte ad idrolisi con ribonucleasi. La velocità dell'idrolisi veniva controllata con prelievi ogni 3 minuti. Riportando in grafico (fig. 3) i valori ottenuti dalle letture allo spettrofotometro si può notare che i valori ottenuti con l'RNA trattato sono sempre superiori al controllo, in particolare l'RNA trattato con NaSCN 5,0 mM viene demolito con una velocità molto superiore al controllo; minore è la velocità di idrolisi del trattato con 2,5 mM, mentre la concentrazione più bassa usata dà una curva pressoc-

ché uguale al controllo. È da notare che la concentrazione di solfocianuro che non dava aumento di incorporazione nell'RNA degli embrioni di *Xenopus* ha dato una curva di demolizione simile al controllo: evidentemente l'effetto del sale sull'RNA incomincia, come abbiamo già visto a proposito dell'incorporazione del precursore marcato, soltanto alla concentrazione 2,5 mM.

Un'ultima serie di esperimenti è stata condotta per verificare l'effetto delle basse concentrazioni di NaSCN, usate negli esperimenti sull'RNA, sulla incorporazione di precursori marcati nelle proteine. Questi esperimenti sono

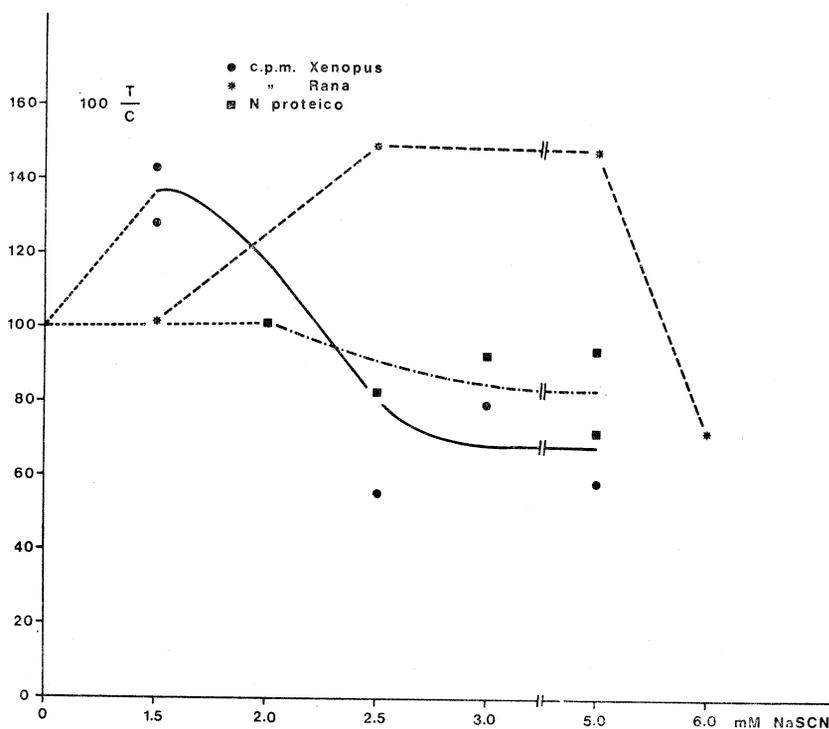


Fig. 4. - Incorporazione di aminoacidi marcati nelle proteine di embrioni di *Xenopus laevis* e di embrioni di *Rana esculenta* trattati con NaSCN. L'N proteico indica la quantità totale di proteine di *Xenopus* misurata col metodo di Parnas. I valori sono espressi in percentuale rispetto al controllo.

stati condotti, oltre che su embrioni di *Xenopus laevis*, anche su embrioni di *Rana esculenta*, poiché la rana mostra una maggiore tolleranza nei confronti del sale. Per ottenere infatti corda grande la concentrazione di NaSCN nel mezzo è 0,01 M in *Xenopus* (Ranzi e Gavarosi, 1959) e 0,04 M in *Rana* (Ranzi, Tamini e Storari Offer, 1946). Riportando infatti su un unico grafico (fig. 4) i valori percentuali di incorporazione di aminoacidi marcati nelle proteine totali degli embrioni di *Xenopus* e di *Rana*, si è osservato, nello *Xenopus* un aumento di incorporazione ad una concentrazione molto bassa di sale (1,5 mM) che nella *Rana* ha dato un valore uguale al controllo; alla concentrazione 2,5 mM l'incorporazione diminuisce in *Xenopus*, mentre nella rana la sintesi proteica

viene esaltata, e si abbasserà ad un valore inferiore al controllo soltanto alla concentrazione 6 mM, che non è stato possibile studiare nello *Xenopus* a causa della elevatissima mortalità degli embrioni.

Nello stesso grafico sono inoltre riportati, sempre in valori percentuali rispetto al controllo, i valori della quantità totale di proteine che costituiscono allo stadio 22-23 di Nieuwkoop e Faber il corpo degli embrioni di *Xenopus* dopo trattamento con solfocianuro, misurati mediante determinazione dell'azoto proteico. I valori ottenuti mostrano che per concentrazioni di NaSCN superiori a 2,5 mM la quantità di proteine che costituiscono il corpo diminuisce.

DISCUSSIONE

Il trattamento di embrioni di *Xenopus* con concentrazioni crescenti di NaSCN dimostra che alle concentrazioni più basse (1,5-2 mM) la quantità di uridina incorporata nell'RNA è minore; con l'aumentare della concentrazione avvicinandosi cioè alle concentrazioni che negli embrioni provocano malformazioni evidenti, la sintesi di RNA aumenta notevolmente. Tale aumento si verifica solo a partire dalla concentrazione 2,5 mM: concentrazioni inferiori non mostrano effetto.

La denaturazione *in vitro* del RNA per azione di NaSCN e la conseguente più rapida demolizione ad opera di ribonucleasi permettono di escludere che la maggior quantità di RNA presente negli embrioni trattati con NaSCN possa dipendere da un rallentamento della idrolisi. Ranzi (1962) pensò che negli embrioni trattati con NaSCN ci fosse una più attiva sintesi proteica per la presenza di una maggiore quantità di aminoacidi dovuta a più attiva demolizione proteica; si potrebbe fare lo stesso discorso per la sintesi dell'RNA e dire che una maggiore quantità di nucleotidi liberi, effetto dell'aumentata demolizione corrispondente all'idrolisi osservata *in vitro*, permette una maggiore sintesi. Si potrebbe però anche pensare a una denaturazione delle proteine che reprimono i geni.

In ogni caso la maggior quantità di RNA che si trova negli embrioni trattati con solfocianuro è dovuta ad un aumento di sintesi. L'analisi dell'RNA su gradiente di saccarosio ha fatto vedere che la frazione che subisce il maggior incremento è la 18 S, mentre la frazione 28 S, il cui metabolismo è lungo e complesso (Penman, 1966; Weinberg e Penman, 1970) ha subito un incremento minore; si noti negli esperimenti la durata del periodo di incubazione col radioattivo (5 ore).

Un aumento di sintesi di RNA nell'embrione di Anfibi per effetto di un agente animalizzante fu visto anche da Flickinger e coll. (1970) che mettono in rapporto il fenomeno a un osservato aumento della velocità di divisione cellulare. Anche Volm e coll. (1970) osservarono nel ciliato *Tetrahymena* un aumento di RNA dopo trattamento con NaSCN.

Osservando i grafici ottenuti dall'analisi dell'RNA su gradiente siamo indotti a pensare che in vivo l'effetto denaturante del NaSCN sul RNA non

sia così rapido e completo. Infatti nel gradiente degli embrioni trattati sono visibili alcuni precursori dell'RNA ribosomale ad alto peso molecolare che non sarebbero così evidenti se l'RNA fosse denaturato.

Gli esperimenti condotti per studiare l'incorporazione degli aminoacidi marcati nelle proteine hanno dato risultati analoghi a quelli ottenuti per l'RNA. In questo caso, però, le concentrazioni di NaSCN che hanno provocato un aumento di incorporazione sono state le più basse usate. Questo fatto induce a pensare che le molecole proteiche siano più sensibili delle molecole di RNA alla denaturazione indotta da NaSCN. L'aumento di incorporazione registrato sembra confermare l'ipotesi secondo cui l'incremento osservato non è dovuto ad un accumulo di materiale neoformato, ma ad un vero e proprio aumento di sintesi.

L'esperimento ripetuto su embrioni di *Rana* ha confermato l'aumento di incorporazione, anche se il suo massimo appare più spostato verso la zona delle concentrazioni più elevate, in conseguenza della maggior tolleranza che la *Rana* dimostra nei confronti del NaSCN.

L'azione del solfocianuro sulla sintesi delle proteine e degli acidi nucleici nell'embrione appare opposta a quella del LiCl anche alle basse concentrazioni prive di effetto morfologico che abbiamo studiato in questa ricerca. Mentre infatti il litio provoca un accumulo di RNA, inibendo il meccanismo di demolizione (Leonardi Cigada e coll., 1972) il solfocianuro inizia la denaturazione dell'RNA e delle proteine e, mettendo a disposizione nucleotidi e aminoacidi, permette un aumento di sintesi nell'embrione. Questa aumentata sintesi ha su piano morfologico il suo parallelo nel fenomeno di formazione di strutture neurali e nell'aumento in dimensioni della corda che sono state osservate per azione di NaSCN a concentrazioni di poco superiori a quelle qui esaminate.

LAVORI CITATI

- DE BERNARDI F., LEONARDI CIGADA M., MACI R. e RANZI S. (1969) – *On protein synthesis during the development of Lithium treated Embryos*, « *Experientia* », 25, 211.
- ENGLÄNDER H. e JOHNEN A. G. (1967) – *Die morphogenetische Wirkung von Li – Ionen auf Gastrula – Ectoderm von Ambystoma und Triturus*, « *Roux Arch.* », 159, 346.
- FLICKINGER R. A., LAUTH M. R. e STAMBROOK P. J. (1970) – *An inverse relation between the rate of cell division and RNA synthesis per cell in developing frog embryos*, « *J. Embriol. exp. Morphol.* », 23, 571.
- GOULD M. C. (1969) – *RNA and protein synthesis in the unfertilized eggs of Urechis caupo*, « *Devel. Biol.* », 19, 460.
- LANDESMAN R. e GROSS P. R. (1968) – *Patterns of macromolecule synthesis during development of Xenopus laevis. I. – Incorporation of radioactive precursors into dissociated embryos*, « *Devel. Biol.* », 18, 571.
- LEONARDI CIGADA M., LARIA DE BERNARDI F. e BOLZERN A. M. (1972) – *Sintesi di RNA in embrioni di Xenopus trattati con litio*, « *Rend. Acc. Naz. Lincei (Sc. fis.)* », (8), 52, 93.
- LEONARDI CIGADA M., LARIA DE BERNARDI F. e SCARPETTI BOLZERN A. M. (1973) – *Sintesi di proteine in embrioni di Xenopus laevis trattati con LiCl*, « *Ist. Lombardo (Rend. Sc.)* », B 107, 117.

- MANS R. J. e NOVELLI G. D. (1961) - *Measurement of the incorporation of radioactive amino acids into protein by a filter-paper disk method*, « Arch. Biochem. Biophys. », 94, 48.
- NIEUWKOOP P. D. e FABER J. (1956) - *Normal table of Xenopus laevis*. North-Holland Publishing Company Amsterdam.
- ÔGI K. (1958) - *The effect of Na-thiocyanate on isolates of the presumptive ectoderm and medio ventral marginal zone of Triturus*, « J. Embryol. exp. Morphol. », 6, 412.
- PENMAN S. (1966) - *RNA metabolism in the HeLa cell nucleus*, « J. Mol. Biol. », 17, 117.
- RANZI S. e TAMINI E. (1940) - *Azione di NaSCN sullo sviluppo di embrioni di Anfibia*. II. - *Azione su espianti ventrali di gastrule iniziali di Axolotl*, « Ist. Lombardo (Rend. Sc.) », 73, 525.
- RANZI S., TAMINI E. e STORARI OFFER E. (1946) - *Alterazioni dello sviluppo embrionale di Anfibi prodotte da solfocianato e da altre sostanze*, « Ist. Lombardo (Rend. Sc.) », 79, 161.
- RANZI S. (1957) - *Early determination in development under normal and experimental conditions*. « The Beginnings of Embryonic Development » AAAS Washington, 291.
- RANZI S. e GAVAROSI G. (1959) - *Dimensions of the notochords and somites in embryos of Xenopus laevis treated with thiocyanate*, « J. Embryol. exp. Morphol. », 7, 17.
- RANZI S. (1962) - *The proteins in embryonic and larval development*, « Adv. Morphogenesis », 2, 211.
- SCHMIDT G. (1957) - *Determination of nucleic acids by phosphorus analysis*, « Methods in Enzymology », Colowick S. P. and Kaplan N. O. ed. III, 671. Ac. Press New York.
- VOLM H, WAYSS K. e SCHWARTZ V. (1970) - *Effect of lithium and thiocyanate ions in the synthesis of nucleic acids and proteins in Tetrahymena pyriformis G.L.*, « Wilhelm Roux' Archiv », 165, 125.
- WEINBERG R. A. e PENMAN S. (1970) - *Processing of 45 S nucleolar RNA*, « J. Mol. Biol. », 47, 169.