
LUIGIA GRANDORI

MORFOLOGIA, STADÏ DI SVILUPPO
E PRESENZA DI UN CAROTINOIDE
NEL *POLYTOMA CAUDATUM*

In un recente lavoro in collaborazione con R. GRANDORI (1) descrissi una forma di *Polytoma*, rinvenuta nel novembre 1933 in un campione di terreno della brughiera lombarda trattato con calce e letame, che per alcuni caratteri morfologici ricondussi alla specie già nota *Polytoma caudatum* Korschikoff, ma che per alcuni altri caratteri ritenni una nuova varietà che chiamai *Polytoma caudatum* Korschikoff, var. *astigmata* R. e L. Grandori. La prima sommaria descrizione delle forme vegetative più tipicamente caudate fu fatta su esemplari trovati nella prima coltura del terreno in brodo di fieno. Da questa prima coltura, con successivi trapianti, la varietà venne conservata attiva fino al novembre 1934, e in tale epoca venne portata all'Istituto Pasteur, dove LWOFF e PROVASOLI riuscirono ad ottenerla in coltura pura libera da batteri partendo da un solo individuo capostipite (novembre-dicembre 1934).

Il liquido nutritizio di cui essi si servirono per tali colture pure è il seguente:

Peptone 5 C Vaillant	gr. 5
KCl Merk	» 0,25
KH ₂ PO ₄ Merk	» 0,25
Mg SO ₄ Merk	» 0,25
Acetato di Sodio Merk	» 2,—
Acqua bidistillata	» 1.000

PH = 7; aggiustamento del pH fatto con soda.

(1) GRANDORI R. e L. — *Studi sui Protozoi del terreno*. — Annali del R. Istituto Superiore Agrario di Milano; Vol. I^a, fasc. III^a, 1934.XIII.

Da uno dei trapianti di coltura pura portato da Parigi a fine di dicembre 1934, il Dott. PROVASOLI derivava recentemente a Milano nuovi trapianti, sempre batteriologicamente puri, i quali mi hanno fornito il materiale per il presente studio morfologico.

Della specie tipica del KORSCHKOFF la diagnosi (1) è la seguente:

« Cellule allungate e obovate. Rapporto fra lunghezza e larghezza fino a $2\frac{1}{2}$ volte e più; estremità caudale appuntita, spesso prolungata bruscamente in una piccola appendice caudale. Membrana delicata aderente al corpo, staccantesi talvolta solo all'estremità caudale, e prolungata in avanti in una piccola papilla appena rilevabile.

« Flagelli lunghi fino a $1\frac{1}{2}$ volte il corpo. Nucleo centrale. Due vacuoli contrattili anteriori. Stigma grande, spesso con contorno irregolare, posto un po' più avanti del centro. Spesso, assieme ai granuli di amido, anche grosse gocce di olio. Divisione delle forme vegetative quasi trasversale, con formazione di 4 cellule figlie che dalla forma ellissoidale passano gradatamente alla definitiva, assottigliandosi all'estremità caudale. Non si conoscono altri stadi. Lunghezza delle forme giovanili 8 micron, delle forme adulte 12-16 micron ».

Il PASCHER segnala la stessa specie per la Boemia, ma con esemplari di maggior lunghezza, raggiungenti i 25 micron.

Della nuova varietà *astigmata*, nelle colture pure portate mi da Parigi, mi è riuscito di trovare, oltre alle forme vegetative, stadi di divisione in 4 e 8 cellule figlie, nonché i gameti in fase di copulazione e lo zigote.

Lo studio degli individui delle colture pure ha confermato pienamente le osservazioni fatte nel 1933 sugli individui viventi nel terreno; e perciò posso affermare non esservi alcun dubbio che la nuova varietà appartenga alla specie fondata dal KORSCHKOFF; tuttavia la grande varietà di forme da me osservate in tali colture permette anche di avvicinare la nuova varietà al *Chlamydomonas subcaudata* Wille, della quale essa sembra la forma parallela sprovvista di cromatoforo e di stigma.

(1) PASCHER A. — Die Süsßwasserflora Deutschlands, Oesterreichs und der Schweiz — Heft 4, Jena, Fischer, 1927.

Una certa somiglianza presenta questa nuova varietà col *Polytoma longistigma* R. e L. Grandori, ma ne differisce, oltrechè per l'assenza dello stigma, anche per la forma del corpo più allungata, e perchè all'estremità posteriore, in luogo del prolungamento bruscamente assottigliato caratteristico del *P. longistigma* (1), presenta un assottigliamento graduale. Infine il *P. longistigma* si divide longitudinalmente, mentre il *P. caudatum* var. *astigmata* si divide trasversalmente.

FORME VEGETATIVE ADULTE

Di queste forme ho approfondito in modo speciale lo studio. Il massimo della loro lunghezza è fra 25 e 27 micron. La loro forma varia dalla tondeggianta alla ovoidale regolare, alla fusiforme, alla caudata (figg. 1-8). La membrana è sottile, ma sempre nettamente visibile. Il protoplasma non sempre aderisce alla membrana; se ne discosta sovente notevolmente nelle forme caudate e specialmente al polo posteriore.

I flagelli sono lunghi da 1 a $1\frac{1}{2}$ volte la lunghezza del corpo. Lo stigma è sempre mancante. Il nucleo è tondeggianta, e collocato per lo più nella metà anteriore del corpo, ma nelle forme ovoidali è verso il centro; esso possiede un grosso cariosoma. Si notano due vacuoli pulsanti anteriori e una piccola papilla protoplasmatica ben visibile. Fra i costituenti protoplasmatici hanno fermato la mia attenzione il *vacuoma* e il *condrioma*.

Il *vacuoma*, messo in evidenza nel vivente col Rosso neutro, risulta formato da un sistema di vacuoli a metacromatina (granuli di *evolutina*) situati nella parte più profonda della cellula. Talvolta la distribuzione dei vacuoli è in prevalenza verso i due poli, tal'altra invece prevale un ammassamento nella regione mediana, rimanendo però sgombra una piccola area perinucleare (fig. 23).

Il *condrioma* (condrioma inattivo di GUILLIERMOND) è stato da me posto in evidenza usando come fissativo il liquido di

(1) GRANDORI loco citato, Tav. IV, Figg. 88-89-95.

Altmann per 36 ore. I preparati dopo la fissazione furono sottoposti alla cromizzazione (soggiorno per 24 ore in soluzione di bicromato potassico al 2%), indi a lavaggio e alla mordenzatura in allume ferrico 10% per 48 ore, per essere colorati poi con Ematossilina di Heidenhain per 24 ore. Per alcuni preparati ho intercalato, fra la fissazione e la cromizzazione, il trattamento con la miscela BENDA (soluzione di acido cromico all'1% e acido acetico pirolegnoso rettificato in parti uguali).

Con tali metodi il condrioma appare formato da un assieme di condrioconti di forma vermicolare, ricurvi, foggianti ad ansa, irregolari, e variamente distribuiti in quasi tutta la massa del citoplasma; nella maggior parte degli individui però essi appaiono più numerosi e densi nella metà posteriore del corpo (fig. 24). Nell'insieme il condrioma di questo *Polytoma* è molto simile a quello descritto da VOLKONSKY per *P. uvela* (1).

I preparati da me trattati con la miscela BENDA rivelano la presenza di un reticolo superficiale colorato meno intensamente dei condrioconti e che ricorda il *reticolo* descritto da VOLKONSKY per il *P. uvela* e da lui interpretato come *leucoplasto* (1).

Fra gli inclusi citoplasmatici ho notato i *granuli d'amido* e le *gocce d'olio con carotinoide*.

I granuli d'amido trovansi per lo più nella parte posteriore del corpo, ed hanno forma sferoidale od ovale, ma assai spesso deformati in superficie (specialmente i più voluminosi) in modo da apparire a contorno poligonale più o meno smussato.

Le gocce d'olio con carotinoide si trovano sovente nella parte anteriore del corpo, in tale posizione da simulare talvolta la presenza di uno stigma (figg. 4 e 11). Altre volte parecchie goccioline sono limitrofe ad un vacuolo anteriore (figg. 10 e 24); infine una o più goccioline possono trovarsi nella zona mediana della cellula. Il carotinoide appare nel vivente d'un color giallo rossastro.

Per decidere a quale gruppo di carotinoidi appartenga il carotinoide del *Polytoma*, ho usufruito del materiale di 4 provette di colture pure. Ho sottoposto tale materiale a centrifugazione a 3600 giri per 10 minuti, decantando poi e nuova-

(1) VOLKONSKY M. — Les constituants cytoplasmiques de *Polytoma uvela* KHR. — Existence d'un leucoplaste. — Comp. Rend. Soc. Biol. Année 1930, Tom. 3.

mente centrifugando due volte. Il residuo formato da una piccola quantità di liquido (circa 1 cm³) contenente in sospensione e deposito gran quantità di *Polytoma*, venne trattato nel modo seguente: (1)

Posto nel vuoto ed essiccato su acido solforico, fu trattato in seguito con alcool metilico assoluto. L'alcool metilico si colorò in giallo, mentre il deposito dei *Polytoma* si è scolorato. Aggiungendo due volumi di etere di petrolio, la sostanza è passata nel solvente, colorandolo in giallo oro intenso. Allo spettroscopio il liquido mostrò una larga banda di assorbimento fra 4500 e 5000 Å.

La soluzione eterea fu quindi lavata più volte con acqua, la quale rimase incolore. Il solvente evaporato lasciò un residuo rosso, che ridisciolto con etere di petrolio fu diviso in due porzioni, che entrambe furon lasciate evaporare. Una di esse fu sciolta in cloroformio, l'altra in solfuro di carbonio. La soluzione in cloroformio diede un colore giallo arancio pallido; fu aggiunta alla soluzione cloroformica una goccia di anidride acetica e una goccia di acido solforico concentrato; in seguito a ciò il colore virò dal rosso al violetto, al bleu, al verde (reazione di BOUCHARD).

Con tali reazioni viene limitato notevolmente il numero dei carotinoidi a cui può appartenere quello in questione, restando solo da decidere fra il gruppo delle *carotine* e la *licopina*.

Il colore del residuo per evaporazione era rosso pomodoro, e ciò indicherebbe assai probabile trattarsi di lycopina.

La soluzione in solfuro di carbonio assunse colorazione rosso violacea, ed anche questa reazione starebbe a testimoniare che trattasi assai verosimilmente di lycopina.

Concludendo, sebbene la quantità di materiale che ebbi a disposizione fosse minima, e tale da non permettere una determinazione assolutamente certa e precisa, tuttavia *resta fin d'ora assodato che la sostanza di cui trattasi non può essere che una carotina oppure lycopina* (2).

(1) In questi trattamenti per rivelare il comportamento del carotinoide mediante appropriate reazioni, mi fu di valido aiuto l'opera personale del Prof. Ernesto Parisi che mi è grato di ringraziare sentitamente.
(2) R. KEHR and H. BROCKMANN. — Bestimmung von Carotinoiden. — Zeitschrift für physiologischen Chemie, 206, 41 (1932).

FORME DI DIVISIONE

Le forme vegetative, raggiunte le loro massime dimensioni, si dividono, nell'interno della membrana, in 4 o in 8 cellule figlie. La divisione è nettamente trasversale (figg. 14 e 15), e in ciò la nuova varietà differisce dal *Polytoma caudatum* e dal *Chlamydomonas subcaudata*. I grossi granuli d'amido nell'individuo che si prepara alla divisione, sono distribuiti uniformemente lungo la parete del corpo (fig. 14). Dopo la prima divisione ne segue una seconda con formazione di 4 cellule figlie (figg. 16, 17, 18), ma il più sovente ne segue una terza con formazione di 8 cellule figlie (figg. 20-21). Queste sono dapprima tondeggianti (fig. 20), poi si allungano diventando ellissoidali, ed infine possono assottigliare l'estremità posteriore diventando caudate (figg. 17, 18 e 21), ma non mancano forme di divisione nelle quali le cellule figlie a completo sviluppo appaiono tondeggianti.

FORME VEGETATIVE GIOVANILI

Le forme giovanili hanno una lunghezza da 9 a 12 micron, e differiscono talvolta notevolmente dalla forma adulta. Il carattere più appariscente che molte di esse presentano è quello dell'estremità posteriore tondeggianti, anche se assottigliato rispetto all'estremità anteriore (figg. 9-13).

In molte forme giovanili il nucleo è situato nella metà posteriore del corpo, e i granuli d'amido sono raccolti nella parte mediana della cellula lungo le pareti (fig. 13). Non mancano le goccioline oleose con carotinoide nella regione anteriore o in quella mediana.

GAMETI, COPULAZIONE, ZIGOTE

In uno dei trapianti derivanti dall'unico ceppo portato da Parigi, ove le forme adulte erano in prevalenza del tipo più allungato (fig. 1-4), rinvenni i gameti in via di copulazione. I gameti non differiscono apparentemente dalle forme giovanili vegetative. Rinvenni però gameti liberi da membrana, e dotati

di movimenti di traslazione rettilinee a sbalzi, senza moto rotatorio, a differenza di quelli racchiusi nella membrana che hanno movimenti rotatori elicoidali. I due individui in copulazione nella fig. 19 erano quasi completamente fusi, e non lasciavano discernere alcuna membrana. Il rinvenimento di forme nude e il tipo di copulazione mi fanno ritenere che in questa varietà la copulazione avviene fra individui nudi. Gli zigoti si presentano in forma di cisti (fig. 22) di differenti dimensioni (da 12 a 20 micron), e sono sovente riuniti in gruppi numerosissimi immersi in una massa di sostanza d'aspetto gelatinoso (fig. 22). Lo zigote è provvisto di una doppia membrana non stratificata e contiene grossi granuli di amido il cui ammassarsi alla periferia impedisce, nell'osservazione a fresco, di scorgere dettagli di struttura interna della cellula dello zigote.

In conseguenza della fondazione di questa nuova varietà e della conoscenza esatta dei caratteri morfologici che oggi possediamo per i diversi stadi, la diagnosi della specie *Polytoma caudatum* Korschikoff deve essere riveduta per alcuni caratteri, e cioè:

Diagnosi antica

Estremità posteriore appuntita, spesso prolungata in una piccola coda che si assottiglia bruscamente.

Nucleo centrale.

Stigma grande, con contorno irregolare, posto un po' anteriormente alla metà del corpo. Spesso, accanto all'amido, anche grosse gocce d'olio.

Divisione cellulare quasi trasversale, che dà 4 cellule figlie; altri stadi sconosciuti.

Lunghezza delle cellule 12-16 micron. Forme giovanili lunghe 8 micron.

Diagnosi nuova

Estremità posteriore non sempre appuntita; quando lo è, l'estremità posteriore non è foggata ad appendice caudale bruscamente assottigliata.

Nucleo centrale o sub-centrale. Stigma mancante.

Gocce d'olio situate in varie regioni del corpo, tranne l'estremità posteriore, e contenenti un carotinoide (carotina o licopina). Divisione cellulare nettamente trasversale, che dà 4 o 8 cellule figlie.

Presenta riproduzione sessuale con gameti formanti zigoti aventi aspetto di cisti.

Lunghezza delle cellule 25-27 micron. Forme giovanili lunghe 9-12 micron.

SPIEGAZIONE DELLE FIGURE

Figg. 1-8. — Varie forme vegetative adulte. Il nucleo, centrale o subcentrale, mostra un grosso cariosoma; nelle figg. 1, 2, 4, 5, 7, sono visibili uno o due vacuoli anteriormente; nelle figg. 1-5, in prossimità dei vacuoli si notano goccioline d'olio con carotinoide. Numerosi granuli d'amido sono ammassati nella zona posteriore (figg. 1-7 ingrand. circa 700 diam.; fig. 8 ingr. circa 870 diam.).

Figg. 9-13. — Forme vegetative giovanili. Notevole, nella fig. 13, la posizione mediana dei granuli d'amido (figg. 9-12 ingrand. 1700 diametri; fig. 13 ingrand. 2700 diam.).

Fig. 14. — Inizio di divisione trasversa (ingr. 1000 diam.).

Fig. 15. — Divisione trasversa compiuta (ingr. circa 1300 diam.).

Figg. 16, 17, 18. — Fasi di divisione in 4 cellule figlie (ingrand. circa 1300 diam.).

Fig. 19. — Stadio di copulazione (ingrand. circa 1300 diam.).

Figg. 20, 21. — Fasi di divisione in 8 cellule figlie (fig. 20 ingr. circa 1075 diam.; fig. 21 ingr. 1250 diam.).

Fig. 22. — Zigoti nella massa gelatinosa (ingr. 1500 diam.).

Fig. 23. — Distribuzione dei vacuoli a metacromatina (rappresentati con granuli a tinta più scura nella figura) come appare con colorazione al Rosso Neutro (tracrome) (ingr. 1850 diam.).

Fig. 24. — Aspetto del condrioma dopo colorazione con Ematossilina di Heidenhain (ingr. circa 1850 diam.).

LUIGIA GRANDORI

NUOVO GENERE E NUOVA SPECIE
DELLA FAMIGLIA COLPODIDAE
(*Telostoma Ferroi*)

La forma di Colpodide che è oggetto del presente studio fu rinvenuta in buon numero di individui nella coltura in brodo di fieno fatta con terreno di prato naturale sotto Robinia, raccolto nei pressi della stazione ferroviaria di Cantù il 29 dicembre 1934. Il pH del terreno, misurato collo ionometro TRENEL subito dopo il prelevamento, risultò di 5.1.

La coltura venne fatta in cristallizzatori aggiungendo a 30 grammi di terreno 40 grammi di brodo di fieno diluito.

Le osservazioni furono eseguite in buona parte sul vivente, usando per lo studio dei dettagli l'obbiettivo ad immersione e gli oculari 12, 16, 25 compensatori. Il nucleo, essendo ben visibile, fu studiato a fresco sul vivente ed anche su preparati fissati e colorati con una soluzione di acido acetico al 3.5% a cui si aggiungeva 1% di verde di metile.

L'animale si presenta molto appiattito. Attenendomi alla nomenclatura adottata dagli altri studiosi, ho distinto le due superfici appiattite in *dorsale* e *ventrale*; quest'ultima è quella su cui si apre la bocca.

Il contorno dell'animale si presenta molto variabile, da ovale irregolare allungato fino alla forma di una storta allungata (fig. B), e sempre con l'estremità anteriore più o meno accentuatamente ricurva verso sinistra. Lungo il contorno si distingue l'*orlo sinistro* che presenta un'insenatura non profonda ma molto estesa verso l'estremità anteriore, l'*orlo destro* regolarmente convesso, e l'*orlo frontale* che corrisponde alla zona preorale dei *Colpoda* (fig. A).