

P. MODENESI (*), G. SERRATO VALENTI (*)

LOCALIZZAZIONE ISTOCHIMICA DELL'UREA NEL TALLO DI *PARMELIA CAPERATA* (LICHENES)

Riassunto — Nel tallo di *Parmelia caperata*, l'urea, localizzata istochimicamente attraverso la specifica reazione con lo xantidrolo, si accumula nel simbiote alga.

La definizione del metodo topochimico, effettuata dagli autori, conferma alcuni discussi aspetti della teoria dell'ureasi.

Abstract — *Histochemical localization of urea in Parmelia caperata (Lichenes) thalli.* In *Parmelia caperata* thalli, the urea, observed through the specific xanthidrol reaction, occurs only in the algal partner.

Our standardized method confirms some debated aspects of the urease theory.

Key words — *Lichens, Parmelia caperata, urea, histochemistry.*

INTRODUZIONE

Il trasferimento di nutrienti nei licheni sembra regolato da un'interessante azione reciproca tra urea, ureasi e certi composti tipici del metabolismo secondario lichenico noti come sostanze licheniche.

La comune presenza dell'ureasi nei licheni e la capacità del micobionte di sintetizzare urea, costituiscono le osservazioni fondamentali che hanno consentito di sviluppare la cosiddetta teoria dell'ureasi (AHMADJIAN, 1966). Secondo questa teoria i prodotti dell'idrolisi dell'urea, CO₂ e NH₃, influenzerebbero il metabolismo del ficobionte favorendo il mantenimento dello stato simbiotico.

La CO₂ determinerebbe un aumento dell'attività fotosintetica dell'alga, mentre l'NH₃ potrebbe essere usata nella sintesi di aminoacidi inducendo una rapida mobilitazione dei carboidrati, così come si può osservare in culture pure di *Chlorella* (SYRETT, 1962). In que-

(*) Istituto Botanico «Hanbury», Università, Corso Dogali 1/c, 16136 Genova.

sto modo, nei licheni, durante i periodi di attiva crescita del tallo, in primavera ed in autunno, potrebbe esistere un meccanismo attraverso cui il fungo aumenterebbe il flusso di nutrienti dall'alga (BLANCO *et al.*, 1984).

L'attiva scuola spagnola di biologia lichenica (Lichen Team) diretta da VICENTE (in bibl.) ha ulteriormente approfondito questo meccanismo proponendone la regolazione da parte delle sostanze licheniche (VICENTE e CIFUENTES, 1979; VICENTE, 1985).

Sono queste, fondamentalmente, esteri di sostanze fenoliche che sebbene appartenenti al metabolismo secondario del fungo, in genere dipendono per la loro sintesi dalla presenza dell'alga simbiote che ne caratterizza la specificità (CULBERSON e AHMADJIAN, 1980).

SMITH (1980) ha sollevato alcuni dubbi sulla teoria dell'ureasi rilevando, sostanzialmente, la scarsità di evidenze sperimentali ed il carattere speculativo delle affermazioni degli autori che se ne sono occupati.

A queste osservazioni ha fatto riscontro una notevole quantità di pubblicazioni posteriori al 1980 (recensiti da RICHARDSON, 1985; VICENTE, 1985; LEGAZ, 1985; HONEGGER, 1986) che hanno fornito nuovi ed importanti dati sperimentali.

Scopo del presente lavoro è quello di contribuire al chiarimento di uno degli aspetti della teoria dell'ureasi ancora irrisolto, la localizzazione dell'urea nei talli.

A tale scopo, attraverso l'impiego di tecniche istochimiche proprie dell'esperienza degli autori, sono state condotte ricerche su talli di *Parmelia caperata* nell'ambito di un più ampio programma sull'uso di tali metodiche nella biologia lichenica.

MATERIALE E METODI

Talli di *Parmelia caperata* (L.) Ach., epifiti su alberi di olivo, sono stati raccolti nei mesi di Febbraio e Ottobre 1987 e 1988 nei dintorni di Rapallo (GE), nella Liguria orientale, all'altitudine di 120 m.

Per le successive preparazioni del materiale sono state usate le estremità dei lobi tallini, dove più accentuati sono i fenomeni di crescita e di attiva divisione algale (AHMADJIAN, 1966).

Allo scopo di localizzare i depositi di urea è stato usato il metodo di GOMORI (1952), modificato da LILLIE (1965) e adattato dagli autori al particolare materiale vegetale impiegato.

Piccoli pezzi di tallo (1×1 cm) erano posti per diversi periodi

di tempo (7-10-15-20-30 giorni) in una soluzione al 5% di xantidrololo in acido acetico-etanolo (2:1) a basse temperature varianti da -60 a 0°C .

Dopo abbondante lavaggio in acqua, dai campioni sono state ottenute delle sezioni di $20\ \mu\text{m}$ di spessore al microtomo criostato.

Una serie di sezioni, montate in acqua, è stata direttamente osservata al microscopio Leitz 22 EB, un'altra serie è stata disidratata in alcool e montata in balsamo prima dell'osservazione.

Una terza serie di campioni, dopo fissazione in xantidrololo 5%, è stata preparata per l'inclusione in paraffina ed in metacrilato di glicole (JB4, Polyscience Inc.).

RISULTATI E DISCUSSIONE

L'urea precipita sotto forma di cristalli giallo-bruni di xantidrol-urea, in una soluzione di xantidrololo in acido acetico (GOMORI, 1952).

La reazione è l'unica realmente specifica per l'urea (GOMORI, 1952; LILLIE, 1965; PEARSE, 1985).

Come già rilevato da GOMORI (1952), in istochimica l'uso di questo test è limitato dalla severità dei danni alle strutture istologiche operate dal solvente e dalla lentezza con cui l'urea reagisce con il reattivo. Questo fatto determina consistenti fenomeni di diluizione e di dislocazione dell'urea, molto diffusibile, che comportano una diminuzione della sensibilità della reazione ed una localizzazione approssimativa nei tessuti.

Allo scopo di evitare tali inconvenienti LILLIE (1965) raccomanda l'immersione dei campioni in ghiaccio secco, seguita dalla fissazione in una miscela alcool-acetica di xantidrololo a -25°C per 14 giorni.

In questo modo si eviterebbe la diffusione dell'urea, in quanto i tessuti si scongelerebbero solo al momento della penetrazione del fissativo, ancora liquido a basse temperature.

Nel presente lavoro sono state seguite tali indicazioni, trovando che la temperatura di -10°C e la fissazione limitata a 7-10 giorni sono gli accorgimenti più idonei per ottenere i risultati migliori.

Temperature inferiori limitano la sensibilità della reazione, mentre temperature superiori comportano una cattiva conservazione dei tessuti che ostacola una corretta osservazione.

Cristalli bruni di xantidrol-urea sono osservabili in sezioni ottenute al microtomo criostato, direttamente montate in acqua o disidratate e montate in balsamo.

L'infiltrazione con paraffina, consigliata da GOMORI (1952), diminuisce la sensibilità della reazione, in quanto parte dei cristalli vengono solubilizzati.

L'infiltrazione con resine idrosolubili (JB4) rimuove completamente i cristalli.

Dai nostri risultati appare che la reazione per l'urea è positiva solamente nello strato algale del tallo eteromero di *P. caperata* (Fig. 1). Precipitati giallo-bruni sono visibili all'interno della cellula algale, nello spazio compreso tra la parete cellulare ed il cloroplasto centrale, presumibilmente nel citoplasma, contratto per le severe condizioni di fissazione (Figg. 2, 3). La reazione è negativa negli altri compartimenti tallini occupati dal solo fungo.

I nostri risultati rendono valida l'ipotesi di LEGAZ (1985). Per questo autore l'urea sarebbe principalmente prodotta dall'alga per idrolisi dell'arginina, traslocata dal fungo.

Del resto il nostro dato coincide anche con il risultato ottenuto da LEGAZ e VICENTE (1981) in *Evernia prunastri*, dove l'attività ureasica è praticamente ristretta (93%) al solo ficobionte.

Un'ultima osservazione riguarda la positività della reazione relativamente ai periodi di raccolta.

I campioni raccolti in autunno dimostrano una spiccata positività alla reazione con lo xantidrol, mentre quelli raccolti in primavera presentano una reattività più modesta.

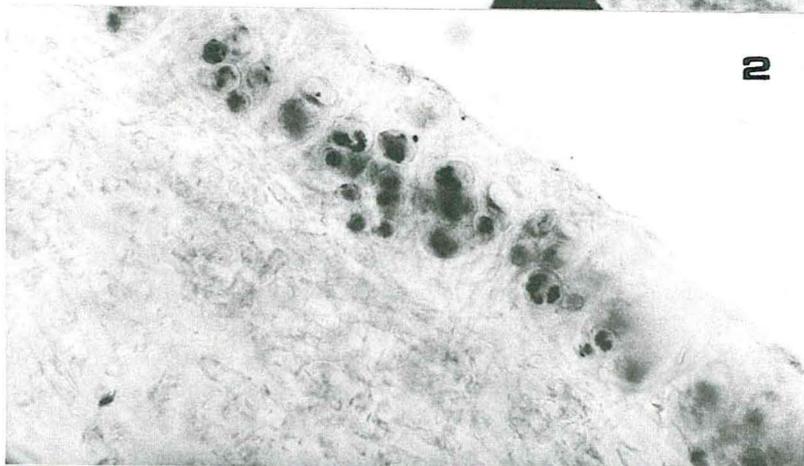
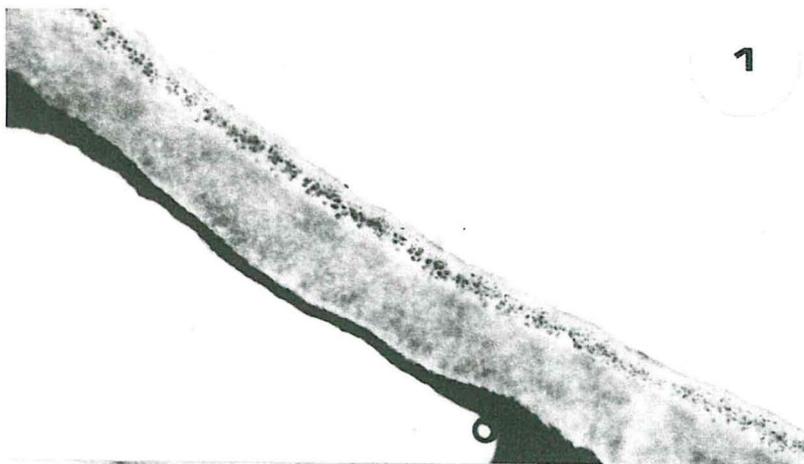
Anche questo dato concorda con le osservazioni effettuate da alcuni autori spagnoli (LEGAZ *et al.*, 1982; BLANCO, 1983) che mostrano come a partire dall'autunno fino alla fine dell'inverno si verifica in *Evernia prunastri* una caduta del contenuto di aminoacidi liberi, indicante una carenza di azoto che innescherebbe il meccanismo compensativo dell'attività ureasica (AHMADJIAN, 1966).

In conclusione il nostro lavoro rappresenta la prima evidenza istochimica della localizzazione dell'urea nel tallo lichenico, ottenuta attraverso la definizione del metodo modificato da LILLIE (1965).

Fig. 1 - Sezione trasversale del tallo di *Parmelia caperata*. I precipitati giallo-bruni di xantidrol-urea sono distribuiti uniformemente in tutto lo strato algale. Il cortex inferiore appare nero per la presenza di pigmenti scuri. 25×.

Fig. 2 - Sezione trasversale del tallo di *P. caperata*. Ingrandimento della precedente mostrante la localizzazione nella cellula algale. 100×.

Fig. 3 - Sezione trasversale del tallo di *P. caperata*. Osservazione in microscopia fluorescente. Sul cloroplasto, autofluorescente, appaiono addossati i precipitati cristallini, neri e non fluorescenti. 100×.



Ringraziamenti

Lavoro svolto con il contributo M.P.I., linea di ricerca: Biologia dei licheni.

BIBLIOGRAFIA

- AHMADJIAN V. (1966) - Lichens. In: S.M. Henry, ed., 'Symbiosis'. Academic Press, London-New York, 35-97.
- BLANCO M.J. (1983) - Utilizacion metabolica de la urea por talo de *Evernia prunastri*. Tesis doctoral, Facultad de Biologia, Universidad Complutense, Madrid.
- BLANCO M.J., SUAREZ C., VICENTE C. (1984) - The use of urea by *Evernia prunastri* thalli. *Planta*, **162**, 305-310.
- CULBERSON C.F., AHMADJIAN V. (1980) - Artificial re-establishment of lichens. II. Secondary products of resynthesized *Cladonia cristatella* and *Lecanora chrysoleuca*. *Mycologia*, **72**, 90-108.
- GOMORI G. (1952) - Microscopic histochemistry. Principles and practice, 117-118, University of Chicago Press, Chicago.
- HONEGGER R. (1986) - Ultrastructural studies in lichens. II. Mycobiont and photobiont cell wall surface layers and adhering crystalline lichen products in four Parmeliaceae. *New Phytol.*, **103**, 797-808.
- LEGAZ M.E. (1985) - The regulation of urea biosynthesis. In: C. Vicente e H.D. Brown, eds., 'Surface physiology of lichens'. Universidad Complutense, Madrid, 57-72.
- LEGAZ M.E., VICENTE C. (1981) - Location of several enzymes of L-arginine catabolism in *Evernia prunastri* thallus. *Z. Naturforsch.*, **36**, 692-693.
- LEGAZ M.E., CIFUENTES B., VICENTE C. (1982) - Mecanismos de sintesis e inactivation de ureasa in *Evernia prunastri*. In: C. Vicente, ed., 'Estudios sobre biologia'. Universidad Complutense, Madrid, 101-116.
- LILLIE R.D. (1965) - Histopathologic technic and practical histochemistry. McGraw-Hill, New York, 256.
- PEARSE A.G.E. (1985) - Histochemistry theoretical and applied. Churchill-Livingstone, London, 1026.
- RICHARDSON D.H.S. (1985) - The surface physiology of lichens with particular reference to carbohydrate transfer between the symbionts. In: C. Vicente e H.D. Brown, eds. 'Surface physiology of lichens'. Universidad Complutense, Madrid, 25-55.
- SMITH D.C. (1980) - Mechanisms of nutrient movement between the lichen symbionts. In: C. Cook, P. Pappas, E. Rudolph, eds., 'Cellular interaction in symbiosis and parasitism'. Ohio State University Press, Columbus, 197-227.
- SYRETT P.J. (1962) - Nitrogen assimilation. In: R.A. Lewin, ed., 'Physiology and biochemistry of algae'. Academic Press, London-New York, 171-188.
- VICENTE C., ASPIROZ A., ESTEVEZ M.P., GONZALEZ M.L. (1978) - Quaternary structure changes and kinetics of urease inactivation by L-uscnic acid in relation to the regulation of nutrient transfer between lichen symbionts. *Plant, Cell and Environ.*, **1**, 29-33.

VICENTE C., CIFUENTES B. (1979) - Reversal by L-cysteine of the inactivation of urease by L-usnic acid. *Plant Sci. Lett.*, **15**, 165-168.

VICENTE C. (1985) - Surface physiology in lichens: facts and concepts. In: C. Vicente e H.D. Brown, eds., 'Surface physiology of lichens'. Universidad Complutense, Madrid, 11-24.

(ms pres. il 3 luglio 1989; ult. bozze il 23 febbraio 1990)

