

IL COMPORTAMENTO DEI PROTOZOI CILIATI

Nicola Ricci

Generalità sui Protozoi

I Protozoi furono scoperti in gocce d'acqua dolce sul finire del 1600 dall'olandese Van Loeweneck (1674), che pure faceva uso di un microscopio assolutamente primordiale (era in realtà una semplice lente biconvessa fissata ad un supporto meccanico elementare, anche se capace di facilitare notevolmente l'osservazione): questo naturalista, dopo lunghe ed attente osservazioni, fu in grado di distinguere molte forme diverse di Protozoi, da lui detti «animalcula», e di descriverle graficamente in modo così preciso che, in taluni casi, è possibile riconoscerle ancora oggi, che siamo ormai abituati alle meravigliose immagini ottenibili col Microscopio Elettronico a Scansione.

Premesso questo, va ricordato che i Protozoi restarono in realtà per lungo tempo «oggetti naturali misteriosi» e che essi non furono recuperati al mondo scientificamente indagabile che alla fine del secolo scorso, quando ne fu descritto mirabilmente l'infinito variare di forma e funzione dal tedesco Butschli (1876), dall'italiano Balbiani (1882) e dal francese Maupas (1889).

A circa un secolo di distanza, con una massa incredibile di dati a disposizione, possiamo definire i Protozoi solamente come «eucarioti unicellulari» ed individuarne l'appartenenza al Regno Protista, nulla potendo aggiungere a tale definizione, senza cominciare ad escludere alcune forme di questo eterogeneo insieme di organismi, comparsi negli oceani primordiali del nostro pianeta circa due miliardi di anni fa (Nanney, 1980).

Questa notazione cronologica è di estrema importanza, perché ci dice che i Protozoi, al momento della comparsa dei primi Vertebrati, circa mezzo miliardo di anni fa, avevano già vissuto una storia evolutiva tre volte più lunga di quella che ha poi portato dai primitivi Ostracodermi all'Uomo. A sua volta, una considerazione di questo tipo, lungi dal costituire un mero sofisma accademico, ci introduce alla comprensione di uno degli aspetti più importanti della biologia dei Protozoi, di cui, tra l'altro, stiamo rendendoci conto solo in questi ultimi anni: organismi così antichi hanno subito processi di diversificazione estremi, in seguito all'esplorazione dei più diversi habitat ed al parallelo adattamento alle più diverse strategie di vita. Possiamo concludere dicendo che i Protozoi rappresentano oggi il gruppo di viventi che offre la gamma più vasta, potremmo quasi dire infinita, di variazioni sul tema «cellula-eucariotica».

È per questo loro aspetto, unitamente alla caratteristica singolare di assommare nella stessa entità vivente tanto il significato di cellula quanto quello di organismo completo, che i Protozoi rappresentano oggi strumenti privilegiati per ricerche condotte nei più diversi campi della Biologia, dalla genetica allo studio delle interazioni cellulari, dalla elettrofisiologia della membrana cellulare alla biologia ambientale, fino a quelli, più complessi e delicati, della biologia evoluzionistica.

Introduzione allo studio della motilità dei Protozoi

La motilità dei Protozoi fu studiata esaurientemente con mentalità moderna già da Jennings (1906), che appuntò la sua attenzione su di essa, intendendola come un tratto particolarmente importante della loro biologia. Va qui ricordato per inciso che Carlson (1962) considerò a sua volta la motilità dei Protozoi un elemento così caratterizzante la loro attività vitale, da poter essere considerato a ragione il parametro chiave, in base a cui giudicare addirittura se e quando un certo protozoo cessi di vivere. Nel suo capolavoro, Jennings auspicò lo studio estensivo ed esauriente di tutto il complesso dell'attività motoria di una certa specie, schematizzato mediante elementi d'azione semplici, tali da poter essere compresi in un insieme organico più vasto e completo, da lui indicato col termine «sistema d'azione». La sua brillante intuizione fu tuttavia trascurata dai protozoologi che lo seguirono e solo il recente fiorire dell'attenzione per il comportamento animale in generale ha condotto all'introduzione del concetto di «etogramma», ad opera di Eibl-Eibesfeldt (1967): fu infatti questo autore che indicò la prioritaria importanza del descrivere l'insieme del comportamento di una data specie, mediante «una sorta di catalogo delle sue componenti elementari, tanto qualitative che quantitative, l'etogramma», appunto, che permettesse la razionalizzazione più completa possibile di un fenomeno così complesso quale è il comportamento.

Lo studio qualitativo e quantitativo della motilità dei Protozoi, oltre ad avere un ovvio valore intrinseco, offre anche uno strumento di grande rilievo concettuale: dobbiamo infatti ricordarci che, nel caso del moto di organismi acquatici molto piccoli, quali appunto i Protozoi, le forze viscoelastiche sono di gran lunga preminenti su quelle inerziali nel determinarne la modalità di movimento, a differenza di quanto avviene invece per gli organismi acquatici più grandi, cui siamo abituati a pensare. In base al numero di Reynolds, $Re = LV\rho/\mu$, dove ρ = densità del mezzo, μ = viscosità del mezzo, L = dimensioni del corpo in movimento e V = la sua velocità, possiamo affer-

mare che lo stato di moto di un protozoo riflette, punto per punto e istante per istante, l'attività complessiva dei motori cellulari: per i Ciliati in particolare — i cui organi motori sono costituiti da un notevole numero di cilia, l'intensità e la qualità del cui battito sono a loro volta sotto il diretto controllo del potenziale della membrana cellulare — ciò equivale a dire che la descrizione del succedersi temporale dei diversi moduli comportamentali rappresenta un modo di visualizzare anche le contemporanee variazioni, che si susseguono nello stato del potenziale di membrana.

Con tutto questo in mente ed incoraggiati dalla constatazione di Van Houten et Al. (1981), che sottolineano come siano oggi disponibili pochissimi dati descrittivi del comportamento motorio dei Protozoi *per se*, a fronte di un'enorme messe di dati noti sui meccanismi molecolari responsabili del controllo di tale motilità, abbiamo studiato il movimento di tre specie di Ciliati, nel tentativo (a) di darne le prime esaurienti descrizioni qualitative e quantitative (etogrammi), (b) di confrontarne i diversi parametri con lo scopo di evidenziare possibili diversità significative e (c) di cercare di andare più a fondo nella comprensione delle strategie adattative delle diverse specie, usando proprio quel nuovo strumento conoscitivo che è l'etogramma.

(A) L'ETOGRAMMA DI LITONOTUS LAMELLA (Ricci et Al., in prep.)

Questo ciliato, lungo circa 250 μm , ha il corpo compresso lateralmente e si muove sul substrato con il suo lato destro, che è regolarmente coperto di cilia e che finisce per divenire la sua superficie ventrale, funzionalmente parlando (fig. 1). Questa specie si muove sul substrato lungo archi geometricamente perfetti che, da considerarsi s.s. dorsoversi, sono destrorsi, invece, dal punto di vista della geometria della traccia. Il raggio medio di questi archi ($518 \mu\text{m} \pm 119 \mu\text{m}$) è circa il doppio della lunghezza media della specie e la frequenza con cui essi vengono interrotti nel tempo è mediamente di circa $4,5 \pm 2,5$ secondi. Studiando la velocità media della specie, si è visto che essa è di 189

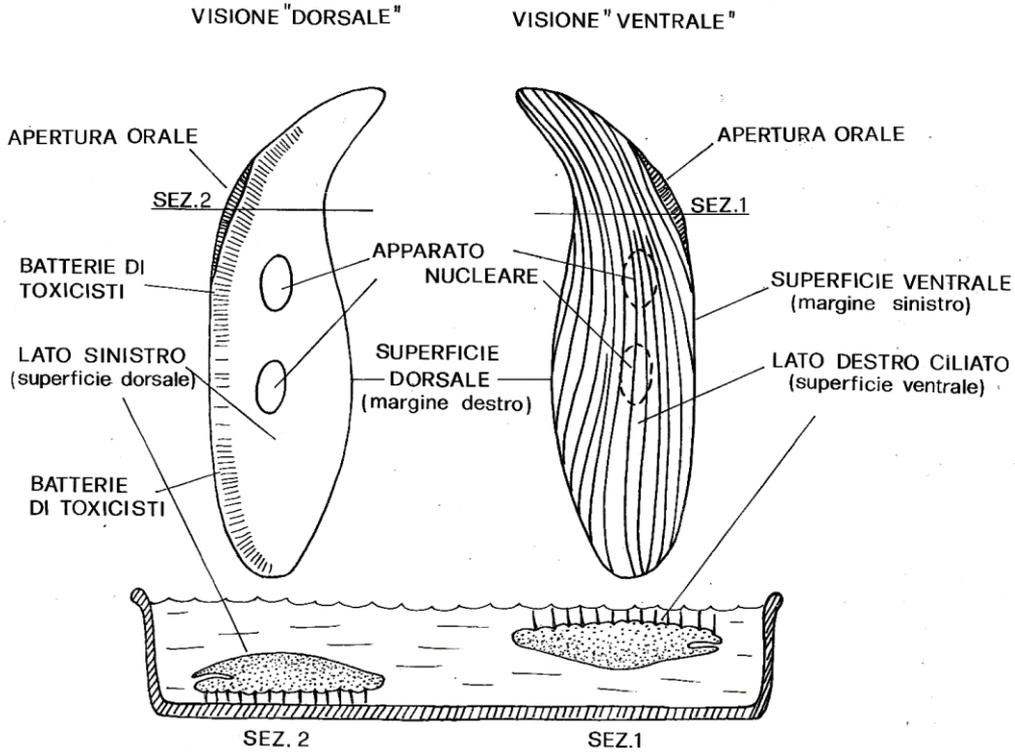


fig. 1 - *Litonotus lamella*: la sua morfologia è caratterizzata dall'accentuata compressione laterale, a seguito della quale le reali superfici dorsale e ventrale, indicate in maiuscolo, divengono i margini destro e sinistro rispettivamente, indicati in minuscolo. Analogamente, le superfici sinistra e destra reali, indicate in maiuscolo, divengono funzionalmente parlando, le superfici dorsale e ventrale rispettivamente, indicate in minuscolo. Per amore di chiarezza, l'apertura orale è stata rappresentata molto più aperta ed evidente di quanto invece non sia nella realtà.

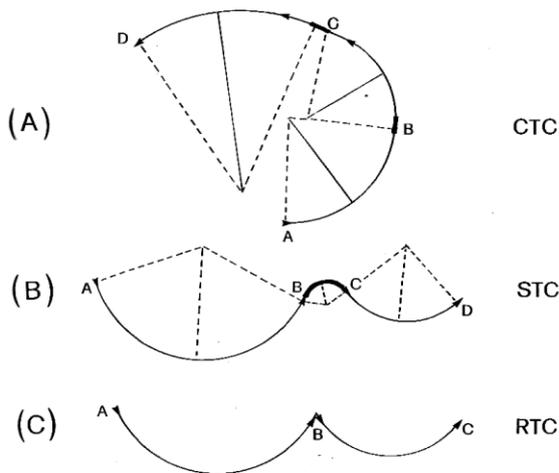


fig. 2 - Tre tracciati schematizzati da videoregistrazioni sono stati riportati allo scopo di rappresentare tre diversi tipi di correzioni di rotta: i tratti ispessiti della traccia A mostrano due successive CTC, mentre quello della traiettoria B rappresenta una STC; nella traccia C, infine, è indicata una RTC, a livello della congiunzione tra i due archi.

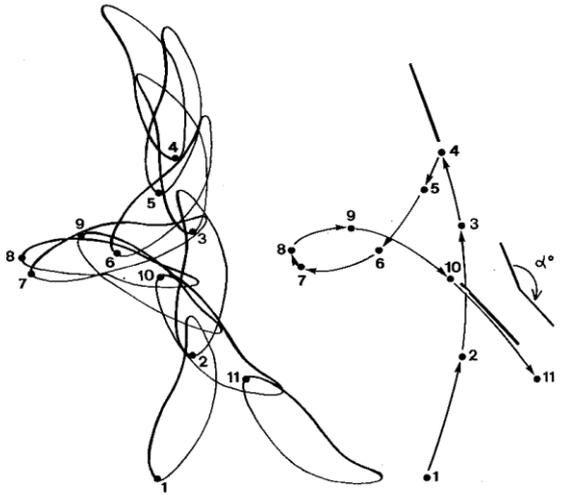


fig. 3 - La Reazione di Scansamento (SSR) di *L. lamella* rappresenta la reazione più complessa che questo organismo sa effettuare spontaneamente, o a seguito di uno stimolo esterno, col risultato di cambiare integralmente la direzione del proprio movimento; nel disegno è stato evidenziato l'estremo posteriore del protozoo (macchia scura) per facilitare la visualizzazione dell'intera reazione, schematicamente riportata nella parte destra. Nel suo moto lungo l'arco iniziale, il *litonotus* si ferma all'improvviso (punto 4), rincula lungo un breve arco (punti 5 e 6), si ferma ancora in 7, prima di riprendere il moto in avanti lungo la nuova traiettoria (punti 8, 9, 10 e 11). L'angolo di cui la traiettoria risulta cambiata (α) è individuato dalla direzione dell'asse longitudinale del protozoo al momento del primo stop (punto 4) e da quella del medesimo asse al momento in cui, muovendosi lungo la nuova traiettoria, interseca la vecchia, tra i punti 10 ed 11.

$\mu\text{m}/\text{sec} \pm 40 \mu\text{m}/\text{sec}$: se però misuriamo la velocità con cui un *Litonotus* si sposta lungo archi ininterrotti, si vede che essa sale a $206 \mu\text{m}/\text{sec} \pm 45 \mu\text{m}/\text{sec}$. È ovvio che questa seconda stima della velocità è più prossima al vero della precedente, in cui venivano computati anche i tempi spesi nelle correzioni di rotta: rapportata alla lunghezza media della specie ha un valore di circa 0,86 «unità relative»/sec.

Si sono poi studiate le reazioni motorie con cui la specie cambia traiettoria durante il moto sul substrato: si è così dimostrato che l'infinita gamma di possibilità in tal senso è in realtà solo apparente, in quanto i moduli comportamentali con cui un *Litonotus* cambia traiettoria possono essere de-

scritti esaurientemente da non più di quattro reazioni-tipo, di seguito riportate secondo un ordine di crescente discontinuità e drammaticità.

(I) CTC (Continuous Trajectory Change = Cambio di Traiettoria Continuo): usato nel 26% circa dei casi, consiste in un graduale cambio di rotta effettuato a velocità praticamente immutata (circa $200 \mu\text{m}/\text{sec}$) rispetto a quella sopra riportata (fig. 2.A).

(II) STC (Smooth Trajectory Change = Cambio di Traiettoria Graduale): usato assai raramente, nel non più del 5% dei casi, è ben riconoscibile per il fatto che il ciliato si muove, per breve tratto, lungo un arco sinistrorso di raggio molto ridotto (fig. 2.B); durante l'esecuzione di una STC, un *Litonotus* riduce sensibilmente la veloci-

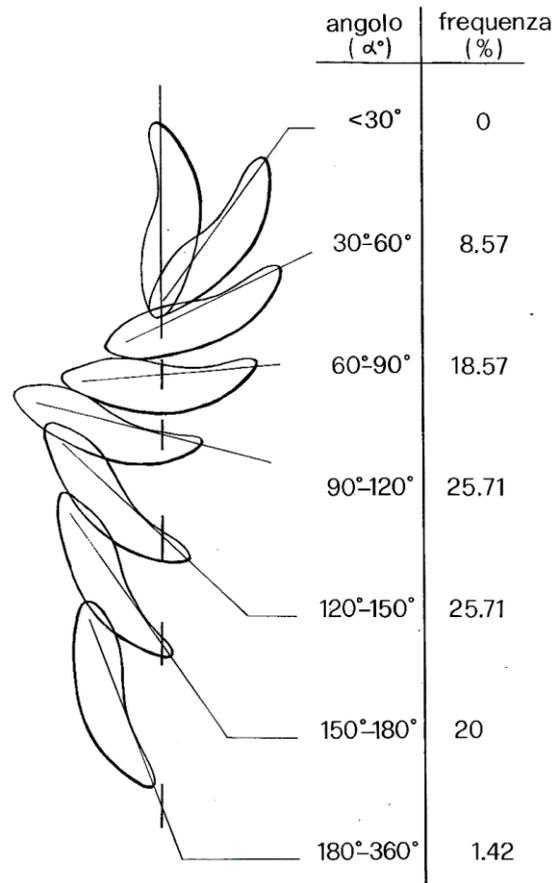


fig. 4 - Schema delle possibili SSR osservate in *L. lamella*: per ogni possibilità sono indicati l'angolo di correzione e la relativa frequenza di osservazione.

tà, che finisce per aggirarsi su valori di circa $177 \mu\text{m}/\text{sec}$, in media.

(III) RTC (Rough Trajectory Change = Cambio di Traiettoria Brusco), circa il 10% dei casi osservati è di questo tipo: il ciliato si ferma ($v = 0 \mu\text{m}/\text{sec}$) per un tempo minimo, circa $1/10$ di secondo, in un punto attorno a cui bascula poi a mo' di ago di bussola, prima di riassumere il movimento in avanti lungo un nuovo arco (fig. 2.C).

(IV) SSR (Side Stepping Reaction = Reazione di Scansamento): è questo il tipo più comune di correzione di rotta, essendo effettuato nel 59% dei casi (fig. 3). Il ciliato rincula di circa $600 \mu\text{m}$, ad una velocità negativa (lo spostamento avviene cioè verso l'estremità caudale del protozoo) di circa $170 \mu\text{m}/\text{sec}$, si ferma poi per un periodo brevissimo (minore di $1/10$ di secondo) e riprende poi a muoversi in avanti su di una nuova traiettoria. È questo l'esempio più complesso e radicale di cambiamento di rotta, a seguito del quale il *Litonotus* si sposta lungo una nuova traiettoria, che giace a $117^\circ \pm 47^\circ$ rispetto alla precedente, invariabilmente spostata in senso orario (fig. 4).

Quanto al nuoto di questa specie dobbiamo sottolineare che esso rappresenta un movimento usualmente trascurato da questa specie, non essendo usato che nel 5% dei casi, o anche più raramente. I *Litonotus* nuotano in avanti lungo un'elicoide, ruotando in senso orario attorno all'asse rettilineo centrale, fendendo l'acqua col profilo dorsale e mantenendo la superficie destra, ciliata, rivolta verso l'esterno (fig. 5). Il passo dell'elicoide è di $565 \mu\text{m} \pm 160 \mu\text{m}$, pari a circa due lunghezze cellulari, ed il raggio è di $40 \mu\text{m} \pm 10 \mu\text{m}$; la velocità di spostamento nel mezzo (non quella reale di spostamento lungo la traiettoria reale, che è ovviamente superiore), è di $283 \mu\text{m}/\text{sec} \pm 72 \mu\text{m}/\text{sec}$, pari cioè a 1,13, se rapportata alla lunghezza media della specie.

Le correzioni di rotta durante il nuoto sono molto irregolari, a differenza degli analoghi moduli comportamentali su substrato, e pertanto sfuggono a qualunque tipo di schematizzazione veridica: si potrebbe ovviamente trovare una serie di elementi mediante i quali descrivere questo o quel tipo di cambio di traiettoria, ma in questo caso l'operazione di astrazione concettuale sarebbe esagerata e finirebbe in ultima analisi

per non riflettere più la realtà dei fenomeni naturali.

L'ultimo aspetto del comportamento motorio di questa specie che abbiamo studiato è quello della predazione, che costituisce un tratto caratterizzante la specie, essendo *Litonotus lamella* un organismo tipicamente carnivoro. Un *litonotus*, a seguito di un urto apparentemente casuale con un ciliato opportuno, quale per esempio *Euplotes crassus*, è in grado di paralizzare ed uccidere la preda con una sola salve delle sue toxicisti e di ritrovarla poi anche ad una certa distanza, interiorizzandola, dopo averla inglobata in un enorme vacuolo alimentare, che scomparirà alla vista dopo circa 20 minuti. In generale possiamo dire che il complesso delle reazioni motorie tipiche dell'attività predatoria di *Litonotus* è quasi integralmente diverso dall'insieme dei moduli comportamentali che si osservano normalmente in

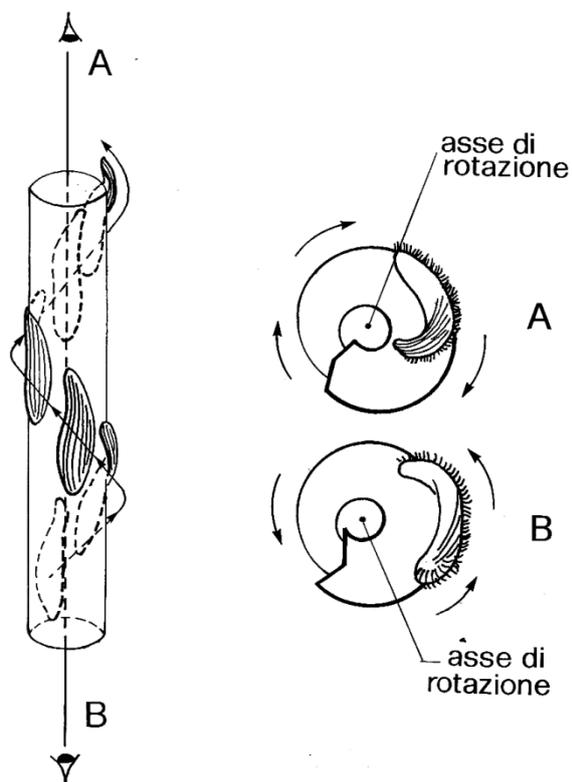


fig. 5 - *L. lamella* nuota lungo un'elicoide avvolta attorno ad un asse rettilineo. In A è stato rappresentato un *Litonotus* che sta nuotando verso l'osservatore (visione anteriore), mentre in B un *Litonotus* in allontanamento (visione posteriore).

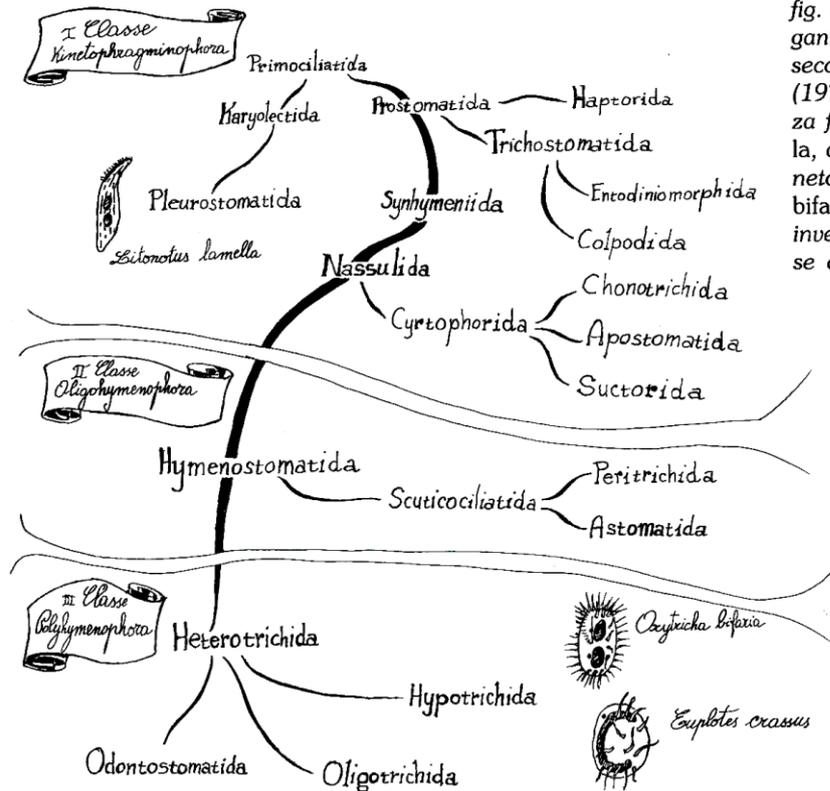


fig. 6 - Schema semplificato dell'organizzazione sistematica dei Ciliati, secondo la proposta di Corliss (1979): è evidente l'estrema distanza filogenetica tra *Litonotus lamella*, appartenente alla Classe dei Kinetophragminophora, ed *Oxytricha bifaria* ed *Euplotes crassus*, i quali invece sono da attribuire alla Classe del Polyhymenophora.

tutte le altre espressioni di attività motoria. Questo dato è di gran rilievo perché ci sta ad indicare che questa specie, per quanto primitiva nell'ambito dei Protozoi Ciliati, ha saputo evolvere un sistema complesso di reazioni con le quali porsi in modo opportuno in rapporto con l'ambiente, aumentando adeguatamente il repertorio dei propri moduli di comportamento in funzione della propria strategia adattativa, che è appunto quella del predatore.

(B) GLI ETOGRAMMI DI OXYTRICHA BIFARIA E DI EUPLOTES CRASSUS

Entrambe le specie sono state scelte per essere studiate dal punto di vista della loro motilità, in quanto (a) erano già ben note per molteplici aspetti della loro biologia e (b) appartengono allo stesso gruppo sistematico, quello degli Ipotrichi. Nel quadro della sistematica dei Ciliati, dato da Corliss (1979) e riportato in maniera semplificata in fig. 6, gli Ipotrichi sono i più lontani, evolutivamente parlando, dai Pleurostomatida, cui invece appartiene *Litonotus lamella*: questa

estrema distanza evolutiva è di grande interesse per i possibili raffronti qualitativi e/o quantitativi tra i rispettivi etogrammi. Gli Ipotrichi sono Ciliati caratterizzati da una morfologia generale (fig. 7) in cui la superficie dorsale convessa nettamente si distingue da quella ventrale, piano-concava: su quest'ultima sono impiantati gli organuli motori, costituiti da un numero variabile di cilia agglutinate, i cirri, le membranelle adorali (AZM) e la membranelle ondulante (UM).

Oxytricha bifaria, ipotricho dulciaquicolo lungo circa 110 μm , si muove sul substrato lungo una serie di archi geometrici sinistrorsi, collegati da diversi tipi di reazioni, con le quali il ciliato cambia la direzione del movimento. Benché la velocità media della popolazione sia molto variabile (500 $\mu\text{m}/\text{sec} \pm 290 \mu\text{m}/\text{sec}$), si è visto che un singolo organismo tende a spostarsi con una sua velocità tipica e molto costante, diversa da caso a caso: qualora si rapporti la velocità media della specie con la sua lunghezza media,

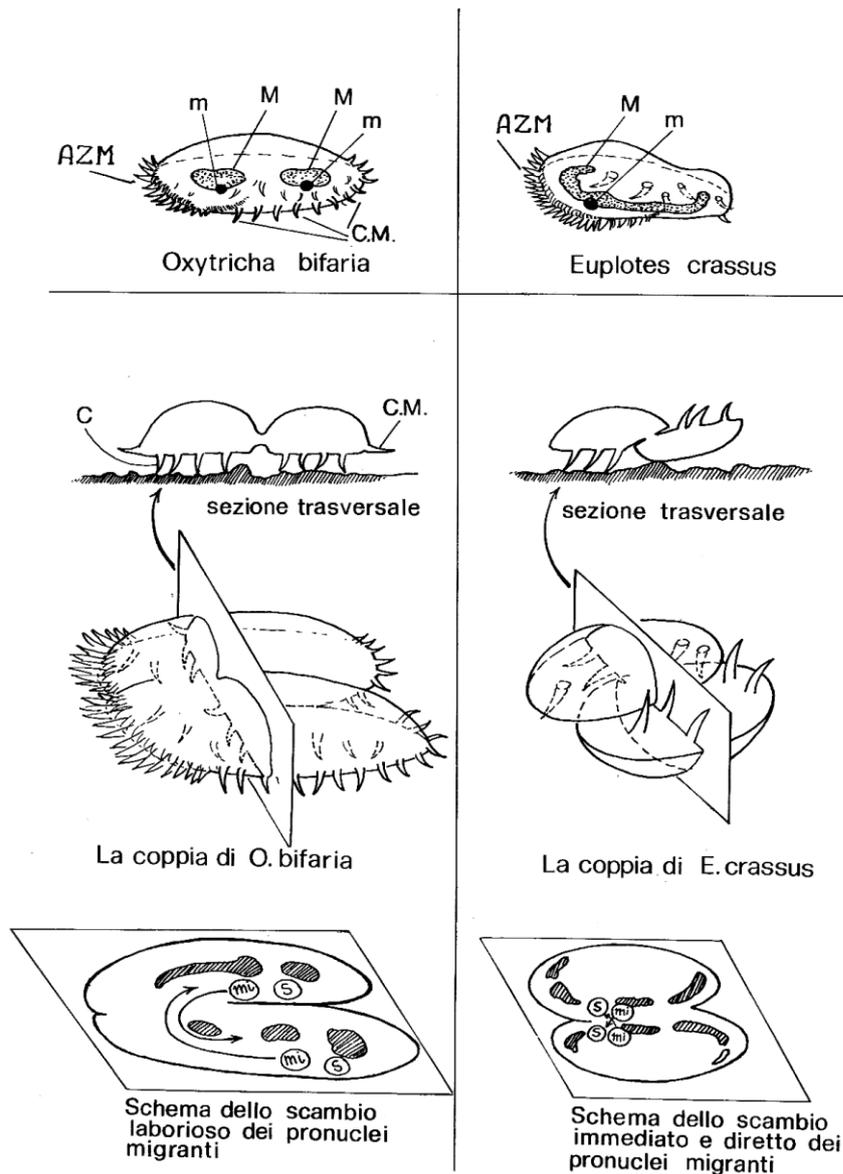


fig. 7 - Tavola comparativa delle caratteristiche distintive di *Oxytricha bifaria* ed *Euplotes crassus*: per ciascuna specie è stato rappresentato, dall'alto, l'organismo-tipo, la sezione trasversale della coppia, la coppia stessa ed uno schema, in visione dorsale, delle traiettorie seguite dai pronuclei migranti nel movimento verso i pronuclei stazionari complementari. M = macronucleo; m = micronucleo; AZM (Adoral Zone Membranelles) = membranelle adoral; C = cirri; CM = cirri marginali; mi = pronucleo migrante; s = pronucleo stazionario.

otteniamo un valore di circa 4.55 Unità Relative (UR)/sec.

Osservazione analoga può esser fatta a proposito dei raggi degli archi lungo cui questi ciliati si muovono: benché i loro valori siano per l'intera popolazione molto dispersi ($800 \mu\text{m} + 450 \mu\text{m}$), o, in unità di lunghezza relative, $7,27 \pm 4,09$, ciascuna oxitrica si muove preferenzialmente lungo archi successivi a raggio relativamente costante. Va detto che tanto la velocità che il raggio preferenziali di una certa *Oxytricha bifaria* non sono tuttavia correlati in alcun modo con suoi parametri dimensionali (lun-

ghezza, larghezza, altezza).

Le reazioni che raccordano i tratti successivi del moto bidimensionale sul substrato sono dello stesso tipo di quelle già descritte per *L. lamella*: CTC, STC, RTC, SSR. Va tuttavia precisato che nel caso di *O. bifaria*, a differenza di quanto osservato in *L. lamella*, il rapporto inverso che corre tra drammaticità della reazione ed entità di correzione di rotta da una parte e corrispondente durata nel tempo dall'altra è molto stretto: pur essendo difficoltosa l'esatta quantizzazione del parametro velocità durante le correzioni di rotta, a causa della loro estrema brevità

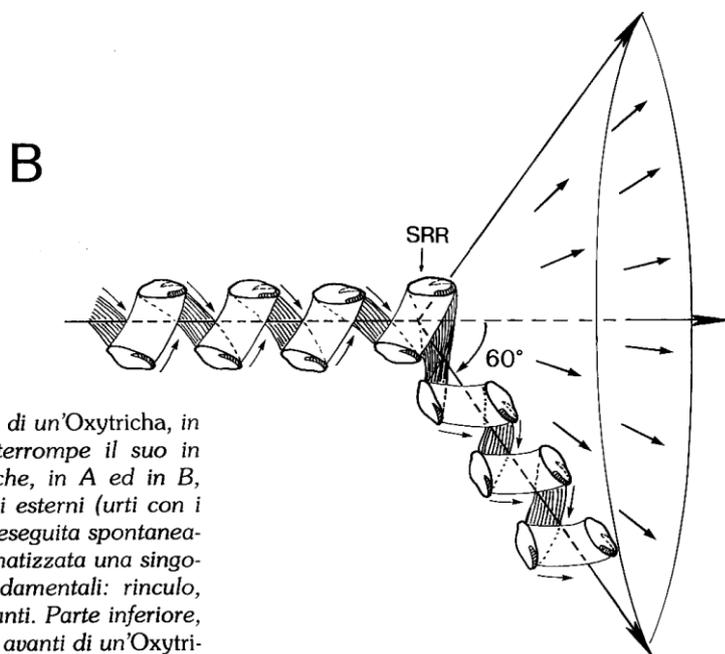
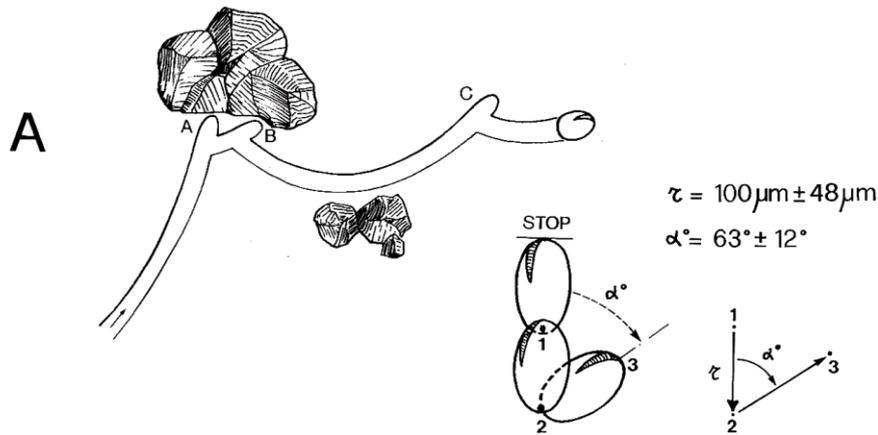


fig. 8 - Parte superiore, A: traccia di un'Oxytricha, in moto sul substrato, la quale interrompe il suo in avanti con tre successive SSR, che, in A ed in B, sono indotte da stimoli meccanici esterni (urti con i granuli di sabbia), mentre in C è eseguita spontaneamente. Nella parte destra è schematizzata una singola SSR con i suoi elementi fondamentali: rinculo, rotazione, ripresa del moto in avanti. Parte inferiore, B: schema del nuoto elicoidale in avanti di un'Oxytricha, interrotto da una SRR (Stop and Reorientation Reaction), che sposta la traiettoria di un angolo di circa 60 gradi, in una qualunque delle direzioni possibili attorno all'asse iniziale del nuoto.

sia nel tempo che nello spazio, è tuttavia possibile affermare con certezza che la CTC viene eseguita a velocità virtualmente uguale a quella normale, durante la CTC essa si riduce a valori di pochi micrometri al secondo, per divenire uguale a zero nella RTC ed addirittura negativa nella SSR.

Una considerazione particolare merita la SSR (fig. 8.A), che è, per *O. bifaria*, rigidamente stereotipata e scomponibile in una serie di diversi elementi successivi: (a) improvvisa interruzione del moto in avanti,

per cause interne e/o esterne; (b) rinculo lungo la stessa traiettoria «di andata», di circa $100 \mu\text{m} \pm 40 \mu\text{m}$; (c) rotazione oraria di $63^\circ \pm 12^\circ$, nella quale il ciliato si sposta facendo perno sulla sua estremità posteriore; (d) ripresa del moto in avanti, lungo un nuovo arco sinistrorso.

Il nuoto di *O. bifaria*, molto raro ed in generale rapportabile ad un modello di base simile a quello di *L. lamella*, è descrivibile come un movimento molto regolare, lungo un'elicoide sinistrorsa, percorsa ad una velo-

città di $750 \mu\text{m}/\text{sec} \pm 300 \mu\text{m}/\text{sec}$, con un passo di $220 \mu\text{m} \pm 75 \mu\text{m}$ ed un raggio di $40 \mu\text{m} \pm 20 \mu\text{m}$. Ricordando che la velocità reale lungo l'elicoide è certamente più alta di quanto da noi misurato considerando lo spostamento del ciliato lungo l'asse rettilineo centrale, la velocità di nuoto sopra riportata, è espressa da un valore di 6,82 UR/sec, che è nettamente superiore al 4,55 tipico della velocità su substrato. *O. bifaria* sembra capace di un solo tipo di cambiamento di rotta durante il nuoto: in tal caso si ferma per un istante, riprendendo poi il nuoto lungo un'elicoide angolata, rispetto al precedente tratto, di circa 60° , in qualunque direzione (fig. 8.B).

Si è poi studiato il comportamento precongiugativo, come esempio di motilità della stessa specie, al servizio di un evento di estremo rilievo per la biologia della specie, la riproduzione sessuale, o coniugazione. Si è così visto (fig. 9) che, una volta mescolati organismi appartenenti a tipi coniugativi complementari (fig. 9.A), si assiste ad un rallentamento generale del loro moto (fig. 9.B) e ad un successivo raggrupparsi di un gran numero di individui in un'area relativamente ristretta (fig. 9.C). All'interno di quest'area si assiste ad una reciproca esplorazione tra due cellule giunte in contatto casualmente (fig. 9.D-1), ad una successiva, lunga fase di riconoscimento di reciprocità,

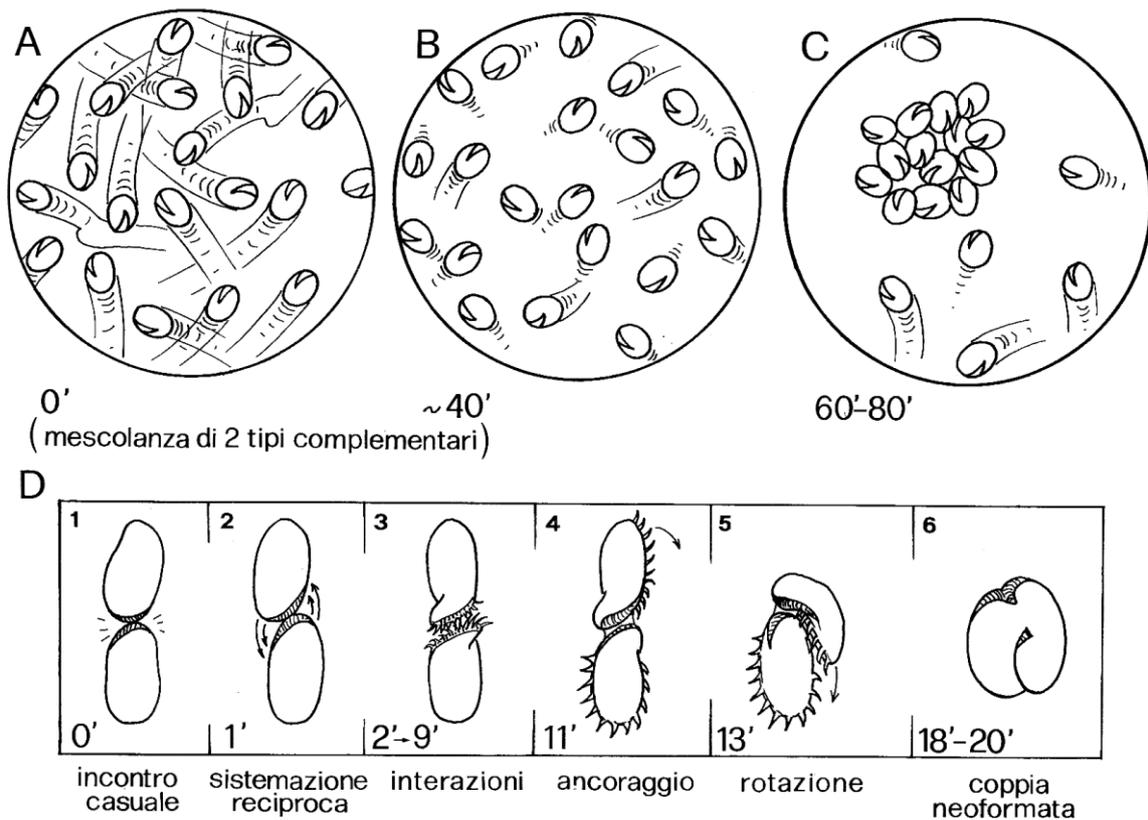


fig. 9 - Reazioni specifiche che precedono la reazione coniugativa in *Oxytricha bifaria*. A: fase iniziale durante la quale il comportamento motorio rimane inalterato (dura circa 40 minuti, dal momento della mescolanza dei tipi coniugativi complementari); B: gli organismi rallentano e (C) si concentrano in un'area unica, al cui interno avvengono le intense interazioni cellulari che rappresentate in D, portano alla formazione della coppia; (D): in (1) è rappresentato l'incontro di due partners potenziali, che scorrono poi lentamente l'uno contro l'altro (2), fino a far combaciare le rispettive aree peristomiali, a livello dei cui organuli ciliari avvengono intensissime interazioni cellulari dirette (3) che preludono all'ancoraggio di un partner al substrato per mezzo dei cirri marginali (4) ed alla successiva rotazione oraria dell'altro (5): le due cellule diverranno il partner sinistro e destro della coppia, rispettivamente.

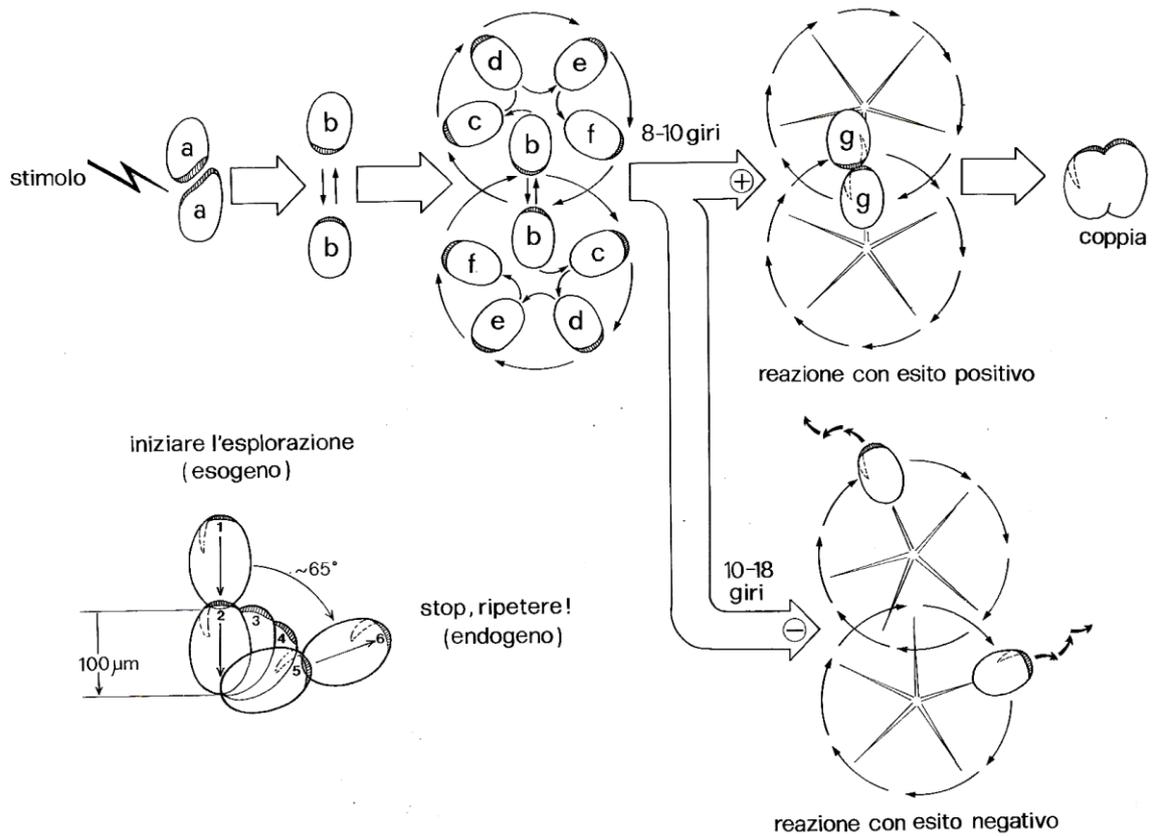


fig. 10 - La Reazione Esplorativa in *Oxytricha bifaria* viene tipicamente eseguita dai partners disturbati da stimoli esterni durante la fase interattiva corrispondente a D-3 di fig. 9. Nel complesso questa reazione è costituita da una serie di elementi simili alla SSR (cfr. fig. 8.A), uno dei quali è stato schematizzato nel riquadro in basso a sinistra, collegati da una «semplice» reiterazione temporale: il risultato complessivo di questo modulo comportamentale può essere positivo (a destra, in alto), se i partners si reincontrano nella zona di sovrapposizione delle due aree da essi scandite e portano a termine il processo di formazione della coppia, o negativo, se ciò non accade ed essi si allontanano l'uno dall'altro, muovendosi lentamente lungo una spezzata irregolare, ciascuno pronto a reiniziare la reazione coniugativa s.s., a seguito di un urto casuale con un nuovo partner potenziale.

che ha anche la funzione di impedire l'accoppiamento di partners omopolari, (Fig. 9D-3) e ad una successiva rotazione di un partner attorno all'altro, fissatosi al substrato mediante i cirri marginali (figg. 9.D-4-5-6). Qualora cause interne e/o esterne interrompano questa serrata catena di reazioni durante la fase 9.D-3, si assiste ad una sorta di «danza di ricerca», costituita per entrambi i partners, da una serie tante SSR ripetute nel tempo e reiterate nello spazio (fig. 10), col risultato che ciascun partner esplora un'area approssimativamente subcircolare e parzialmente sovrapposta all'analoga area esplorata dall'altro: al livello della sovrappo-

sizione capita con buona frequenza che i due partners disturbati possano reincontrarsi e portare a termine i processi preconiugativi già iniziati. Questa danza preconiugativa ci offre l'esempio di come una reazione motoria vegetativa (la SSR) possa talora essere utilizzata dalla specie per scopi completamente nuovi (la ricerca del partner) con la «semplice» aggiunta di un elemento di origine endogena (la reiterazione del modulo base).

L'analogo studio di *Euplotes crassus*, un ipotrico lungo circa 90 μm, ha rivelato che questa specie tende a muoversi sul substrato-

to lungo spezzate miste in cui i tratti arcuati sinistrorsi (circa 50% dei casi; raggio = $864 \mu\text{m} \pm 651 \mu\text{m}$; lunghezza dell'arco = $957 \mu\text{m} \pm 712 \mu\text{m}$) e destrorsi (circa 37% dei casi, raggio = $1568 \mu\text{m} \pm 1200 \mu\text{m}$; lunghezza = $1528 \mu\text{m} \pm 997 \mu\text{m}$) si alternano a tratti rettilinei (circa 13% dei casi, lunghezza = $856 \mu\text{m} \pm 860 \mu\text{m}$). Tale traiettoria mista è percorsa ad una velocità media di $850 \mu\text{m}/\text{sec} \pm 303 \mu\text{m}/\text{sec}$ che, rapportata alla lunghezza della specie è pari a 9,5 UR/sec, un valore ben più alto del 4,55 di *O. bifaria* e dello 0,82 di *L. lamella*.

La spezzata lungo la quale si muove *E. crassus* è, in definitiva, originata da una serie di cambi di traiettoria, descrivibili in termini di CTC, STC, RTC ed SSR, come già fatto per *L. lamella* ed *O. bifaria*. Per questo ciliato va osservato che la CTC sembra essere di gran lunga la più frequente (79% dei casi) tra i vari tipi di cambi di rotta, mentre più rare sono la STC (5,5%) e la RTC (14,5%) e quasi assente la SSR (0,76%). Que-

st'ultima reazione, nonostante sia così «trascurata» dalla specie in termini di frequenza di esecuzione, è tuttavia chiaramente stereotipata, in analogia con quanto già osservato in *O. bifaria*, ed è descrivibile in termini di (a) interruzione improvvisa del moto in avanti, (b) moto retrorso, sulla traiettoria appena percorsa di $129 \mu\text{m} \pm 62 \mu\text{m}$, (c) rotazione oraria, attorno all'estremo posteriore del protozoo, di $77^\circ \pm 24^\circ$ e (d) ripresa del moto in avanti su di una nuova traiettoria.

Per questa specie, inoltre, si è cercato di avere una idea, per quanto grossolana, della frequenza spontanea delle modulazioni del potenziale di membrana, misurando l'intervallo medio di tempo tra due correzioni di rotta successive, non facendo distinzione tra i diversi tipi, considerati comunque espressione di un cambiamento nello stato del potenziale stesso: si è così visto che il periodo medio per il quale il potenziale di membrana non varia, o per lo meno non varia

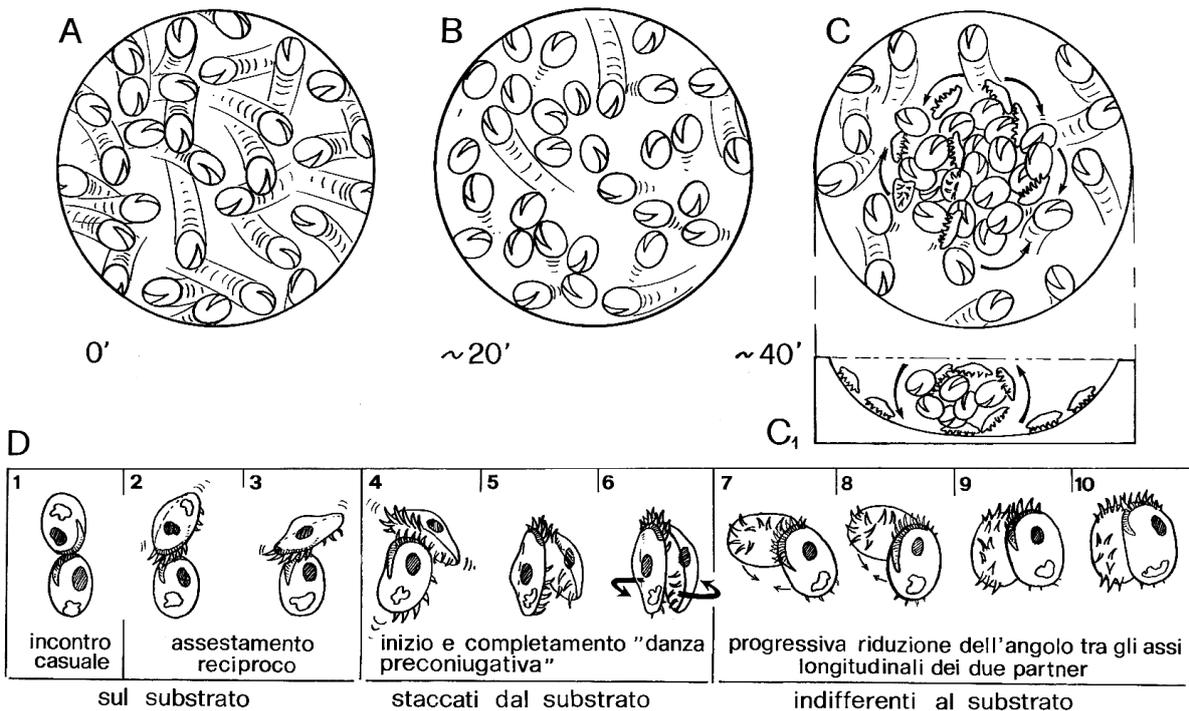


fig. 11 - Comportamento preconiugativo di *Euplotes crassus*. (A) periodo in cui la motilità si mantiene inalterata; (B): fase caratterizzata da una drastica riduzione della velocità dei componenti della popolazione, tranne alcuni, apparentemente «sordi» al fattore s.l. rallentante; (C): viene ora individuandosi uno spazio tridimensionale, al cui interno le interazioni sono più intense, raccogliendosi fino al 90% degli *Euplotes* dell'intera popolazione. (C1): lo stesso in una sezione trasversale del vetrino. (D): eventi finali della reazione preconiugativa.

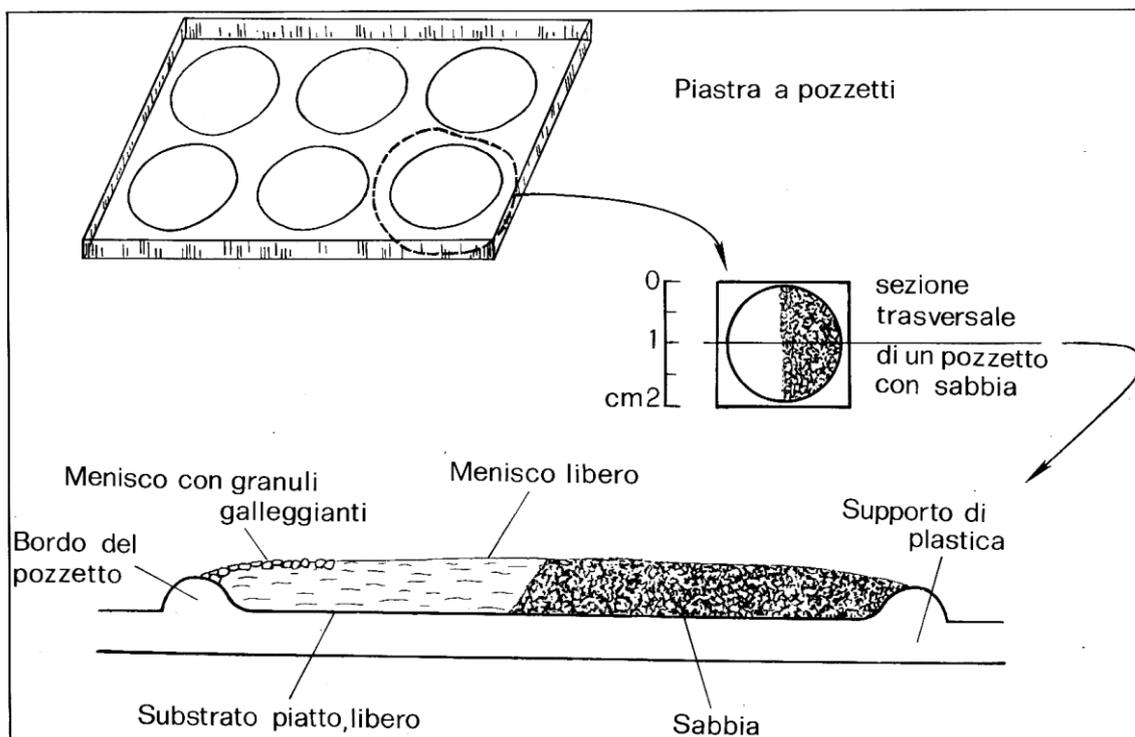


fig. 12 - Schema che illustra il procedimento seguito per saggiare la reazione degli *Ipotrichi* a diversi substrati in condizioni sperimentali che consentano una scelta effettiva.

tanto da influenzare il movimento, è di circa due secondi, contro i circa 4,5 di *Litonotus lamella*.

Anche *E. crassus*, seppure nel non più del 10% dei casi osservati, nuota e lo fa spostandosi lungo un'elicoide sinistrorsa, con la superficie ventrale rivolta verso l'interno, cioè verso l'asse di simmetria del movimento, analogamente a quanto già riportato anche per *O. bifaria*: il passo dell'elicoide ($424 \mu\text{m} \pm 51 \mu\text{m}$) ed il raggio ($43 \mu\text{m} \pm 9 \mu\text{m}$) si prestano a brevi considerazioni comparative: mentre il raggio sembra essere un parametro «minimo» approssimativamente uguale per tutti e tre i ciliati studiati, il passo varia ampiamente e, rapportato alla lunghezza della specie stessa, da circa 2 UR per *L. lamella* ed *O. bifaria*, passa ad un valore pari a circa 5 UR per *E. crassus*.

I cambiamenti di rotta durante il nuoto sembrano essere tutti dello stesso tipo di quello descritto per *O. bifaria*: l'unica differenza consiste nell'ampiezza dell'angolo formato dai due tratti separati dal cambiamen-

to di rotta, angolo che, per *E. crassus*, è di 80 gradi circa.

È poi stata studiata la reazione preconiugativa e si è visto che, a dispetto di una forte analogia di fondo con *O. bifaria*, questa specie ha tratti comportamentali ben caratteristici. Considerando tempo zero il momento in cui vengono mescolati i due cloni appartenenti a tipi coniugativi complementari, si è visto che nulla cambia nel comportamento dell'*Euplotes* per i primi 20-30 minuti (fig. 11.A), mentre, dopo circa 35-45 min, si assiste ad una progressiva riduzione della velocità del moto su substrato, fino ad arrivare, a circa 90 minuti dalla mescolanza, ad una situazione in cui circa il 90-95% delle cellule è virtualmente immobile, mentre il restante 5-10% è apparentemente «sordo» al fattore s.l. che in qualche modo induce il rallentamento (fig. 11.B-C). Tra i 40 e gli 80 minuti dall'inizio della fase preconiugativa, si assiste ad un progressivo intensificarsi delle interazioni cellulari dirette, che porta alla individuazione di una

sorta di «nuvola» subsferica, (fig. 11.C-C1), formata dalle cellule tra cui avvengono, in successione stereotipata, le successive fasi delle interazioni cellulari, che hanno il compito di regolare e sincronizzare il procedere delle reazioni biologiche necessarie alla formazione della coppia. Ad un incontro casuale (fig. 9.D1) fa seguito lo scivolamento di un partner sull'altro, in posizione circa ortogonale al di sopra del substrato (fig. 11.D2-3), ed il successivo abbandono del substrato da parte di entrambe (fig. 11.D4-5-6). Durante questa fase di nuoto coordinato, si ha l'inizio del contatto tra le superfici ventrali dei due partners, nelle loro porzioni anteriori (fig. 11.D7), seguito dal progressivo ampliarsi dell'area di sovrapposizione e dal contemporaneo riorientamento degli assi longitudinali dei partners (fig. 11.D8-9), che finiranno per essere poi paralleli nella coppia ben formata (fig. 11.D10).

In un confronto molto generale tra l'etogramma di *L. lamella* e quelli dei due Ipotrichi,

chi, possiamo avanzare tentativamente una prima conclusione, che tuttavia necessita di più estese ed approfondite indagini su un numero più ampio di specie scelte *ad hoc*, per poter assumere quel rilievo che sarebbe auspicabile: *L. lamella*, un ciliato ritenuto tra le forme più primitive tra i Ciliati, sembra muoversi con moduli motori complessivamente definibili come molto più blandi (basse velocità, interruzioni del movimento non frequenti e di molti tipi, molto poco stereotipate e mai repentine e drammatiche) di quelli impiegati dai più specializzati *O. bifaria* ed *E. crassus* (molto veloci, sempre in moto lungo traiettorie discontinue, frequentemente interrotte da correzioni di rotta molto stereotipate).

Comportamento e biologia adattativa

Diverse considerazioni hanno concordato nel suggerire che i due finora — ritenuti — simili ipotrichi potrebbero essere in

∅ dei granuli		Oxytricha bifaria		Euplotes crassus	
					
500-200 µm	1 sabbia galleggiante sul menisco				
	2 menisco libero				
	3 substrato libero				
	4 sabbia				
200-100 µm	1 sabbia galleggiante sul menisco				
	2 menisco libero				
	3 substrato libero				
	4 sabbia				
100-50 µm	1 sabbia galleggiante sul menisco				
	2 menisco libero				
	3 substrato libero				
	4 sabbia				
<50 µm	1 sabbia galleggiante sul menisco				
	2 menisco libero				
	3 substrato libero				
	4 sabbia				

* negli spazi fra i granuli

fig. 13 - Diagramma che riporta i risultati dell'esperimento in cui un substrato liscio ed uno sabbioso erano offerti ad *Oxytricha bifaria* ed *Euplotes crassus*: i dati sono riportati in forma semischematiche per facilitarne la lettura. Mentre *O. bifaria* tende a disporsi sul substrato libero, *E. crassus* si distribuisce immancabilmente su quello sabbioso. Altre considerazioni nel testo.

realtà ben diversi tra loro, quanto a strategie di vita: (a) la morfologia della coppia di *E. crassus*, molto vantaggiosa dal punto di vista dello scambio dei pronuclei, sembra invece molto poco efficiente quando la si consideri nel suo movimento sul substrato, visto che uno dei due partners ha i propri organuli motori rivolti verso il mezzo acquoso, cioè, dalla parte opposta al substrato; (b) in fase preconiugativa, *O. bifaria* usa una mating arena subcircolare per facilitare la danza bidimensionale tra i partners potenziali, mentre *E. crassus* si serve di un volume subsferico, in cui la danza tra futuri partners è invece non dipendente da un substrato; (c) se disturbati durante le interazioni cellulari preconiugative, i due partners di *O. bifaria* mostrano quella reazione di esplorazione che, mai osservata in *E. crassus*, necessita di una superficie piana ed abbastanza regolare per poter aver luogo proficuamente e portare al reincontro delle due cellule separatesi a seguito di un violento stimolo esterno.

Sulla base di queste tre osservazioni, si è pensato che le due specie studiate differiscano non, come si è ritenuto finora, solo e/o principalmente per l'ambiente in cui vivono, essendo dulciaquicola *O. bifaria* e maricolo *E. crassus*, ma anche e soprattutto per le relative strategie adattative, che sarebbero di substrato bidimensionale e regolare (foglie e steli sommersi) per *O. bifaria* e di substrato invece tridimensionale (sabbia) per *E. crassus*.

Per sostanziare tale ipotesi è stata effettuata una serie di esperimenti, in cui si è fatto uso di piastre a pozzetti circolari, per metà pieni di sabbia (una diversa granulometria per ogni pozzetto), come mostrato in fig. 12; in tal modo diverse popolazioni delle due specie, ciascuna di circa 200 organismi singoli o di 200 coppie, sono state messe in condizione di «scegliere» tra sabbia e substrato piano, distribuendosi liberamente nelle diverse zone. Questi risultati (fig. 13) ci hanno permesso di considerare acquisiti i seguenti punti principali: (a) *O. bifaria* preferisce sempre il substrato libero e si muove su substrato sabbioso solo se i granuli sono inferiori a 50 μm , mentre lo evita accuratamente quando la sua granulometria è compresa tra i 50 ed i 100 μm ; (b) *E. crassus* mostra una inequivocabile preferenza per il

substrato sabbioso, ogniqualvolta la sua granulometria consenta una scelta effettiva: granuli troppo piccoli, inferiori cioè ai 50 μm , o troppo grossi, maggiori di 1000 μm , non sono infatti percepiti come diversi da un substrato bidimensionale, seppure comunque ad esso preferiti. L'ipotesi avanzata sulla base delle osservazioni comportamentali sembra dunque dimostrata.

Conclusioni

Sulla base del complesso di dati qui riportati in riferimento agli etogrammi dei Protozoi Ciliati finora tracciati e dei risultati sperimentali ottenuti riguardo al tipo di substrato di volta in volta preferito dai due Ipotrichi studiati, possiamo concludere che l'etogramma, per quanto perfezionabile ed integrabile con un più ampio numero di parametri, non solo è tecnicamente possibile, ma anzi rappresenta una sorta di strumento privilegiato sia per lo studio della motilità in sé, sia per l'analisi comparativa interspecifica, sia infine, e soprattutto, per l'approfondimento della conoscenza delle possibili strategie adattative delle diverse specie, aspetto questo di interesse assolutamente centrale nell'ambito della moderna biologia dei Protozoi.

BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE

- BALBIANI E.G. (1882) - *Phénomènes sexuels des Infusoi-res* J. de Micrographie, VI, 161.
 BUTSCHLI O. (1876) - *Studien über die ersten Entwicklungsvorgänge der Einzelle die Zellteilung under der konjugation der Infusorien*. Abhl. Senckenb. Naturforsch. Ges., 10, 1-50.
 CARLSON F.D. (1962) - *A theory of the survival value of motility*; in *Spermatozoan motility*, Bishop D.W. ed., pagg. 137-146; Am. Associat. Adv. Sci., Washington D.C.
 CORLISS J.O. (1979) - *The Ciliated Protozoa*. Pergamon Press, Oxford, 455 pagine.
 EIBL-EIBESFELDT I. (1967) - *Grundriss der vergleichenden Verhaltensforschung*. Ethologie. R. Piper & Co. Verl. Munchen, 536 pagine.
 JENNINGS H.S. (1906) - *Behaviour of the lower organisms*, Indiana University Press. Bloomington, Second Edition, 1976, 366 pagine.
 MAUPAS E. (1889) - *La rejeunissement karyogamique chez les Cilies*, Arch. Zool. Exp. Gen. 7, 149-517.
 NANNEY D.L. (1980) - *Experimental Ciliatology*, J. Wiley & Sons, New York, 304 pagine.
 RICCI N. (1981) - *The ethogram of Oxytricha bifaria Stokes (Ciliata, Hypotrichida)*. I. The motile behaviour.; Acta Protozool., 20, 393-410.

RICCI N. (1982) - *The ethogram of Oxytricha bifaria Stokes (Ciliata, Hypotrichida)*. II. The mating behaviour.; *Acta Protozool.*, 21, 13-23.

RICCI N., GIUNTOLI E. and VERNI F. - *The ethogram of Litonotus lamella (Ciliata, Kinetofagminophora)*. In preparazione.

RICCI N., GIANNETTI R. and MICELI C. - *The ethogram of Euplotes crassus (Ciliata, Hypotrichida)*. In preparazione.

VAN HOUTEN J. (1981) - *D.C.R. Hauser and Levandowsky*. In: *Biochemistry and Physiology of Protozoa*, vol. 4, pagg. 67-124.

VAN LEEUWENHOEK A. (1674) - *Letter to Oldenburg. Philosophical Transactions*, IX, 178.

L'Autore:

Nicola Ricci, Istituto Zoologia e Anatomia Comparata - Via A. Volta, 4 - Pisa.
