

## NOTES SOBRE EL DESENVOLUPAMENT EMBRIONARI DELS CARGOLS D'AIGUA DOLÇA *PHYSA ACUTA* I *P. FONTINALIS* (GASTERÒPODES, PULMONATS) \*

Joan-A. Vela i Fernández \*\*

Rebut: juliol 1979

### SUMMARY

**Notes on embryonic development of the freshwater snails *Physa acuta* and *P. fontinalis* (Gastropoda, Pulmonata)**

The development of two species of Physids (***Physa acuta*** and ***P. fontinalis***) is studied. On the whole they agree with the early description given by Wierzejski, though our study adds two points worth considering. Firstly, there is a clear asymmetry in the dorsal half of the trochophore as shown by the shell gland displacement to the right and further by the fact that cell  $ld^{22}$  is placed higher than  $lc^{22}$  in the dorsal region of the head vesicle. The possible mechanisms leading to both asymmetries are discussed. Secondly, the invaginating shell gland and radular sac are the RNA richest tissues in the trochophore. The possible relationships between cell differentiation pathway and this RNA endowment are discussed for both tissues. Finally, in the species studied, there is a clear relationship between the enteroblasts and the gut wall during the development of the hindgut. This result is clearly at variance with Wierzejski's description.

### INTRODUCCIÓ

El desenvolupament embrionari dels físids fou exhaustivament estudiat per WIERZEJSKI (1905) en un extens treball dedicat a *Physa fontinalis*. Tanmateix han estat publicats després alguns treballs, encara que més reduïts, tocant al desenvolupament d'altres espècies de *Physa*; concretament els de DE WITT (1954) sobre *P. gyrina* i els histoquímics (G-Nadi oxidasa) de MANCUSO (1954, 1955) sobre *P. ri-*

*vularis*. A més a més s'han publicat alguns estudis bioquímics (fosfatases) sobre el desenvolupament de *P. acuta* i *P. fontinalis* (D'ANCONA LUNET & MINGANTI, 1964; MINGANTI & MANCUSO, 1962, i MORRILL, 1965, 1973).

De totes les espècies suara esmentades, solament *Physa acuta* es troba a Catalunya (*Physa rivularis* és un sinònim de la varietat *subopaca* de *P. acuta*), car aquesta espècie predomina al sud d'Europa. *P. fontinalis* encara que estesa arreu d'Europa,

\* Aquest treball ha estat realitzat en part amb una beca d'intercanvi entre el CSIC i la Universitat d'Utrecht (1977).

\*\* Departament de Genètica. Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona. Gran Via de les Corts Catalanes, 585. Barcelona, 7.

és típica del nord i centre del continent, i *P. gyrina* és una espècie americana, malgrat que introduïda recentment a Anglaterra.

Al present treball ens proposem d'estudiar alguns aspectes del desenvolupament embrionari de *Physa acuta* i *P. fontinalis*, tot pensant en eixamplar el coneixement de l'embriologia dels físids.

## MATERIALS I METODOLOGIA

Per a la realització d'aquest treball s'han utilitzat embrions de *Physa acuta* var. *subopaca* i *P. fontinalis*. Els espècimens de la primera espècie procedien majoritàriament de l'estany de la Foixarda (Montjuïc, Barcelona), de Banyoles i del riu Fluvià (Esponellà i Òrfens) (totes tres localitats del Gironès), i els de la segona dels canals dels voltants d'Utrecht (Holanda). Els espècimens es mantingueren en aquaris amb aigua de l'aixeta i s'alimentaven amb enciam o bledes, o un menjar especial preparat amb diversos vegetals.

Les postes es colliren directament de l'aquari i hom n'eliminava el mucus fent-les rodolar sobre un paper de filtre humit fins a aconseguir la neteja total de les càpsules. (S'utilitza en aquest treball la terminologia de Bretschneider, en la qual *càpsula* vol dir el conjunt de l'embrió més l'album envoltats pel còrion, i massa d'ous—preferim anomenar-la posta— el conjunt de càpsules relligades pel moc). Un cop fet això, es descapsulaven amb l'ajut d'unes pinces de relloger i es continuava amb la tècnica histològica adient.

Les tècniques histològiques utilitzades han estat de dos tipus: a) impregnació «*in toto*» amb argent, i b) tècniques histològiques convencionals.

a) *Impregnació amb argent*: Aquesta tècnica, coneguda d'antic, ha estat millorada per tal d'aplicar-la als embrions de gasteròpodes per Verdonk. Es tracta d'una impregnació de les membranes cel·lulars amb compostos d'argent, la qual cosa permet una visió global de l'anatomia de l'embrió. Són, en realitat, dues tècniques una mica diferents segons siguin els embrions joves o més avançats.

a-1) *Tècnica per a embrions joves* (S'utilitza per als estadis de clivellament i tro-

còfora jove): Es posen els embrions un cop descapsulats en una solució de proteïnat d'argent al 0,2 % durant 2 min., després es passen a una barreja de glutaraldehid al 6 % i tampó cacodilat 0,2M, pH=7,4 (1:1), i es mantenen sota el llum ultravioleta durant unes 2 h. Un cop fet això, es passen els embrions per un pont d'alcohols de gradació creixent, s'aclareixen amb xilol i es munten en bàlsam de Canadà bo i deixant alhora els cobreobjectes un xic elevats mitjançant un marc de cartró.

a-2) *Tècnica per a embrions més avançats* (per a embrions més vells que la trocòfora jove): Es posen els embrions directament en nitrat d'argent al 0,7 % i s'il·luminen amb llum ultraviolada fins que s'obté el grau de tinció adient; es fixen després durant uns minuts amb àcid pícric saturat, es renten amb aigua i es continua com al procediment suara esmentat.

b) *Tècniques convencionals*: El problema principal a resoldre en aquest cas es poder identificar l'embrió a fi de no perdre'l en incloure'l en parafina. Per a solucionar-ho s'inclou primer l'embrió en agar al 2 %, s'orienta i un cop gelificat l'agar se'n talla un bloc petit que contingui l'embrió. Després es deshidrata el bloc d'agar amb un pont llarg d'alcohols de gradació creixent i s'aclareix amb metilbenzoat o amilacetat. Seguidament ja es pot fer la inclusió en parafina i continuar amb el procediment normal. (La fixació fou amb Bouin o Zenker i els talls foren fets a 4-5 µm.) Les tècniques emprades en aquest cas han estat la hematoxilina de Heidenhein-eosina (o eritrosina) i la de verd de metilpironina pels àcids nucleics.

## RESULTATS

El desenvolupament de *Physa*, com el dels altres basomatòfors, és directe; és a dir, quan es desclou l'ou neix un cargolet perfectament conformat bé que immadur. Tanmateix, dintre de la càpsula s'asseiïxen estadis de desenvolupament semblants als estadis larvaris dels gasteròpodes marins; així, doncs, es pot parlar en els basomatòfors de trocòfores i velígers, malgrat que aquestes no menen mai una vida lliure.

Resumint, el desenvolupament embrionari de *Physa acuta* i *P. fontinalis*, si fa o



no fa el mateix, té la següent seqüència de fases: des del començament del primer clivellament fins a les 20-25 h després (a temperatura ambient) té lloc el clivellament; al final d'aquest període sorgeix una gàstrula típicament aixafada que per això ha estat anomenada de vegades plàcula; al voltant de les 26 h de desenvolupament apareix la trocòfora jove, també dita estadi de vesícula cefàlica (MORRILL, 1973) per l'extraordinari desenvolupament assolit per aquest òrgan larvari; a les 48 h s'estableix la trocòfora definitiva, i s'arriba a les 72 h al velíger. A les 96 h s'assoleix l'estadi hipo (anomenat així pel seu aspecte d'hipopòtam pel que fa a la regió facial), que pot subdividir-se en dues subfases: hipo I, en la qual la closca no ha assolit la seva màxima expansió pel dament de la massa visceral i manquen encara els ulls, i hipo II, o fase d'hipo típica, assolida als voltants del cinquè dia de desenvolupament. Cap al setè dia s'assoleix l'estadi post-hipo en el qual el cargol és quasi una còpia exacta de l'adult; la desclosa es produeix cap al vuitè dia.

En aquest estudi farem referència primordialment a les fases de trocòfora, ja que és on tenen lloc els principals processos d'embriogènesi. Nogenysmenys, es faran algunes referències a estadis més avançats o àdhuc més joves del desenvolupament.

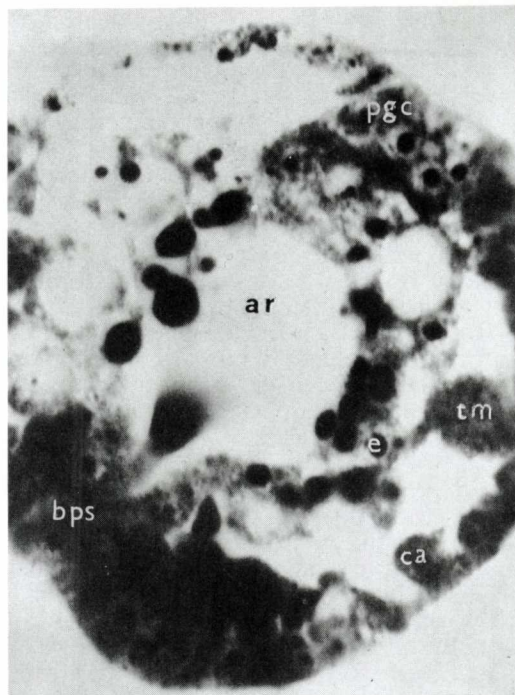


Fig. 1. Tall sagital d'una gàstrula (24 h) (*Physa acuta*) (hematoxilina de Heindenhein - eosina) (500 x).  
Sagittal cut of a gastrula (24 h) (*Physa acuta*) (Heidenhein's haematoxylin-eosin) (500 x)

#### CLAU DE SÍMBOLS DE LES FIGURES

ar = arquènteron  
b = boca  
bm = budell mitjà  
bp = budell posterior  
bps = blastoporus  
ca = cèl·lula anal  
cc = camp de la closca  
cl = closca larvària  
e = enteroblast  
es = estómac  
et = estomodeu + esòfag  
fl = fetge larvari  
gc = glàndula de la closca  
p = peu  
pa = placa apical  
pc = placa cefàlica  
pgc = primordi de la glàndula de la closca  
pp = primordi del peu  
psr = primordi del sac de la ràdula  
ptr = prototroca  
sr = sac de la ràdula  
tm = teloblast mesodèrmic  
vc = vesícula cefàlica

#### SYMBOL KEY FOR THE FIGURES

ar = archenteron  
b = mouth  
bm = hindgut  
bp = midgut  
bps = blastopore  
ca = anal cell  
cc = shell field  
cl = larval shell  
e = enteroblast  
es = stomach  
et = stomodaeum + oesophagus  
fl = larval liver  
gc = shell gland  
p = foot  
pa = apical plate  
pc = cephalic plate  
pgc = shell gland enlage  
pp = foot anlage  
psr = radular sac anlage  
ptr = prototrocha  
sr = radular sac  
tm = mesodermal teloblast  
vc = head vesicle

a) *Prototroca*: Les preparacions *in toto* demostren que, tal com va descriure WIERZEJSKI (1905), la prototroca a *Physa* és formada per una sola renglera de cèl·lules a la seva part ventral i dos rengleres a la part lateral. Hem pogut confirmar a més, l'observació de Wierzejski quant al fet que apareix una cèl·lula ventromedial a la prototroca, possiblement derivada del braç ventral de la creu, atesa la seva posició relativa respecte a les cèl·lules de la placa apical, netament derivades d'aquella.

D'altra banda, les tincions amb verd de metil-pironina demostren que el citoplasma de les cèl·lules de la prototroca està quasi mancat d'ARN, i que aquest roman concentrat al nuclèol.

b) *Regió pre-trocal*: La regió pre-trocal de la trocòfora dels basomatòfors consta d'una vesícula cefàlica formada per grosses cèl·lules aixafades (de vegades 12 o de vegades 13, ja que la cèl·lula  $ld^{22}$  pot dividir-se un cop més) en posició supero-dorsal; dues regions laterals de petites cèl·lules, dites plaques cefàliques, i una zona central, formada per set cèl·lules grosses i planes, anomenada placa apical.

Morfològicament, aquesta regió de la trocòfora de *Physa* no es diferencia gaire de la d'altres basomatòfors (p.e. *Lymnaea*). Tanmateix s'ha pogut observar que la cèl·lula  $ld^{22}$  (a la dreta de la porció dorsal de la vesícula cefàlica, perquè el clivellament a *Physa* és levògir) roman sempre un xic més amunt que la seva homòloga  $lc^{22}$ , cosa que dóna una clara asimetria a aquesta regió dorsal del cap.

Quant a les tincions histoquímiques, les cèl·lules de la regió pre-trocal es caracteritzen per una gran pobresa d'ARN al seu citoplasma.

c) *Glàndula de la closca*: La glàndula de la closca és l'òrgan larvari més característic de la regió post-trocal dorsal. El seu desenvolupament a *Physa* és molt semblant al d'altres basomatòfors (p.e. *Lymnaea*): aproximadament a les 40 h de desenvolupament comença a invaginar-se la regió posttrocal dorsal subjacent a la vesícula cefàlica. Prèviament, aquesta regió posttrocal s'havia eixamplat per allargament vertical de les seves cèl·lules. Tanmateix, a les trocòfores anteriors a aquest moment no es pot observar cap senyal externa de la futura glàndula de la closca.

Aquesta invaginació continua endinsant-

se i assoleix la seva fondària màxima al final del tercer dia de desenvolupament (fase de trocòfora definitiva), moment on comença la secreció del primer material extracel·lular de la closca. Aquesta invaginació es fa, en part, per processos de desplaçament cel·lular i en part per proliferació cel·lular, com ho demostra la presència de figures mitòtiques en ella.

Després d'aquesta fase, la invaginació comença a evertir-se i, en créixer, tendeix a colgar la totalitat de la massa visceral, cosa que assoleix a la fase d'hipo II. Al mateix temps es forma a les vores de la glàndula de la closca el solc periostràtic del qual es formarà la closca definitiva del cargol; alhora, a la zona central del camp de la closca les cèl·lules s'aplanen extraordinàriament.

Cal remarcar dues característiques interessants de la glàndula de la closca: en primer lloc, tal com es veu a les preparacions *in toto*, aquest òrgan larvari posicionat d'antuvi centralment, es desplaça de mica en mica cap a la dreta i assoleix el seu màxim desplaçament a la trocòfora tardana. En segons lloc, hi ha una contacte estret entre la invaginació de la glàndula de la closca i el budell mitjà de cèl·lules petites. Aquest contacte comença àdhuc a la gàstrula i assenyala el punt on apareixerà la futura glàndula de la closca. Tanmateix, aquesta connexió entre el budell mitjà i el camp de la closca roman fins a molt tard en el desenvolupament (hipo).

D'altra banda, les tincions histoquímiques mostren que la glàndula de la closca és de bell antuvi i fins a la trocòfora tardana rica en ARN; aquest es troba concentrat a la part basal de les cèl·lules, precisament a la zona de contacte amb el budell mitjà.

d) *Tub digestiu*: Quant a l'aparell digestiu de la trocòfora, cal destacar les següents estructures:

d-1) *Sac de la ràdula*: Confirmant les observacions de WIERZEJSKI (1905) hem pogut veure com el sac de la ràdula apareix independentment de l'estomodeu, per sota d'ell i formant dues invaginacions no gaire fones que després es fusionen en una de sola. Aquestes invaginacions s'enfonsen talment com la glàndula de la closca mitjançant migració i proliferació cel·lulars, car s'hi poden observar nombroses figures mi-



tòtiques. Quant al contingut d'ARN, les tincions amb verd de metil-pironina demostren que tan el primordi del sac de la ràdula com el parell d'invaginacions que en desenvolupa després, són rics en ARN arreu del seu citoplasma.

d-2) *Budell posterior*: Segons les nostres observacions, el budell posterior a *Physa* segueix en el seu desenvolupament una pauta semblant a la de la resta de basomatòfors. És a dir, contràriament al que suposava WIERZEJSKI (1905), els enteroblasts romanen inclosos a l'endoderm i des d'allà proliferen fins a connectar amb una prominent cèl·lula anal lleugerament esqueixada de l'ectoderm. La resta del desenvolupament del budell posterior és la pròpia dels altres basomatòfors. D'altra banda, el budell posterior, talment com el budell mitjà, és sempre relativament ric en ARN; les cèl·lules anals d'antuvi són pobres en aquest àcid nucleic, però s'enriqueixen lleugerament després.

e) *Protonefridis*: La trocòfora de *Physa* té, com la resta dels basomatòfors, un parell de protonefridis que constitueixen el seu sistema excretor. Aquestes cèl·lules realment gegantines són situades una a

cada banda de l'embrió i subjacents a la prototroca. Quant a l'ARN, són sempre pobres en aquest àcid nucleic, llevat del seu nuclèol que dóna una reacció netament positiva a la pironina.

f) *Cèl·lules nucals*: Són un grapat de cèl·lules de mida grossa localitzades al «clatell» de l'embrió, entre l'ectoderm i l'endoderm. Apareixen d'hora a la fase de trocòfora, i assoleixen però la seva mida més grossa a l'estadi d'hipo. Les tincions amb verd de metil-pironina assenyalen la riquesa d'ARN del seu citoplasma.

## DISCUSSIÓ

Ultra la confirmació de la majoria de les observacions de WIERZEJSKI (1905), els trets principals a remarcar dels nostres resultats són els següents.

En primer lloc, cal destacar la marcada assimetria de la regió dorsal de la trocòfora; puix que ultra el desplaçament cap a la dreta de la glàndula de la closca, les preparacions amb argent demostren que la cèl·lula  $1d^{22}$  roman d'antuvi més amunt que la  $1c^{22}$ . L'aparició d'una assimetria al desenvolupament dels gasteròpodes es co-

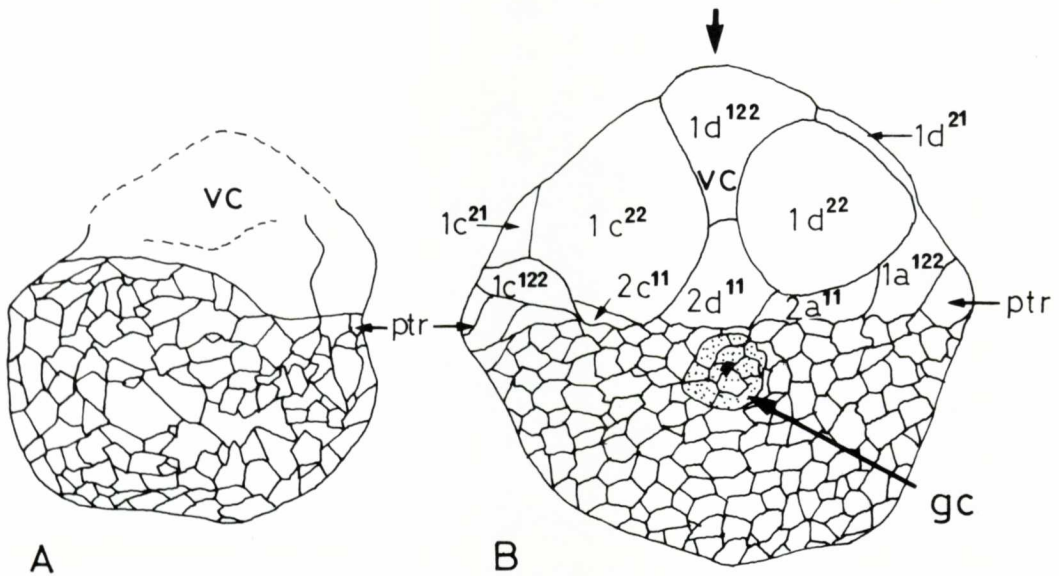


FIG. 2. A) Vista paradoral d'una trocòfora jove (36 h) B) Vista dorsal d'una trocòfora jove tardana (48,30 h) (*Physa fontinalis*) (200 x) (La fletxa curta assenjala el meridià de la boca).  
A) Paradoral view of a young trocophore (36 h). B) Dorsal view of a late young trocophore (48.30 h) (*Physa fontinalis*) (200 x) (Short arrow shows the mouth meridian).

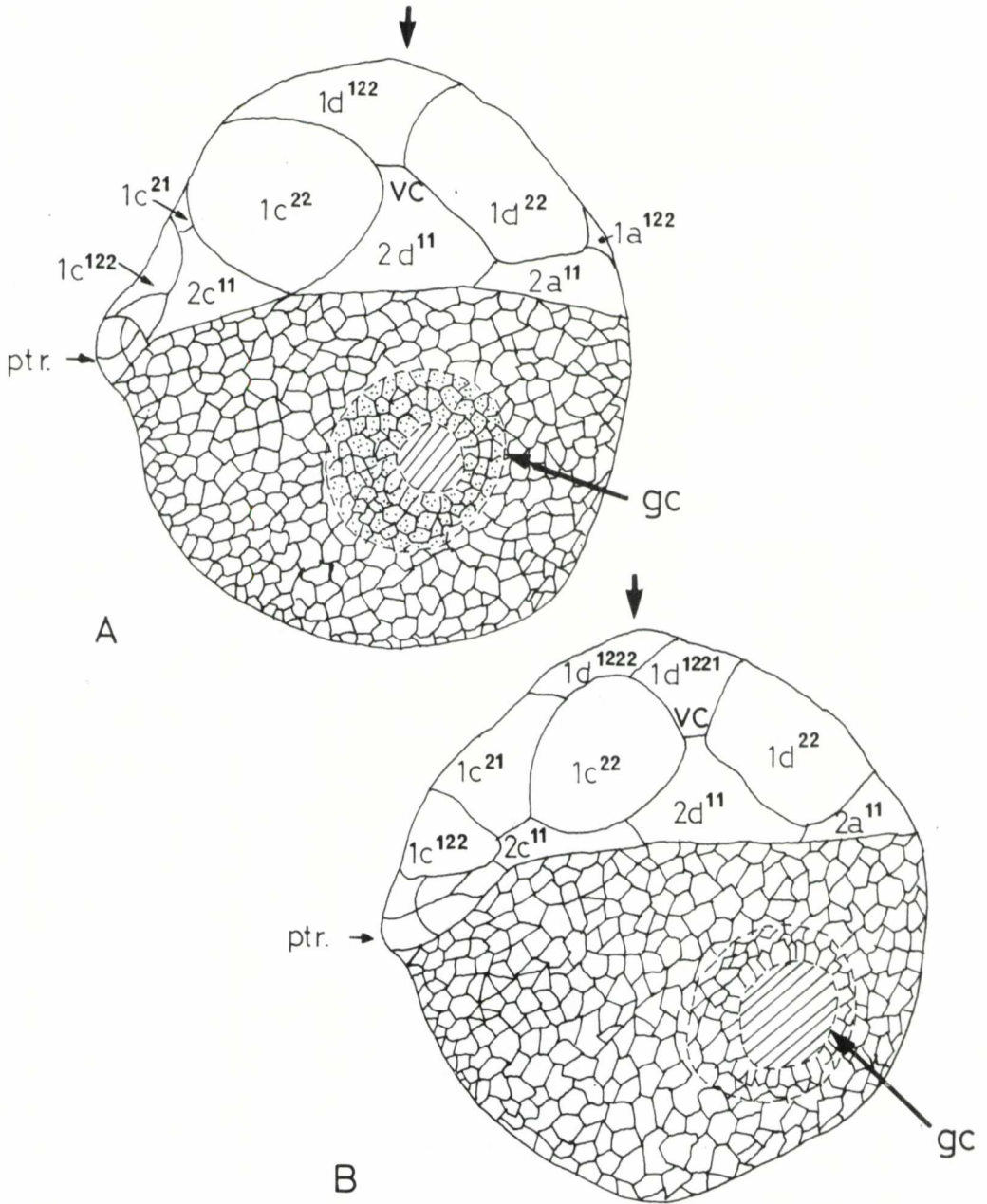


FIG. 3. A) Vista parodorsal d'una trocòfora definitiva (56,30 h). B) Id. (60 h) (*Physa fontinalis*) (200 x) (La fletxa curta assenyala el meridià de la boca).  
 A) Parodorsal view of a definitive trochophore (56.30 h). B) The same (60 h) (*Physa fontinalis*) (200 x) (Short arrow shows the mouth meridian).

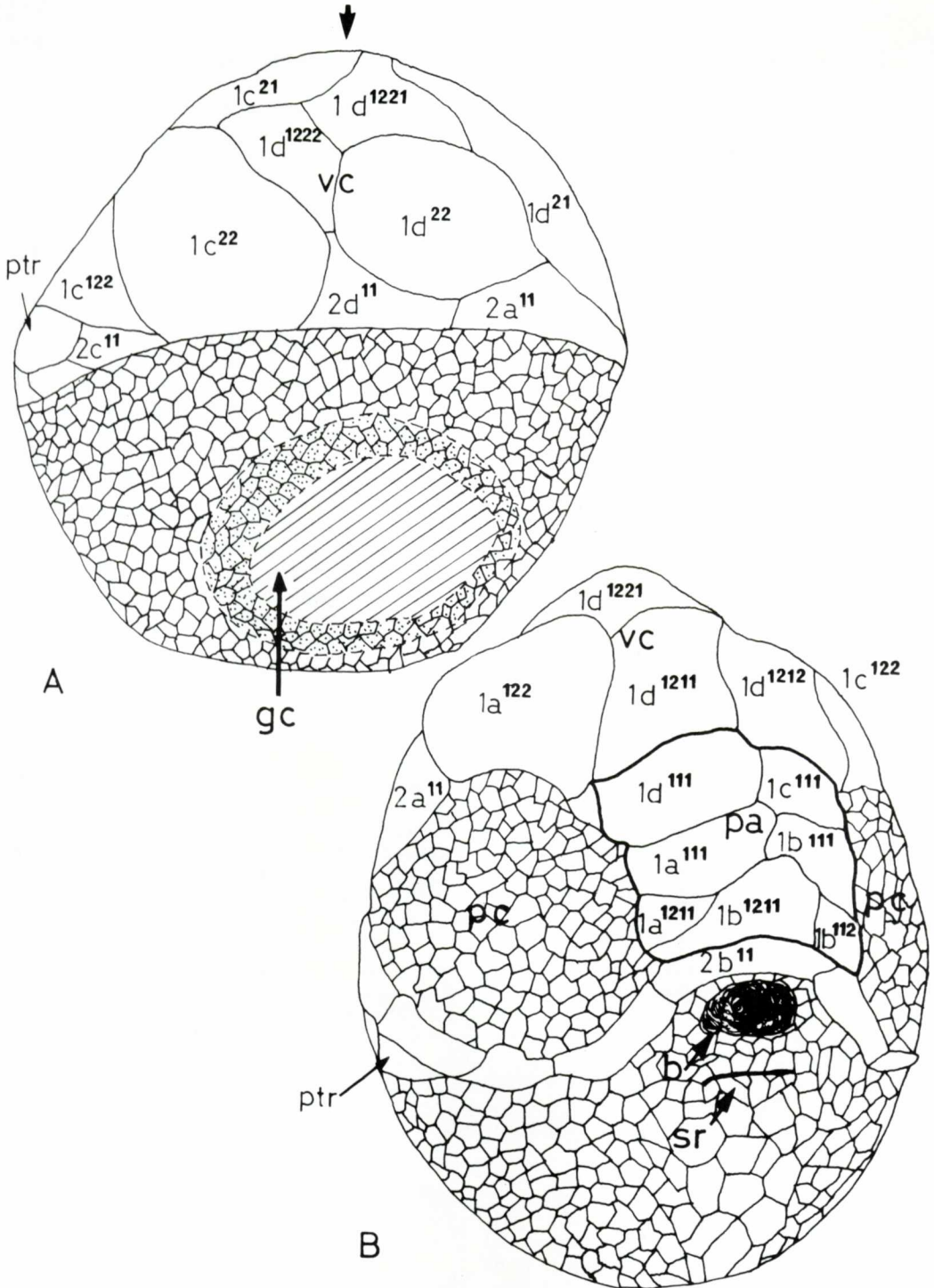


FIG. 4. A) Vista paradorsal d'una trocòfora definitiva tardana (64 h). B) Vista paraventral del mateix estadi (*Physa fontinalis*) (200 x) (La fletxa curta assenyalava el meridi de la boca).  
 A) Paradorsal view of a late definitive trochophore (64 h). B) Paraventral view of the same stage. (*Physa fontinalis*) (200 x) (Short arrow shows the mouth meridian).



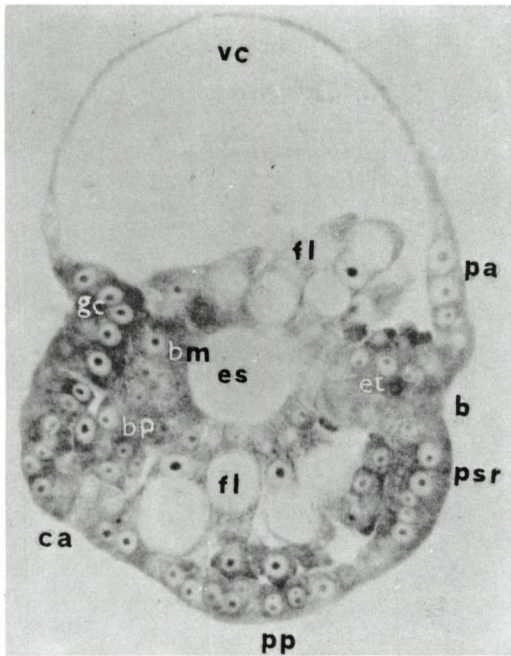


FIG. 5. Tall sagittal d'una trocòfora jove tardana (48 h) (*Physa acuta*) (Verd de metil-pironina) (100 x).  
Sagittal cut of a late young trochophore (48 h) (*Physa acuta*) (Methyl green-pyronin) (100 x).

neix de bell antuvi i s'interpreta com la causa de la flexió ventral, pas previ a la torsió de la massa visceral. Cal remarcar que a la major part dels gasteròpodes la glàndula de la closca es desplaça cap a l'esquerra perquè es tracta d'espècies dextrogires; així, doncs, el desplaçament cap a la dreta observat a *Physa* concorda amb el caràcter levògir de la closca d'aquest gènere.

Un problema que apareix un cop vist això és poder explicar com es genera aquesta assimetria. En el cas de la glàndula de la closca podria ésser degut a una proliferació assimètrica de les cèl·lules de l'ectoderm situades a la regió on ha d'aparèixer la futura obertura de la cavitat pal·liar, cosa que en definitiva faria moure la glàndula de la closca vers el cantó contrari i deixaria determinada aquesta proliferació assimètrica per la posició del quadrant C (Verdonk, comunicació personal).

Tanmateix, l'assimetria de la regió dorsal de la trocòfora arriba també a la vesícula cefàlica tal com hem vist suara. En aquest cas, però, la gènesi d'aquesta assimetria ha d'ésser una mica diferent de l'anterior, perquè les cèl·lules de la vesícula cefàlica no proliferen i cal pensar que la posició assolida per elles és deguda a processos diferents del que provoca el desplaçament de la glàndula de la closca. Una possibilitat fora un creixement assimètric dels blastòmers  $2c^{11}$  i  $2a^{11}$ , i la formació d'una falca centrípeta pel darrer que desplaçaria cap amunt el blastòmer  $ld^{22}$ . L'observació de les preparacions *in toto* indica que aquesta és l'explicació més adient, puix que fins i tot la cèl·lula  $2a^{11}$  sencera es desplaça assimètricament cap al centre.

Així, doncs, el problema de la gènesi d'aquesta assimetria dorsal de la vesícula cefàlica se'ns planteja ara en termes de les forces que afaïonen la creu dels mol·luscs en diferenciar-se aquesta cap a les estructures de la regió pretrocal; doncs els blastòmers  $2a^{11}$ ,  $2c^{11}$  i  $2d^{11}$  deriven dels extrems de tres dels quatre braços de la creu, essent els  $lc^{22}$  i  $ld^{22}$  blastòmers interbraquials (WIERZEJSKI, 1905). Tanmateix sembla suggestiva la possibilitat d'una coordinació de la gènesi d'aquestes dues assimetries, és a dir la de la vesícula cefàlica i la de la glàndula de la closca.

Quant a la determinació de la glàndula de la closca, RAVEN (1952, 1966) i HESS (1956a-b, 1962) van suggerir que als gasteròpodes era induïda pel budell mitjà de petites cèl·lules, en establir contacte aquest amb l'ectoderm dorsal. Les dades presentades en aquest treball no ens permeten de confirmar ni de refusar aquesta hipòtesi; malgrat que, com s'ha vist als resultats, aquest contacte té lloc també a *Physa* i àdhuc apareix molt més d'hora que a *Lymnaea* (TIMMERMANS, 1969), perquè ja es dona a la gàstrula.

Un altre aspecte remarcable dels nostres resultats és la constatació que el budell posterior de *Physa* es forma com a la resta dels gasteròpodes. Pot ésser que l'observació contrària de WIERZEJSKI (1905) s'expliqui si pensem que l'espai entre l'ectoderm i l'enteroblast és relativament ample i que el darrer prolifera molt laxament.

Per acabar, és remarcable que, com demostren les preparacions amb verd de metil-pironina, els òrgans larvaris més rics en ARN són la glàndula de la closca i el sac de la ràdula. Ambdós òrgans presenten



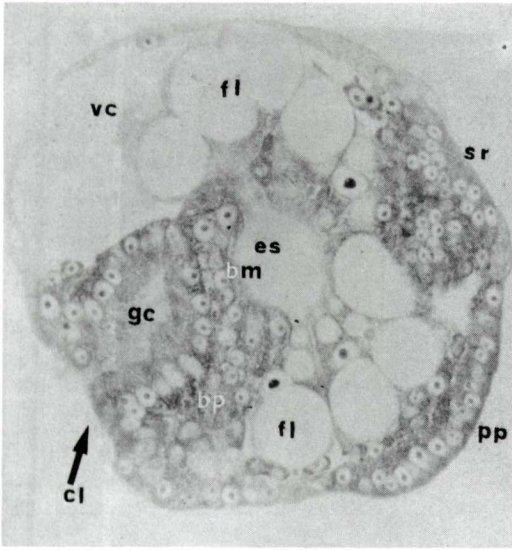


FIG. 6. Tall parasagittal d'una trocòfora definitiva (60 h) (*Physa acuta*) (Verd de metil pironina) (100 x).  
Parasagittal cut of a definitive trochophore (60 h) (*Physa acuta*) (Methyl green-pyronin) (100 x).

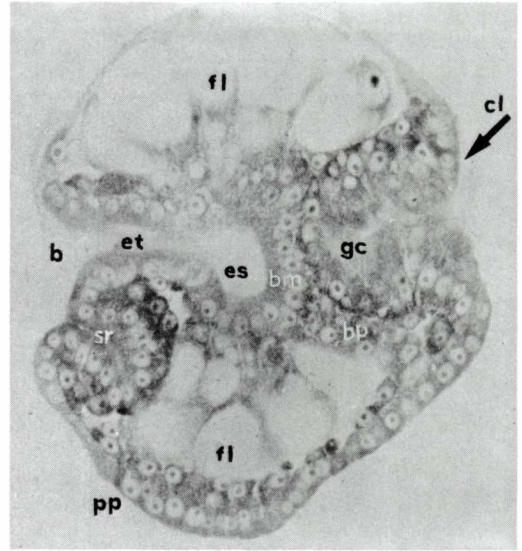


FIG. 7. Tall sagittal d'una trocòfora definitiva tardana (65 h) (*Physa acuta*) (Verd de metil-pironina) (100 x).  
Sagittal cut of a late definitive trochophore (65 h) (*Physa acuta*) (Methyl green-pyronin) (100 x).

una morfogènesi semblant i ambdós segregaran més endavant material extracel·lular (closca embrionària i dents radulars, respectivament). Quant a la glàndula de la closca, KNIPRATH (1977) ha demostrat a *Lymnaea* que en fases de desenvolupament semblants a les estudiades per nosaltres (trocòfora), les cèl·lules de la glàndula de la closca tenen el seu citoplasma farcit de ribosomes. És, doncs, raonable de suposar que la forta reacció a la pironina és deguda a aquests ribosomes que, d'altra banda, representarien una fase de diferenciació cel·lular prèvia a la fase final definitiva, la qual es caracteritza entre altres coses —i simplificant— per un gran desenvolupament del reticle endoplasmàtic. Com que el sac de la ràdula presenta un comportament morfogenètic semblant però manca encara un estudi ultraestructural d'ell, cal pensar que també deu d'ésser ric en ribosomes i que el seu model de diferenciació cel·lular és paral·lel al de la glàndula de la closca.

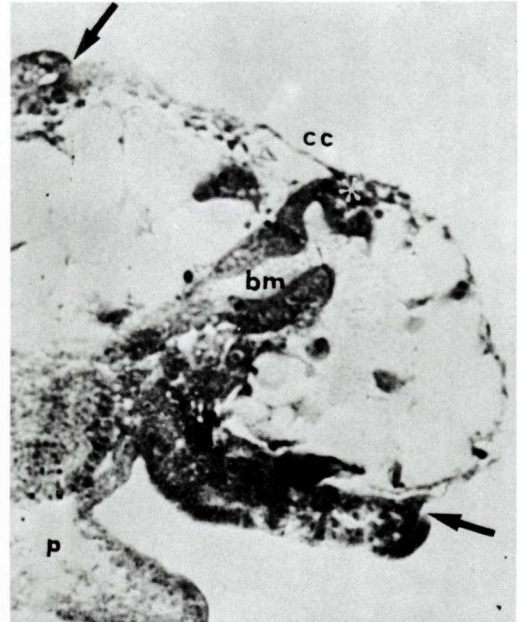


FIG. 8. Tall sagittal d'un hipo I (*Physa acuta*) (hematoxilina de Heidenheim-eosina) (200 x) (Les fletxes assenyalen les vores de la closca i l'asterisc el contacte entre el budell mitjà i el camp de la closca).  
Sagittal cut of an Hippo I (*Physa acuta*) (Heidenheim's haematoxylin-eosin) (200 x) (Arrows show the shell edges and asterisc shows the contact between hindgut and shell field).

## BIBLIOGRAFIA

- D'ANCONA LUNETTA, G. & MINGANTI, A. 1964. Phosphatase activities in *Physa* eggs and embryos. *Acta Embryol. Morphol. Exp.*, 7: 249-257.
- DE WITT, R. M. 1954. Reproduction, embryonic development, and growth in the pond snail, *Physa gyrina* Say. *Trans. Am. microscop. Soc.*, 73: 124-137.
- HESS, O. 1956a. Die Entwicklung von Halbkeimen bei dem Süßwasser-Prosobranchier *Bithynia tentaculata* L. *Wilhelm Roux Arch. EntwMeck. Org.*, 148: 336-361.
- HESS, O. 1956b. Die Entwicklung von Exogastrulakeimen bei dem Süßwasser-Prosobranchier *Bithynia tentaculata* L. *Wilhelm Roux Arch. EntwMeck. Org.*, 148: 474-488.
- HESS, O. 1962. Entwicklungsphysiologie der Mollusken. *Fortschr. Zool.*, 14: 130-163.
- KNIPRATH, E. 1977. Zur Ontogenese des Schalenfeldes von *Lymnaea stagnalis*. *Wilhelm Roux's Arch.*, 181: 11-30.
- MANCUSO, V. 1954. La G-nadi ossidasi nell'uovo di *Physa rivularis*. *Ph. Ric. Scient.*, 24: 1886.
- MANCUSO, V. 1955. Sostanze Nadi positive nello sviluppo di *Physa rivularis* Ph. *Ric. Scient.*, 25: 2843.
- MINGANTI, A. & MANCUSO, R. 1962. Tyrosinase activity in embryos of *Physa fontanalis*. *Acta Embryol. Morphol. Exp.*, 5: 199-205.
- MORRILL, A. 1965. Acid and alkaline phosphatase activity in the embryo of the pulmonate snail *Physa acuta*. *Am. zoologist.*, 5: 198-199.
- MORRILL, A. 1973. Biochemical and electrophoretic analysis of acid and alkaline phosphatase activity in the developing embryos of *Physa fontanalis* (Gast. Pul.). *Acta Embryol. Morphol. Exp.*, 61-82.
- RAVEN, C. P. 1952. Morphogenesis in *Lymnaea stagnalis* and its disturbance by lithium. *J. Exp. Zool.*, 121: 1-78.
- RAVEN, C. P. 1966. *Morphogenesis: the analysis of mollusca development*. 2n. ed. Pergamon. London.
- TIMMERMANS, L. P. M. 1969. Studies on shell formation in molluscs. *Netherl. J. Zool.*, 19: 417-523.
- WIERZEJSKI, A. 1905. Embryologie von *Physa fontanalis* L. *Zeitschr. Wissensch. Zool.*, 83: 502-706.