

Evoluzione e destino delle cellule testali  
nell'uovo di Ascidie  
(Ricerche con i coloranti vitali) (\*)

INTRODUZIONE

L'uovo delle Ascidie a termine del suo sviluppo è circondato da due involucri cellulari: quello delle cellule follicolari e quello delle cellule testali. Le cellule follicolari si dipartono dal chorion, sono fortemente vacuolate ed espletano sicuramente funzioni galleggianti; le cellule testali sono comprese tra il chorion e l'uovo, sono anch'esse provviste di vacuoli, e non si sa bene quali funzioni esplicino: furono denominate in tal modo perché si ritenne che contribuissero alla formazione del « test », o tunica, dell'Ascidia.

Le cellule testali hanno costituito l'oggetto di studio di moltissimi Autori (KUPFER, 1870; METSCHNIKOFF, 1872; DAVYDOFF, 1889; FLÖDERUS, 1896; FOL, 1883 ecc.). Nonostante ciò di esse si conosce molto poco: della loro morfologia nei diversi periodi dello sviluppo; della loro ultrastruttura; della costituzione chimica dei loro inclusi; del loro metabolismo; della loro origine; delle loro funzioni; del loro destino. Manca di esse, anche, uno studio comparativo nelle diverse specie di Ascidie.

a) La loro *morfologia*, nell'uovo distaccato dall'ovario e pronto per essere fecondato, è stata descritta da diversi Autori (MORGAN, 1891; CONKLIN, 1905).

Le cellule sono piccole, separate le une dalle altre, applicate sul cortex dell'uovo; posseggono un nucleo, degli inclusi granulari e sono vacuolate. È possibile che i contenuti cellulari subiscano delle modificazioni lungo lo sviluppo dell'uovo, ma, in ogni modo, di ciò non conosciamo nulla.

KNABEN (1936) e BRIEN (1938) hanno mostrato che le cellule, durante lo sviluppo dell'uovo, non subiscono cambiamenti strutturali, ma solo di volume; esse aumentano di grandezza poche ore dopo la fecondazione, e durante la embrioge-

(\*) Memoria presentata dall'Accademico PASQUALE PASQUINI.

nesi si atrofizzano progressivamente; rimangono in parte nella capsula follicolare dopo la fuoriuscita della larva.

GEESCH e RIES (1937), usando la tecnica dei coloranti vitali, hanno visto che le cellule testali assumono un diverso tono di colore con il variare della durata e della intensità della colorazione.

La loro ultrastruttura è stata indagata solo recentemente (REVERBERI e MANCUSO, 1960), e neppure di proposito: al microscopio elettronico questi AA. hanno dimostrato che le cellule testali hanno, oltre i costituenti ora descritti, un limitatissimo reticolo endoplasmatico e alcuni pochi mitocondri; il nucleo appare in degenerazione, il contenuto citoplasmatico è fortemente vacuolato.

b) Sulla *costituzione chimica* dei loro inclusi citoplasmatici abbiamo limitatissime conoscenze. L'indagine è stata compiuta in base a reazioni citochimiche specifiche, a colorazioni con coloranti vitali (GEESCH e RIES, 1937) e ai raggi ultravioletti.

COWDEN e MARKEET (1961), usando metodi citochimici, hanno visto che le cellule testali dell'uovo di *Ascidia nigra* presentano pochi inclusi granulari, di natura proteica.

Recentemente DE VINCENTIS (1961) ha visto che alla luce di WOOD le cellule testali dell'uovo di *Phallusia mamillata* e di *Ciona intestinalis* emettono una fluorescenza giallo-arancio. Analizzando la luce di fluorescenza con il metodo dell'istospettrografia quantitativa, e confrontando i caratteri dello spettro di fluorescenza con le proprietà istochimiche delle cellule testali, DE VINCENTIS è giunto alla conclusione che all'interno delle cellule si trovano eterogenei complessi lipidici responsabili della fluorescenza giallo-arancio.

Da quanto riferito appare che la natura di alcuni inclusi è di carattere lipidico: ciò può guidare a fare supposizioni fondate circa la loro funzione.

c) Assai disputata è la questione della loro *origine*. Sostanzialmente le teorie che si riferiscono ad essa sono due: l'una sostiene che esse derivino, insieme con le cellule follicolari, dall'epitelio germinativo; l'altra, invece, sostiene che derivino da elementi mesenchimatici migranti.

La prima teoria è stata sostenuta da diversi Autori, ed è accettata senza esitazione dal RAVEN (1961) nella sua recente monografia « Oogenesis », e nel grande trattato di Zoologia del GRASSÉ (1948).

Secondo il TUCKER (1942), che più recentemente ha sostenuto questa opinione, le cellule testali avrebbero origine da elementi cellulari dell'epitelio germinativo. Alcune cellule di questo epitelio si distaccherebbero e si porterebbero, prima alla superficie dell'ovocita, e poi all'interno; poi ritornerebbero definitivamente all'esterno dell'ovocita e costituirebbero le cellule testali definitive.

La seconda teoria è stata, ed è, sostenuta, anch'essa, da diversi Autori (SPEK, 1927; KNABEN, 1936; FÉLIZ, 1954).

Interessante è l'opinione di SPEK (1927). Secondo questo Autore le cellule testali hanno origine dalle cosiddette « Tropfenzellen ». Queste sono cellule mesenchimatiche che si rinvencono un po' ovunque nel corpo dell'animale adulto, soprattutto nel sangue, nei liquidi delle cavità del corpo, e negli stoloni; esse sono

dotate di attivi movimenti ameboidi e posseggono nel loro citoplasma delle goccioline che si colorano intensamente con alcuni coloranti vitali (rosso-neutro). Secondo SPEK queste goccioline danno reazione di MILLON positiva, e reazione xantoproteica: conterebbero cioè proteine, cui forse sono legati dei lipidi. La loro marcatura con i coloranti vitali permette di seguirle nelle loro migrazioni e nelle loro funzioni. Queste, secondo SPEK, sarebbero parecchie, tra cui quella di formare la tunica; possederebbero, inoltre, una spiccata affinità per gli ovociti nel loro periodo di accrescimento; infatti per movimento ameboidi si porterebbero alla loro periferia e sembra, anche, che vi penetrerebbero.

RIES (1937) ha confermato che le « Tropfenzellen » sono responsabili della formazione della tunica; secondo l'Autore le goccioline che esse posseggono sarebbero dei precursori della tunica.

Secondo KNABEN (1936) cellule mesodermiche migrerebbero dai tessuti dell'adulto per disporsi attorno all'ovocita in accrescimento, e quivi si moltiplicherebbero, forse per mitosi, dando origine alle cellule follicolari all'esterno, e alle cellule testali all'interno.

d) Per quanto riguarda la loro funzione sono state fatte le ipotesi più diverse.

Una ipotesi di notevole importanza è quella che attribuisce alle cellule testali una funzione nutritiva nei riguardi dell'ovocita in accrescimento. Secondo numerosi Autori (BRANCROFT, 1899; KONOPACKI, 1936) le cellule testali penetrerebbero per movimenti ameboidi nell'interno dell'uovo e vi verserebbero il loro contenuto; espletata questa funzione passerebbero alla periferia dell'uovo e in un tempo ulteriore verrebbero respinte tra il cortex e il chorion; da questo momento esse non avrebbero più alcuna funzione e andrebbero perdute al momento in cui la larva sguscia dalle membrane. Quale sorta di sostanze queste cellule verserebbero nel citoplasma dell'ovocita non è ben noto; secondo KONOPACKI si tratterebbe di nucleoproteidi che, dopo successiva degradazione, passerebbero nell'ovocita dove entrerebbero a far parte come lipoproteidi del vitello propriamente detto.

Un'altra funzione che è stata loro attribuita è quella della secrezione della tunica, da servire per la formazione della tunica. Questa teoria è stata sostenuta dal ZAVATTARI (1922) e recentemente anche dal RIES (1938). ZAVATTARI (1922) avrebbe messo in evidenza la presenza di glicogeno nel loro citoplasma, ma ciò non è stato ulteriormente confermato; al contrario, come fu detto, DE VICENTIS (1961) ritiene che gli inclusi citoplasmatici di queste cellule sono di natura lipidica.

Una terza, anch'essa notevole funzione, che è stata loro attribuita è quella di elaborare gli enzimi della schiusa (BERILLI, 1929). Come fu indicato più sopra l'uovo si sviluppa entro una membrana coriale che è piuttosto di notevole consistenza; perché la larva ne possa uscire è necessario che questa membrana venga dissolta; gli enzimi triptici sono, al riguardo, assai efficaci. È stato ammesso, appunto, che tali enzimi siano elaborati e secreti da tali cellule. Esperimenti, però, condotti dalla OSTI (1950) non appoggiano questa supposizione. OSTI ha veduto che « acqua di larve » fatte sviluppare da uova private dei loro involucri fin dal primo momento dello sviluppo, ha la capacità di sciogliere le membrane ovariali; bisogna dunque ammettere che gli enzimi litici sono secreti dalla larva e non dalle cellule testali.

e) Qual'è il destino terminale delle cellule testali? La larva che esce dagli involucri se le porta dietro; esse sono attaccate alla larva abbastanza solidamente, sembra, mediante dei sottilissimi filipodi. Poi, col movimento della larva, molte di esse cadono. Quando la larva entra in metamorfosi e forma la tunica definitiva, di esse non si ha più traccia. Diversi AA. (MILNE-EDWARDS, 1842; KUPFFER, 1870; ZAVATTARI, 1922) pensano che esse diano origine alla tunica.

Da questa rassegna sulle cellule testali dell'uovo delle Ascidie risulta che esse per diversi lati costituiscono ancora un enigma. Ogni contribuzione allo scioglimento di questo enigma non può essere che desiderata: ed è con questo scopo che sono state stabilite le presenti ricerche. I problemi posti sono stati soprattutto i seguenti: quale evoluzione subiscono le cellule testali lungo lo sviluppo? Qual'è il loro destino terminale? Contribuiscono esse alla formazione della tunica della piccola Ascidia, e, se no, qual'è la loro funzione?

Per la risoluzione di questi problemi è stato adoperato il metodo della marcatura delle cellule testali con i coloranti vitali.

#### MATERIALE E METODO

Furono adoperate uova di *Ciona intestinalis* e di *Ascidia malaca*. Le uova prelevate dagli ovidutti venivano messe in soluzioni diluitissime di coloranti vitali diversi; con certi determinati coloranti le cellule testali si colorano differenzialmente dalle cellule follicolari, dal chorion, e dall'uovo; e poiché mantengono il colore, possono essere seguite lungo tutto lo sviluppo dell'uovo.

Come coloranti vitali furono impiegati il bleu nilo, il bleu di Toluidina e il verde-Giano.

I coloranti vitali sull'uovo di *Ciona*, con intendimenti diversi da questi, furono usati in precedenza da GERSCH e RIES (1937). Recentemente DALCQ (1957) ha studiato gli effetti del bleu di toluidina sull'uovo di *Ascidia aspersa*, interessandosi soprattutto alla localizzazione del colore metacromatico nei diversi territori dell'uovo; nel 1959 DALCQ ha ripetuto le osservazioni nell'uovo di *Ascidia scabra* servendosi di un altro colorante vitale metacromatico, il bleu brillante di cresile.

#### RISULTATI

##### A) DALL'UOVO VERGINE ALLA LARVA

##### a) Colorazione vitale con il bleu di toluidina (concentrazione 10%)

Come già mostrato da RIES & GERSCH (1937) le cellule testali dell'uovo vergine di *Ciona intestinalis*, in seguito al trattamento con il bleu di Toluidina prendono una intensa colorazione verde-azzurra (fig. 1). Questa colorazione è presentata in tutti gli stadi di sviluppo dell'uovo fino alla larva.



Fig. 1



Fig. 2



Fig. 5



Fig. 6



Fig. 3



Fig. 4



Fig. 7



Fig. 8

Fig. 1: Uovo di *Clona intestinalis* colorato con il bleu di toluidina. - Fig. 2: Uovo di *Clona intestinalis* colorato con solfato di bleu Nilol. - Fig. 3: Uovo di *Clona intestinalis* colorato con il verde-Gianno. - Fig. 4: Uovo di *Ascidia malacca* colorato con il bleu di toluidina. - Fig. 5: Uovo di *Ascidia malacca* colorato con il solfato di bleu Nilol. - Fig. 6: Uovo di *Ascidia malacca* colorato con il verde-Gianno. - Fig. 7: *Ascidia metamorphosata* colorata con il bleu di toluidina. - Fig. 8: *Ascidia metamorphosata* colorata con il solfato di bleu Nilol.

Per ciò che concerne l'uovo di *Ascidia malaca*, anche le sue cellule testali prendono colorazione azzurro-verde, e questa colorazione rimane inalterata lungo tutto lo sviluppo fino a larva (fig. 4).

Il significato di questa colorazione non è conosciuto; al riguardo va ricordato (GERSCH & RIES, 1937) che le cellule follicolari si colorano in modo del tutto diverso (rosso-viola) dalle cellule testali. Il dato più importante che emerge da questo trattamento col bleu di toluidina è che le cellule testali *non subiscono cambiamento di colore lungo tutto lo sviluppo dell'uovo*.

b) *Colorazione col solfato di bleu Nilo (concentrazione 10%)*

Con questo trattamento le cellule testali dell'uovo di *Ciona intestinalis* prendono una colorazione celeste-chiara; questa colorazione si riscontra senza modificazioni in tutti gli stadi di sviluppo, larva compresa (fig. 2). Le cellule testali di *Ascidia malaca* con questo trattamento non prendono invece alcuna colorazione (fig. 5).

c) *Colorazione con il verde-Giano*

Le cellule testali dell'uovo di *Ciona* dopo trattamento con il verde-Giano assumono una colorazione verde-chiara. Negli stadi successivi di sviluppo le cellule testali assumono la stessa colorazione (fig. 3). Le cellule testali dell'uovo di *Ascidia malaca* col verde-Giano prendono una colorazione verde-smeraldo chiara (fig. 6).

B) *LAEVA NATANTE*

La larva che emerge dalle membrane lascia dietro di sé il chorion e le cellule follicolari che vi sono attaccate; porta, però, con sé, attaccate tenacemente mediante fili plasmatici sottilissimi, le cellule testali. Queste accompagnano la larva in tutti i suoi movimenti. Quando la larva inizia la metamorfosi, e le cellule della coda passano nella porzione posteriore del tronco, la guaina intorno alla coda viene rilasciata come una spoglia vuota, e le cellule testali che vi rimangono attaccate vanno, naturalmente, perdute con essa. Nessuna osservazione porta a ritenere che esse contribuiscano alla formazione del « test » della larva, e molto meno alla formazione della tunica nella piccola *Ascidia* che si sviluppa dopo la metamorfosi. Le cellule testali risultano sempre esterne al « test », cui sono attaccate mediante dei fili plasmatici sottili. Questo dato suggerisce che le cellule testali sono del tutto estranee alla formazione del « test », che sembra, invece, essere costruito esclusivamente dall'epitelio della larva. Questa osservazione è rafforzata dal fatto che le larve che si sviluppano dall'uovo degangato sin dai primi momenti dello sviluppo, e che perciò non posseggono cellule testali, formano, nonostante ciò, il « test ». REVERBERI & MINGANTI (1946) dai quartetti animali isolati hanno ottenuto blastule avvolte dal « test »; questo risultato non si ottiene dai quartetti vegetativi isolati; ciò vuol dire che il « test » è secreto dalle cellule ectodermiche.

Le colorazioni vitali delle larve che emergono dagli involucri dell'uovo mostrano ciò con grande evidenza.

a) Con il trattamento col bleu di toluidina le larve di *Ciona intestinalis* compaiono colorate in rosa-violetto. Le cellule testali che circondano la larva si presentano, invece, colorate in verde-azzurro.

Le larve di *Ascidia malaca*, a loro volta, si presentano nel seguente modo: l'animale colorato in rosa-violetto e le cellule testali colorate in azzurro intenso.

b) Con il trattamento con il solfato di bleu Nilo le larve di *Ciona* presentano le cellule testali colorate in celeste chiaro.

Con lo stesso trattamento le larve di *Ascidia malaca* presentano le cellule testali non colorate.

c) Con il trattamento con il verde-Giano le larve di *Ciona intestinalis* presentano le cellule testali colorate in verde chiaro.

Le larve di *Ascidia malaca* con lo stesso colorante presentano l'embrione colorato in azzurro-verde intenso e le cellule testali colorate in verde smeraldo.

#### C) LA PICCOLA ASCIDIA METAMORFOSATA

Con qualche avvedutezza non è difficile far metamorfosare le larve colorate vitalmente, e ottenere delle piccole *Ascidie*: le larve colorate con verde-Giano però non metamorfosano.

Con questo trattamento è facile verificare se le cellule testali partecipano alla formazione della tunica.

Come fu detto, con il bleu di toluidina le cellule testali si colorano intensamente in azzurro-verde: le cellule della tunica della piccola *Ascidia*, invece, con lo stesso colorante si colorano in rosso-violetto (fig. 7). Queste cellule non sono le testali; esse sono cellule del mesenchima che migrano attraverso gli strati superficiali della larva, secernono il gel della tunica e vi rimangono incluse (fig. 8).

Con il solfato di bleu Nilo le cellule della tunica si colorano in bleu-verde; alcune cellule però non si colorano.

#### DISCUSSIONE

Come esposto precedentemente, le cellule testali dell'uovo di *Ciona intestinalis* e di *Ascidia malaca* con alcuni coloranti vitali prendono una colorazione diversa da quelle delle cellule follicolari; ciò indica che esse hanno costituenti chimici che le differenziano da esse; quali, poi, siano tali costituenti potrà essere risolto con l'applicazione di adatti *tests* citochimici.

Un altro fatto notevole da far rilevare è che tali costituenti non variano lungo tutto lo sviluppo; ciò suggerisce che esse non svolgono più compiti metabolici. Quali siano i nuovi compiti che svolgono non è facile stabilirlo: sicuramente non sono responsabili della formazione del « test » della larva, né della formazione della tunica della piccola *Ascidia*. Esterne alla membrana testale, cui aderiscono con sottili filamenti plasmatici, esse se ne distaccano gradualmente a causa dei movimenti

attivi di nuoto della larva; le poche che restano attaccate alla guaina caudale vanno perdute con la guaina stessa quando la larva, entrando in metamorfosi, la respinge. La tunica della piccola Ascidia viene costituita da cellule a proprietà tintoriali completamente diverse da quelle delle cellule testali e probabilmente da cellule di natura mesenchimale. Il fatto che le cellule testali non subiscano variazioni chimiche qualitative lungo lo sviluppo dell'uovo concorda col fatto che le cellule testali si vacuolizzano, che hanno un reticolo endoplasmatico ridotto, un esiguo numero di mitocondri (REVERBERI & MANCUSO, 1960), che elaborano inclusi di natura lipidica (DE VICENTIS, 1961) e che il loro nucleo va in involuzione (REVERBERI & MANCUSO, 1960).

Tutto questo insieme di dati suggerisce che esse possano essere deputate al galleggiamento della larva. Va ricordato, al proposito, che la larva che esce dagli involucri, di questi ritiene esclusivamente le cellule testali. Queste non sono, poi, aderenti alla superficie della larva, ma ad essa si legano con fili citoplasmatici sottilissimi: in altre parole, esse costituiscono dei piccoli, ben congegnati paracadute che ritardano la caduta della larva, verso il fondo.

Se si compara il tempo di caduta di una larva che deriva da uova che furono fin dai primi momenti liberate dagli involucri, e che quindi non possiede cellule testali, con il tempo di caduta di una larva provvista di cellule testali, si vede che quello è molto più breve.

Le cellule testali sono distribuite su tutto il corpo della larva: ma in numero assoluto sono più numerose sulla coda, che presenta una superficie più ampia; ciò assicura, anche, che la caduta della larva si compia in modo che la testa sia in basso, e cioè che i palpi entrino immediatamente a contatto col substrato su cui la larva si fisserà definitivamente e si metamorfoserà.

Palermo - Istituto di Zoologia dell'Università diretto dal Prof. GIUSEPPE REVERBERI.

#### BIBLIOGRAFIA

- BERRILL N. J.: Phil. Trans. Roy. Soc. London, B 218, 37 (1929).  
BRANCOFT F. W.: Bull. Mus. Comp. Zool. Harvard, 35, 59 (1899).  
BRIEN P.: in: GRASSÉ: *Traité de Zoologie*, Paris XI, 663 (1948).  
CONKLIN E. G.: J. Acad. Nat. Sci. Philadelphia, 13, 1 (1905).  
COWDEN R. & MARKEET L.: Acta Embryol. Morphol. Exper., 4, 122 (1961).  
DALCQ A. M.: Bull. Soc. Zool. France, 42, 296 (1957).  
DALCQ A. M.: Arch. de Biol., 71, 93 (1959).  
DAYDORF M.: Mith. zool. Stat. Neapel, 9, 113 (1889).  
DE VICENTIS M.: Rend. Ist. Sci. Camerino, 2, 146 (1961).  
FLODERUS M.: Zeitschr. wiss. Zool., 61, 163 (1896).  
FOL H.: C. R. Acad. Sci. Paris, 96, 1069 (1883).



- GERSCH M. & RIES E.: Roux'Arch., **136**, 169 (1937).  
HARVEY L. A.: Proc. Roy. Soc. London, B **101**, 136 (1927).  
KNAREN N.: Bergens Mus. Arbok, **1**, 1 (1936).  
KONOPACKI M.: C. R. Soc. Biol., **122**, 139 (1936).  
KUPFFER C.: Arch. mikr. Anat., **6**, 115 (1870).  
METSCHNIKOFF M.: Zeitschr. wiss. Zool., **22**, 339 (1872).  
MILNE EDWARDS H.: Mém. Acad. Sci. Inst. France, **18**, 217 (1842).  
MORGAN T. H.: J. Morph., **4**, 195 (1891).  
OSTI A. M.: Rend. Ist. Sup. Sanità, Roma, **13**, 3 (1950).  
PÉREZ J. M.: Arch. Anat. micr. Morphol. Exp., **43**, 55 (1954).  
RAVEN CH. P.: Oogenesis - Pergamon Press (1961).  
REVERBERI G. & MANGUSO V.: Acta Embryol. Morphol. Exper., **3**, 221 (1960).  
REVERBERI G. & MINGANTI A.: Pubbl. Staz. Zool. Napoli, **20**, 135 (1946).  
RIES E.: Roux'Arch., **137**, 363 (1937).  
SPER J.: Roux'Arch., **111**, 119 (1927).  
ZAVATTARI E.: Arch. Fisiol., **20**, 326 (1922).