

Le ghiandole del guscio dell'*Artemia salina* Leach. (Ricerche morfologiche e citochimiche) (*)

1. — INTRODUZIONE.

L'*Artemia*, il notissimo piccolo crostaceo delle saline e dei laghi salati, si riproduce per oviparità e per viviparità: le cause che determinano rispettivamente la oviparità o la viviparità non sono ancora ben note.

SCIACCHITANO (1927) ritiene che il fenomeno debba riportarsi a un fatto stagionale: la oviparità è in rapporto con la stagione invernale, la viviparità con quella primaverile.

Altri Autori invece lo mettono in relazione con la secrezione delle ghiandole del guscio (FLORIS, 1935; LOCHHEAD, 1940). Come si sa, nella femmina adulta gli ovari (uno per lato, lateralmente all'intestino) comunicano, mediante gli ovidotti, con una tasca impari mediana che è l'utero: quivi le uova vengono a contatto con un secreto elaborato da alcune ghiandole (dette del «guscio») e ne vengono rivestite. Tutte le uova iniziano il loro sviluppo nell'utero, però mentre in alcuni casi questo sviluppo vi si continua a lungo e la femmina partorisce i nauplius (viviparità), in altri casi, invece, le uova vengono deposte precocemente (allo stadio di gastrula). In quest'ultimo caso, se il rivestimento dell'uovo è spesso, lo sviluppo rimane bloccato e solo al verificarsi di condizioni ambientali adatte riprende; se invece il rivestimento è sottile, allora lo sviluppo procede (uova immediate: FLORIS, 1935; LOCHHEAD, 1940).

Sebbene sulle ghiandole del guscio siano stati fatti dei lavori in passato, le modalità mediante le quali esse elaborano il secreto sono piuttosto sconosciute e perciò si è ritenuto utile riprenderne lo studio.

2. — CENNI BIBLIOGRAFICI.

a) Le ghiandole del guscio di *Artemia* sono state descritte dal BUCHHOLZ (1886), e dal CLAUS (1886). Secondo quest'ultimo Autore esse hanno origine per pro-

(*) Memoria presentata dall'Accademico PASQUALE PASQUINI.

liferazione della parete uterina, a seguito del quale processo si formerebbero due ammassi ghiandolari, l'uno dorsale l'altro ventrale, ciascuno costituito da numerose cellule. Le cellule confluiscono mediante altrettanti peduncoli in un condotto unico che sboccherebbe nell'utero: quivi verrebbe versato il loro secreto.

b) I caratteri morfologici delle cellule sono stati descritti dal SIEBOLD (1873): si tratta di grossissime cellule lunghe 90μ e larghe 35μ : il nucleo ha un diametro di circa 30μ ed occupa la maggior parte della cellula. BARIGOZZI (1941) ha richiamato l'attenzione sulla poliploidia elevata di questi nuclei.

c) Il significato funzionale di queste ghiandole è, in linea di massima, conosciuto da lunga data; ma sulla natura chimica del secreto ghiandolare e sulle sue trasformazioni dopo che è stato emesso dalle cellule, non si sa molto: di questo problema si sono occupati recentemente il LOCHHEAD (1941) e il DUTRIEU (1960).

Quest'ultimo trovò che il guscio delle uova è formato da proteine (50%), lipidi (6,6%) e glucidi (4,4%): fu trovata ancora Ca (0,12%), Na (0,11%), K (0,16%), P (0,46%), Fe (0,30%). La pigmentazione del secreto è attribuita da DUTRIEU a un pigmento di origine ematica: si tratterebbe di un cromoproteide derivato dall'emoglobina.

3. — PIANO DELLA RICERCA.

Le presenti ricerche riguardano: l'aspetto morfologico e citologico delle ghiandole del guscio nei diversi momenti dello sviluppo e le loro correlazioni in rapporto con le condizioni della gonade; gli aspetti citochimici delle cellule durante la loro funzionalità; la natura chimica del secreto.

I metodi utilizzati per queste ricerche verranno esposti ai singoli paragrafi.

Morfologia e citologia delle ghiandole nelle diverse fasi di sviluppo.

a) Lo studio in vivo fu fatto isolando l'utero sotto il binoculare. Le ghiandole del guscio sono visibili per trasparenza sulla sua faccia dorsale: operando cautamente gli aspetti delle ghiandole possono essere messi facilmente in evidenza.

Queste ghiandole costituiscono dei veri annessi uterini: esterne all'utero, vi sono connesse mediante degli esili tubuli: si distinguono tre paia di ghiandole. Il primo paio che si può indicare come latero-superiore, sbocca a monte della dilatazione dell'ovidutto e sporge anche sulla faccia ventrale dell'utero; il secondo paio che si può denominare mediale, è il più grande e converge verso la porzione mediana dell'utero; il terzo paio, più piccolo, occupa la porzione latero-posteriore allo sbocco dell'utero e sporge anch'esso ventralmente (Fig. 1; Tav. fig. 1).

Va richiamato che il CLAUS parla di due paia di ciuffi ghiandolari di cui uno dorsale e l'altro ventrale.

b) Lo sviluppo delle cellule del guscio è in rapporto con lo sviluppo della gonade. Lo studio di questi rapporti fu fatto sulle sezioni.

In uno stadio giovanile, in cui gli ovari sono appena abbozzati e costituiti esclusivamente di oogoni, si riscontrano solo due abbozzi ghiandolari che, per la posizione che occupano, rispetto all'utero, possono distinguersi in mediani-dorsali e

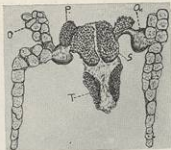


Fig. 1. - Ghiandole del guscio in vivo, dopo dilacerazione della parete uterina. Il primo paio (P) laterale superiore, sbocca a monte della dilatazione dell'ovidutto; il secondo paio (S) mediale, converge nella porzione mediana dell'utero; il terzo paio (T) si rinviene allo sbocco dell'utero.
O, ovario; ov., ovidutto.

lateralì: le cellule di questi abbozzi sono piccole e fittamente addensate, il citoplasma è scarso e pironinofilo, il nucleo è piccolo e possiede un solo nucleolo. (Fig. 2; Tav. fig. 2),

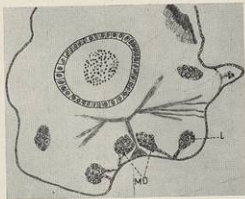


Fig. 2. - Femmina allo stadio giovanile. Ghiandole del guscio all'inizio dello sviluppo. MD = abbozzo ghiandolare dorso-centrale; L = abbozzi laterali.

Si tratta, sicuramente, di cellule non ancora funzionali e con nuclei aploidi.

In individui i cui ovari possedevano oltre oocioni anche qualche oocita alle prime fasi di maturazione, le cellule delle ghiandole del guscio mostrano una basofilia intensa del loro citoplasma e nuclei più grossi del normale, evidentemente in un primo grado di poliploidia: si notò in essi anche la presenza di due o più nuclei (Fig. 3; Tav. Fig. 3).

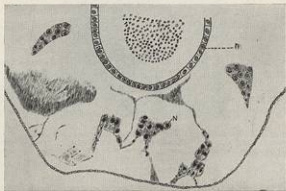


Fig. 3. - Ghiandole del guscio al primo stadio di poliploidia. n = nuclei dell'intestino; N = nuclei delle cellule ghiandolari.

In individui con l'ovario provvisto di qualche oocita in vitellogenesi, le cellule delle ghiandole presentano nuclei ben evidenti, fortemente poliploidi e citoplasma ricco di materiale pironinofilo granulare e fibroso (Tav. fig. 4).

In individui in cui gli ovari contengono oociti al termine della loro vitellogenesi, e già si disegnano nella parte caudale dell'animale vivo come due cordoni bianchi opachi, le cellule delle ghiandole del guscio non differiscono molto in grandezza da quelle dello stadio precedente ma i nuclei sono al massimo di poliploidia: il citoplasma ha l'aspetto compatto e fibroso e presenta già i primi granuli di secreto (Fig. 4).

A questo punto le ghiandole del guscio sono pronte per la secrezione: esse, ora, si presentano come catene moniliformi in situazione dorsale bene distinte in tre paia.

Il parallelismo tra attività dell'ovario e quella delle ghiandole si delinea ora con maggiore chiarezza: in rapporto con la caduta delle uova nelle tasche laterali le ghiandole versano abbondantemente il loro secreto.

In una femmina con uova nelle tasche laterali, le cellule delle ghiandole del guscio presentano nuclei non più vescicolari ma profondamente compatti. Ogni cellula anzi possiede, il più sovente, due nuclei che sono piuttosto compressi, quasi a semiluna, ai due poli opposti della cellula. I nuclei sono separati da una fitta granu-

lazione citoplasmatica che sicuramente corrisponde ai granuli di secreto. È probabile che la presenza di due nuclei in una cellula derivi dal fatto che due cellule si sono fuse tra loro. Il citoplasma è in gran parte occupato da granuli piuttosto grossolani eosinofili. (Fig. 5; Tav. Fig. 5).

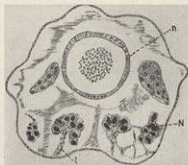


Fig. 4. - Ghiandole del guscio in una femmina con uova all'inizio della vitellogenosi. N - nuclei delle cellule ghiandolari; t - condotti ghiandolari efferenti.

In individui il cui utero è tutto ripieno di uova, le ghiandole del guscio si identificano bene al di sotto dell'intestino. Nelle loro cellule il nucleo e il citoplasma appaiono più compatti; il citoplasma è fibroso e pironfilo; esso non ha più traccia di granulazione; il nucleo presenta un numero elevato di nucleoli (se ne possono

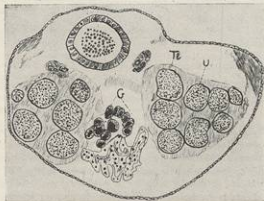


Fig. 5. - Particolare delle ghiandole del guscio in femmina con uova nelle tasche laterali. G = ghiandole del guscio; Tl = tasche laterali; U = uova.

contare fino a 20); la cromatina appare meno omogenea e spezzettata in piccoli frammenti tra cui si trovano sparsi i nucleoli. A questo stadio gli ovari mostrano di avere ripreso in pieno la loro attività e si presentano come lunghe bande ricche di ogni sorta di elementi in maturazione. (Fig. 6; Tav. fig. 6).

Da quanto esposto può concludersi dunque che esiste uno stretto parallelismo tra lo stato della gonade e l'attività delle ghiandole del guscio. La loro prima comparsa avviene quando appare la gonade: l'evoluzione delle ghiandole del guscio

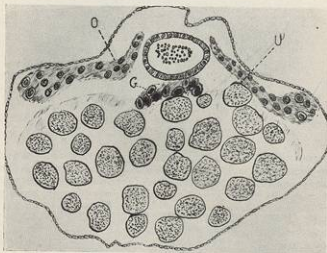


Fig. 6. - Sezione trasversale di femmina con uova in utero: le ghiandole sono poste al di sotto dell'intestino. O = ovari; U = uova in sviluppo; G = ghiandole del guscio.

è in totale dipendenza dell'evoluzione e maturazione delle uova ovariche. Deputate alla secrezione del guscio delle uova, le cellule di queste ghiandole presentano un intensissimo metabolismo: lo stato di poliploidia dei loro nuclei, il numero dei nucleoli e l'alta basofilia nucleolare e citoplasmatica, ne sono gli indici. Importante è la condizione di poliploidia la quale è quanto mai elevata; importante è anche la ricchezza di queste cellule in nucleoli. Ciò crea certamente una ricchezza dell'RNA citoplasmatico che probabilmente ne deriva per passaggio dei nucleoli attraverso la membrana nucleare.

Ricerche citochimiche concernenti la natura del secreto.

a) Come fu esposto precedentemente le caratteristiche più salienti delle cellule delle ghiandole del guscio sono rappresentate: dalla loro situazione nucleare altamente poliploide; dalla ricchezza di nuclei; dalla abbondanza di materiale nucleolare nel citoplasma. Queste condizioni suggeriscono che esse sono il luogo di intense sintesi proteiche, e che perciò il loro citoplasma deve essere ricco in RNA.

Di fatto la ricerca di questo con le reazioni specifiche, controllate con il trattamento con RNA-asi, ha mostrato che esse, in qualunque stadio del loro sviluppo e della loro attività, sono fortemente ricche in RNA.

b) Altra reazione citochimica eseguita allo scopo di definire la natura dei granuli di secreto fu la reazione del MILLON e quella col giallo di naftolo.

Con la reazione MILLON-POLLISTER, è possibile mettere in evidenza oltre le proteine totali anche quelle a gruppo aromatico.

La colorazione al giallo di naftolo è stata usata a pH 2,79, e mette in evidenza le proteine del tipo basico.

Le reazioni furono condotte su ghiandole a diversi stadi di sviluppo. I dati ottenuti si possono così compendiarne:

i granuli presenti nelle cellule e che rappresentano indubbiamente il secreto, appaiono più reattivi del rimanente citoplasma. Sono, quindi, di natura essenzialmente proteica, concordando in tale maniera con le esperienze del DUTRIEU (1960) sulla natura del guscio delle uova deposte.

La comparazione tra i risultati ottenuti con la MILLON solforica e la MILLON tricloraacetica, non dimostra una differenza molto significativa: si deve concludere che le proteine del tipo istoni non sono quindi presenti che in piccole quantità.

Una attività proteica così intensa deve essere correlata dalla presenza di un numero notevole di mitocondri. È stato fatto lo studio delle cellule di ghiandole adulte trattate con lo Janus green: la colorazione si è avuta solo sui granuli di secrezione.

c) Un passo ulteriore della ricerca consistette nell'esaminare se esse producono dei polisaccaridi. La reazione più usuale per la messa in evidenza dei mucopolisaccaridi è la Pas-reazione.

Fu adoperato il reattivo di SCHIFF secondo la tecnica del PEARSE (1960).

Le cellule delle ghiandole del guscio nello stadio iniziale del loro sviluppo sono Pas negative. Questa condizione perdura però solo sino alla comparsa dei granuli di secrezione perchè quando questi compaiono in loro corrispondenza la Pas diventa positiva. Da questi dati si è indotti a ritenere che nel secreto ghiandolare sono presenti dei polisaccaridi.

Con la doppia reazione Pas e giallo di naftolo, i granuli prendono doppia colorazione gialla e rossa.

L'uso del blu di toluidina ha mostrato una spiccata metaeromasia di alcuni granuli.

La ricerca dei lipidi è stata fatta con il trattamento con Sudan 3. I risultati ottenuti dimostrano la presenza di lipidi in corrispondenza dei granuli più che in tutto il resto della cellula.

4. — CONCLUSIONI.

Quanto è stato esposto precedentemente può considerarsi solo come un'utile introduzione allo studio delle ghiandole del guscio. Da questa introduzione risulta che la funzione delle cellule delle ghiandole è, innanzi tutto, strettamente correlata a determinate condizioni nucleari e nucleolari: poliploidia nucleare, grande abbondanza di nucleoli. Il valore della poliploidia non fu potuto stabilire perchè non fu mai rinvenuta una cellula in mitosi, nè nelle cellule della ghiandola dell'adulto nè in quelle delle ghiandole nei primi momenti dello sviluppo. Il numero delle cellule destinate a dare origine alle ghiandole sembra fissato definitivamente fin dal loro primo formarsi. Da quel momento le cellule (che posseggono nuclei di grandezza normale, probabilmente diploidi) non fanno che accrescersi in grandezza, raggiungendo, come fu detto, delle dimensioni, in un certo senso, enormi. Come il nucleo passi dallo stadio diploide a quello poliploide non è stato stabilito; probabilmente per fenomeni endomitotici e in parte per fusione di nuclei di cellule vicine: quest'ultima ipotesi è suggerita da diversi aspetti cellulari.

Il nucleo di queste cellule deve essere sottoposto, soprattutto nel periodo dell'attività delle ghiandole stesse, ad un eccezionale metabolismo: uno studio di questo con precursori normali o anomali (analoghi) marcati, si presenta molto promettente al riguardo. Fenomeni simili a questi descritti sono stati messi in luce da MONTALENTI (1946) su alcune cellule testicolari e sulle cellule ghiandolari (le ghiandole a « rosetta ») di un crostaceo isopode: l'*Anilocra phisodes*. Anche in questo caso le cellule sono poliploidi e la poliploidia è raggiunta attraverso processi di endomitosi e di fusione nucleare: il grado di poliploidia di queste cellule sarebbe rilevato, secondo il MONTALENTI, dalla ripetizione di parecchie unità nucleari diploidi che conservano in seno alla ghiandola poliploide la loro forma e struttura e la loro membrana nucleare. La conta delle unità nucleari è possibile a causa della caratteristica disposizione della cromatina nucleare: un nucleo centrale FEULGEN-positivo da cui si diramano delle braccia cromatiniche fino a raggiungere la membrana nucleare.

L'altro fatto di notevole interesse trovato nelle cellule delle ghiandole del guscio, è quello della presenza, nelle cellule che si trovano in attiva secrezione, di numerosissimi nucleoli; se ne contano talora una ventina in una sola cellula; la loro presenza è rilevata in modo inequivoco dalla colorazione alla pironina. Questi nucleoli passano poi nel citoplasma e vi versano il loro contenuto, arricchendolo in RNA: ciò è mostrato dalla reazione UNNA-BRACHET che mette in evidenza una ricchezza notevole di RNA citoplasmatico. Uno studio di queste cellule col microscopio elettronico non è stato ancora fatto, ma è probabile che in queste cellule si rinverrà un reticolo endoplasmatico molto ricco in ribosomi. I rapporti tra ricchezza in RNA del

citoplasma e attività proteino-sintetica delle cellule rappresentano, però, ormai, un dato così stabilmente definitivo che è superfluo il discuterlo. L'uso dei precursori radioattivi dell'RNA e dei suoi analoghi potrà portare notevole illuminazione sul transfer dell'RNA nucleolare all'RNA citoplasmatico.

Le reazioni citochimiche specifiche hanno messo in evidenza la natura proteica dei granuli di secreto; ma, a giudicare dalla positività della Pas-reazione e del trattamento col blu di toluidina, bisogna ritenere che le stesse cellule oltre che costruire sostanze proteiche, costruiscano anche dei polisaccaridi: questi si combinerebbero forse con le sostanze proteiche. È probabile che la combinazione, forse fuori delle cellule, venga operata da enzimi prodotti dalle stesse cellule, ma la ricerca di essi è ancora allo stato rudimentale. La ricerca dei polisaccaridi potrà essere avvantaggiata dall'impiego degli zuccheri radioattivi. Che nella composizione del guscio entrino altre sostanze (lipidi, pigmenti) è dimostrato dalle ricerche di altri Autori. Da dove derivano queste sostanze? Ciò potrà costituire l'oggetto di ulteriori ricerche.

Palermo - Istituto di Zoologia dell'Università diretto dal Prof. GIUSEPPE REVERBERI -
Aprile 1963.

BIBLIOGRAFIA

- BARDOSZI C.: *Chromosoma*, 2, 251 (1941).
BUCHHOLZ E.: *Branchypus* Grubei Dybowsky. *Schriften phys.-ökon. Gesell. Königsberg*, 1886.
CLAUS C.: *Arch. Zool. Inst. Univ. Wien*, 6, 267 (1886).
DUTRIEU J.: *Rend. Ist. Sci. Univ. Camerino*, 1, 196 (1900).
FLORIS G.: *Rend. Fac. Sci. Univ. Cagliari*, 5, 47 (1936).
LOCHHEAD J. & LOCHHEAD M.: *Anat. Rec.*, 75, 75 (1940).
LOCHHEAD J.: *Tartox News*, 19, 2 (1941).
MONTALENTI G.: *Exptl. Cell Res. Suppl.*, 1, 123 (1949).
PEARSE A.G.E.: *Histochemistry. Theoretical and Applied*. London 1960.
SCIACCHITANO S.: *Riv. Biol.*, 9, 79 (1927).
SIEMOLD C. V.: *Sitzb. Kgl. Akad. Wiss. München*, 3, 197 (1873).

DIDASCALIA DELLA TAVOLA

Fig. 1. — Sacco ovarico dopo dilacerazione della parete esterna, visto dalla parte dorsale. Ghiandole del guscio raggruppate in tre paia: il primo paio sbocca a monte dell'ovidutto; il secondo paio occupa la porzione mediana; il terzo paio si trova nella parte inferiore dell'utero. P = Primo paio di ghiandole; S = Secondo paio; T = Terzo paio. (Camera lucida: Zeiss 7 × 10).

Fig. 2. — Sezione trasversale di *Artemia salina*; ghiandole del guscio all'inizio dello sviluppo: DC = Abbozzo medio-dorsale; L = abbozzi laterali. (Camera lucida: Zeiss 20 × 10).

Fig. 3. — Sezione trasversale con ghiandole del guscio al primo stadio di poliploidia. N = nucleo delle cellule ghiandolari; n = nuclei delle cellule intestinali. (Camera lucida: Zeiss 40 × 10).

Fig. 4. — Sezione trasversale: ghiandole del guscio al termine dello sviluppo. Le ghiandole si aprono a ventaglio sulla parete dorsale dell'utero a cui sono collegate tramite sottili tubuli. N = nucleo poliploide; n = nuclei delle cellule intestinali; t = tubuli. (Camera lucida: Zeiss 20 × 10).

Fig. 5. — Sezione trasversale: uova nelle tasche laterali; ghiandole del guscio con granulazioni nel citoplasma; N = nucleo, S = secreto, t = tubuli (Camera lucida: Zeiss 5 × 10).

Fig. 6. — Sezione trasversale: uova in utero; ghiandole del guscio isolate sotto la parete intestinale e sprovviste di secreto; G = ghiandole del guscio; O = ovari; U = uova. (Camera lucida: Zeiss 5 × 10).

