
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

CATERINA MANSUETO

Sulla riproduzione per divisione mitotica delle cellule testali delle Ascidie

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 36 (1964), n.5, p. 683–689.

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1964_8_36_5_683_0>

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)*

SIMAI & UMI

<http://www.bdim.eu/>

Embriologia. — *Sulla riproduzione per divisione mitotica delle cellule testali delle Ascidie* (*). Nota di CATERINA MANSUETO, presentata (**) dal Corresp. P. PASQUINI.

INTRODUZIONE.

L'ovocita nelle Ascidie viene circondato fin da epoche molto precoci dello sviluppo da due involucri cellulari: quello più interno è costituito dalle cellule testali, quello più esterno, dalle cellule follicolari. La letteratura riguardante le cellule testali nelle diverse specie di uova delle Ascidie è molto vasta: la loro origine, la loro morfologia, la loro costituzione chimica e la loro funzione, sono state oggetto di ricerca da parte di numerosi Autori: sono ricapitolati qui, in breve, i dati relativi più importanti.

1. Circa la loro *origine* sono state fatte almeno tre ipotesi: la più comune, sostenuta da quasi tutti gli Autori antichi, e accettata oggi da Grassé [1] e Raven [2] e altri sostiene che queste cellule hanno origine dall'epitelio germinativo: le cellule di questo circonderebbero l'ovocita in accrescimento, poi alcune di queste cellule, distaccandosi, si porterebbero per movimento ameboide sulla superficie dell'ovocita stesso, e quivi darebbero luogo a un involucro definitivo, quello delle cellule testali. La seconda ipotesi, anch'essa condivisa da numerosi Autori, sostiene che queste cellule hanno origine dal mesoderma [3]: alcune cellule di questo si porterebbero, sempre per movimento ameboide, alla superficie dell'ovocita, quivi si moltiplicherebbero e darebbero così origine definitiva alle cellule testali. La terza ipotesi, sostenuta principalmente da Pérès [4] e a cui accedono anche De Vincentiis [5] e Kalk [6], ammette che le cellule testali derivano da cellule della linea sanguigna.

2. I dati concernenti la *costituzione chimica* delle cellule testali sono quanto mai abbondanti, ma slegati, incerti e spesso contraddittori. Essi sono fondati principalmente su colorazioni citologiche e reazioni istochimiche. Zavattari [7] in *Microcosmus sulcatus*) vi ha descritto granuli di glicogeno; Harvey [8] (in *Ciona*) vi ha descritto inclusioni osmiofile di natura lipidica: queste, presenti nelle cellule giovani, sarebbero sostituite, in seguito a svuotamento, da vacuoli; con la reazione di Bauer, Pérès [4] vi ha messo in evidenza notevoli quantità di polisaccaridi: nelle cellule però all'ultimo stadio della loro evoluzione farebbero comparsa granuli e inclusioni rifrangenti; De Vincentiis [9, 10] vi ha riscontrato granuli metacromatici col bleu di to-

(*) Ricerca eseguita nell'Istituto di Zoologia della Università di Palermo, sotto la direzione del prof. G. Reverberi.

(**) Nella seduta del 9 maggio 1964.

luidina, granuli a fluorescenza giallo-arancio alla luce ultravioletta, granuli rosso-arancio alla pironina, granuli Feulgen positivi e acido-resistenti con la reazione Ziehl-Nielsen; secondo Cowden [11] esse contengono mucopolisaccaridi acidi; secondo Gerzeli [12] esse conterrebbero una trama alcianofila, metacromatica al bleu di toluidina e fucsinofila, pochi aminoacidi e proteine, abbondante reticolo endoplasmatico, polisaccaridi, lipidi, polifenoli e ossindoli; Kessel e Kemp [13] vi hanno descritto polisaccaridi e strutture metacromatiche; Kessel [14] vi ha messo in evidenza in uno stadio tardivo granuli di pigmento; Kalk [6] granuli con vanadio.

3. I dati morfologici sulle cellule testali sono stati arricchiti recentemente dallo *studio al microscopio elettronico*. Per quello che riguarda queste cellule durante il periodo dell'oogenesi vanno ricordate le ricerche di De Vincentiis [15], Kessel e Kemp [13], Kessel [14] e Kalk [6]. De Vincentiis in *Ciona* vi ha descritto numerosi granuli aggregati e vescicole di natura ergastoplasmatica. Kessel su *Styela* vi ha trovato mitocondri, reticolo endoplasmatico, apparato del Golgi, vacuoli e granuli, questi ultimi a corona di rosario e probabilmente rappresentanti l'ultrastruttura dei granuli di pigmento osservati *in vivo*. Kessel e Kemp [13] in *Molgula* vi hanno descritto abbondante reticolo endoplasmatico, reticolo di Golgi e inclusioni, di cui alcune dense agli elettroni e altre meno dense.

Infine Kalk [6] ha notato che in esse, poco prima che entrino nell'ovocita, si formano, a partire dal reticolo endoplasmatico, corpi lamellati per divisione di un corpo centrale che poi si evolvono e si riempiono di composti di vanadio.

4. In quanto alla *funzione* esplicata da queste cellule durante l'ovogenesi, quasi tutti gli Autori sono concordi nel ritenere che esse, almeno in un primo tempo, esercitino una funzione nutritiva nei riguardi dell'ovocita [16, 8, 17, 4, 13]. È stato da questi Autori osservato che i prodotti contenuti nelle cellule testali giovani vengono rinvenuti, in seguito a svuotamento, nel citoplasma ovocitario: alcuni di questi prodotti compaiono nell'ovocita all'inizio della vitellogenesi e sono stati ritenuti precursori del tuorlo [8, 17]. In tempi successivi (sviluppo embrionale, larva natante) queste cellule, il cui aspetto intanto è profondamente cambiato, avrebbero funzione di galleggiamento [18].

5. Come è stato precedentemente esposto, le cellule testali, qualunque sia l'origine ad esse attribuita, sono ritenute capaci, in epoche giovanili almeno, di riprodursi. Gli Autori spesso non sono molto chiari nell'affermare se esse si riproducono alla superficie dell'uovo, invadendola completamente, o se esse si riproducano nell'interno del citoplasma ovulare, nel quale penetrerebbero per movimento ameboide. Certo è, comunque, che, concordemente, è ritenuto che esse si moltiplicano per divisione diretta o amitosi. A formare questa convinzione probabilmente deve avere contribuito il loro comportamento ameboidico e la somiglianza che presentano con alcune cellule sangui-

gne. Un solo Autore, il Davidoff [19], che d'altra parte ammise per esse un'origine oggi del tutto inaccettabile (per gemmazione dal nucleo), ha figurato, più che descritto, alcuni loro aspetti mitotici. Questa osservazione però non sembra essere stata mai confermata dagli Autori successivi. Che essa però corrisponda a verità, è documentato appunto dal presente lavoro, che fu eseguito prima che fosse consultato il lavoro di Davidoff, dal quale, dunque, è indipendente. Lo studio da me iniziato aveva per oggetto soprattutto il metabolismo delle cellule testali, indagato esso con l'impiego di amino acidi radioattivi: fu nel corso di questo studio che fu scoperto che le cellule testali, una volta penetrate nel citoplasma ovulare periferico, si riproducono attivamente per cariocinesi, dando luogo a quei complessi discreti, così bene raffigurati da Conklin [20] nell'uovo di *Ciona*, nella sua monografia classica.

MATERIALE E METODO.

Come materiale furono usati ovari di *Ciona intestinalis* o *Ascidia malaca*. In uno stadio precoce di sviluppo dell'ovario gli ovociti sono quasi tutti della stessa grandezza [30-35 μ] e cominciano ad essere circondati dalle cellule testali, che poi per movimento ameboide si porteranno nel citoplasma ovulare periferico. Le tecniche seguite per questo studio furono diverse: *a*) in alcuni casi gli ovari vennero fissati in alcool acetico, e furono preparati per le comuni manipolazioni citologiche (inclusione in paraffina, sezioni a 7 μ): la colorazione fu eseguita con la Feulgen e verde luce; *b*) alcune sezioni di uova previamente trattate con timidina marcata furono sottoposte alla tecnica autoradiografica con film Kodak AR 10, e dopo sviluppo, colorate con verde di metil pironina; *c*) infine ovociti isolati, prelevati dagli ovari freschi, furono sottoposti a trattamento per 40' con carminio acetico, e successivamente schiacciati.

RISULTATI.

a) Il materiale fissato, sezionato e trattato con la Feulgen ha dato buoni risultati: nell'ovocita medio le cellule testali sono situate all'interno del citoplasma in una zona periferica, incolore; all'esterno dell'ovocita sono ben visibili le cellule follicolari, appiattite e non colorate. Le cellule testali sono spesso in divisione mitotica con cromosomi ben visibili, colorati in rosso; nelle cellule in mitosi viste di fianco i cromosomi appaiono ammassati all'equatore di un piccolo fuso; nelle cellule in mitosi viste dall'alto la presenza di piastre equatoriali metafasiche è molto evidente. Sono state riscontrate anche figure di anafase o di telofase (fig. 1).

La mitosi probabilmente non cade contemporanea in tutte le cellule testali perché in alcune di esse è stato riscontrato il nucleo in stato di riposo e cioè vescicolare con grosso nucleolo colorato in verde. Le cellule testali riunite in gruppo, sono invece in mitosi: e ciò è indice che gli aggruppamenti derivano appunto in questo modo.

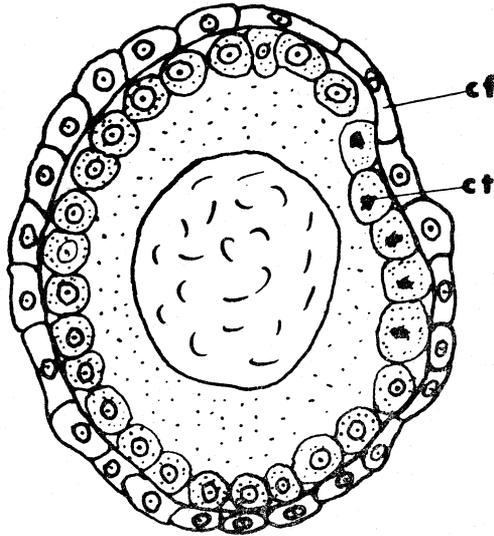


Fig. 1. - Giovane ovocita in cui cinque cellule testali sono in cariocinesi.

(Schema ricavato da un preparato trattato con Feulgen e verde luce).

b) La ricerca eseguita con la timidina tritiata ha dato risultati che si accordano con i precedenti, almeno nel senso che dimostrano che le cellule testali giovani hanno il DNA in metabolismo molto attivo; il che non si verifica nelle cellule che sono state espulse dal citoplasma ovulare. Gli ovari furono posti per un'ora in soluzione di timidina- H^3 (attività specifica $10 \mu c/ml$; concen.

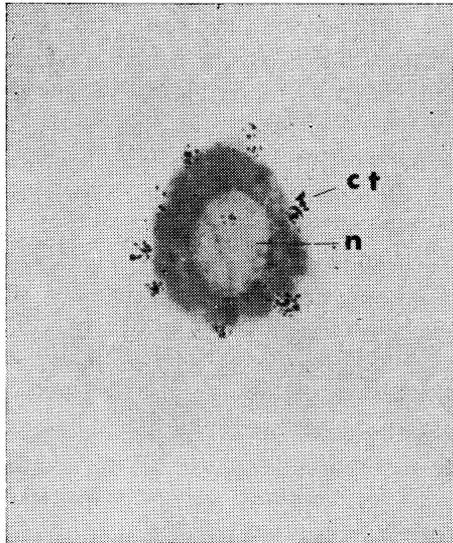


Fig. 2. - Giovane ovocita trattato con timidina- H^3 .

Alla periferia del citoplasma ovulare si notano tracce di radioattività a livello del nucleo delle cellule testali.

0,0003 mM): questo composto com'è noto è un precursore specifico dell'acido deossiribonucleico. Dopo lavaggi in soluzione di timidina non marcata, i frammenti furono fissati in alcool acetico e trattati con le normali tecniche istologiche. Le sezioni furono, dopo sparaffinamento, ricoperte con film Kodak AR 10 ed esposte per 30 giorni. L'osservazione al microscopio mostra che le cellule testali *intraovulari* hanno tracce radioattive molto numerose; il numero delle tracce, nelle cellule testali *peri-ovulari*, è, invece, assente. La timidina marcata, è, in altre parole, incorporata assai intensamente dai nuclei delle cellule testali giovani (fig. 2).

c) Ottimi risultati sono stati ottenuti fissando ovociti giovani con carminio acetico e schiacciandoli. Ovociti di uno stadio giovanile, isolati

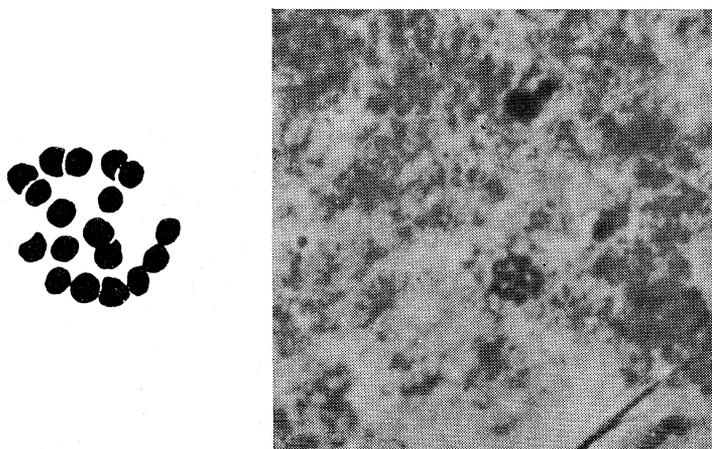


Fig. 3. - Aspetto di piastra equatoriale di metafase in cellule testali di *Ciona intestinalis* (ovociti preparati per schiacciamento).

Abbreviazioni: ct = cellula testale; cf = cellula follicolare; n = nucleo.

accuratamente dall'ovario, furono posti in un vetrino porta-oggetti e trattati con alcune gocce di carminio acetico: il trattamento durò 30-40; il preparato fu ricoperto quindi con coprioggetto e schiacciato. Col microscopio (ingrandimento 1500 ×) è possibile vedere nel bordo periferico ovocitario le cellule testali; molte di esse hanno il nucleo vescicolare e cioè in riposo: ma in casi frequenti è stato possibile trovare cellule in divisione e di esse vedere e contare i cromosomi. Questi sono molto piccoli: per quanto la conta sia difficile si può asserire con certezza che il loro numero si avvicina a 18 (fig. 3).

CONSIDERAZIONI.

In base ai risultati ottenuti da molti Autori e a quelli ottenuti in questo laboratorio, come pure in base a quanto sopra riportato, si può tracciare una breve storia delle cellule testali. Probabilmente esse sono elementi che appar-

tengono alla linea sanguigna; la loro grandezza, la loro morfologia, il loro comportamento ameboidico, la presenza in esse di granuli pigmentati provvisti di vanadio come gli elementi del sangue, rendono molto accettabile questa ipotesi.

L'oocita in accrescimento forse esercita su di esse una particolare attrazione: esse, per movimenti ameboidi vi ci si portano sopra e in seguito vi penetrano; è frequente il colpirlle gli aspetti ameboidici (forma allungata o quadrangolare con prolungamenti).

Nel citoplasma periferico esse cominciano a moltiplicarsi: la divisione avviene, come ora è stato descritto, per cariocinesi. Il numero dei cromosomi, allo stadio diploide, è di 18, come Minganti [18] ha dimostrato nell'uovo maturo. L'incorporazione di timidina- H^3 testimonia d'altra parte un'attiva sintesi di DNA nel loro nucleo.

A seguito della divisione si formano, nell'interno dell'oocita, (perifericamente) dei « nidi », costituiti da più cellule. Prima della divisione in ogni caso, esse versano nel citoplasma ovulare molti dei loro contenuti. La prima funzione che espletano pare che sia quella di arricchire l'ovocita in accrescimento di diverse sostanze nutritive, tra cui RNA. Che esse allo stadio giovanile posseggano RNA è dimostrato dalla reazione positiva con la pironina: questa reazione non è più presentata dopo un certo soggiorno nell'oocita. D'altra parte, alla periferia di questo è possibile riscontrare, in rapporto topografico con esse, dei granuli basofili che il trattamento con ribonucleasi digerisce: è probabile che questi granuli ribonucleici siano appunto il prodotto di versamento delle cellule testali; questa ipotesi è stata sostenuta (per gli acidi nucleici in genere) anche da Konopacki [17].

È probabile che la loro funzione sia anche quella di versare nel citoplasma altre sostanze, come per esempio polisaccaridi [13], granuli osmiofili [8], granuli di natura lipidica [9, 10], vanadio [6].

La loro struttura e il loro contenuto, a seguito di questo versamento, cambia enormemente, come particolari reazioni citochimiche e alcune colorazioni mostrano [22]: ne segue una vacuolizzazione e l'elaborazione di materiali di diversa composizione (mucopolisaccaridi acidi e granuli metacromatici al bleu di toluidina).

Le cellule testali, a questo punto, sono espulse dalla periferia dell'oocita e passano all'esterno assumendo nuove funzioni.

Nell'uovo distaccato dell'ovario le cellule testali espleterebbero funzioni assai più elementari, anche in rapporto alla loro semplificazione e riduzione. Esse sono ridotte ormai a cellule rudimentali, con plasma ricco di vacuoli, di granuli di pigmento giallo, di granuli lipidici: la loro funzione è quindi quella di alleggerire l'uovo per il galleggiamento. Nella larva che esce dalle membrane le cellule testali rimangono attaccate per qualche tempo alla guaina che le riveste: la larva ne è avvantaggiata per la sua flottazione [18]. Man mano, con i movimenti della larva, esse si distaccano e vanno perdute: ma intanto la larva caduta sul fondo (e le cellule testali ne regolano la caduta orientata) inizia i processi della metamorfosi.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] P. P. GRASSÉ, « *Traité de Zoologie* », XI, 571 (1948).
- [2] CHR. P. RAVEN, « *Oogenesis* », Pergamon Press, Oxford 1961.
- [3] N. KNABEN, « *Bergens Mus. Arbok* », I, 1 (1936).
- [4] J. M. PÉRÈS, « *Arch. Anat. micr.* », 43, 58 (1954).
- [5] M. DE VINCENZIIS, « *Rend. Ist. Sci. Camerino* », 2, 146 (1961).
- [6] M. KALK, « *Acta Embryol. Morphol. Exper.* », 6, 289 (1963).
- [7] E. ZAVATTARI, « *Arch. Fisiol.* », 20, 326 (1922).
- [8] L. A. HARVEY, « *Proc. Roy. Soc. London* », 101, 135 (1927).
- [9] M. DE VINCENZIIS, « *Rend. Ist. Sci. Camerino* », I, 135 (1960).
- [10] M. DE VINCENZIIS, « *Rend. Ist. Sci. Camerino* », I, 291 (1960).
- [11] R. R. COWDEN, « *Acta Embryol. Morphol. Exper.* », 4, 123 (1961).
- [12] G. GERZELI, « *Ist. Lombardo (Rend. Sci.)* », 95, 165 (1962).
- [13] R. G. KESSEL & N. E. KEMP, « *J. Ultrastr. Res.* », 6, 57 (1962).
- [14] G. KESSEL, « *J. Cell Biol.* », 12, 637 (1962).
- [15] M. DE VINCENZIIS, « *Rend. Ist. Sci. Camerino* », 3, 58 (1962).
- [16] F. W. BONKROFT, « *Bull. Mus. Comp. Zool. Harvard* », 35, 59 (1899).
- [17] M. KONOPACKI, « *C.R. Soc. Biol.* », 122, 139 (1936).
- [18] J. GORGONE, « *Rend. Acc. Naz. XL* », 13, 1 (1962).
- [19] M. DAVIDOFF, « *Mitth. Zool. St. Neaples* », 9, 113 (1889).
- [20] E. G. CONKLIN, « *J. Acad. Nat. Sci. Philadelphia* », 13, 1 (1905).
- [21] A. MINGANTI, « *Boll. Zool.* », 23, 299 (1956).
- [22] C. MANSUETO, « *Ric. Scient.* », in pubbl. (1964).