

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

# RENDICONTI

---

GIOVANNA LEONARDI

## Ricerche sulla struttura del corion di uova di Ascidie

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 39 (1965), n.1-2, p. 118-122.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1965\\_8\\_39\\_1-2\\_118\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1965_8_39_1-2_118_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.** — *Ricerche sulla struttura del corion di uova di Ascidie* (\*). Nota (\*\*) di GIOVANNA LEONARDI, presentata dal Corrisp. P. PASQUINI.

#### INTRODUZIONE.

Le uova di Ascidie sono rivestite da involucri complessi, dentro i quali esse sono fecondate e si sviluppano fino alla schiusa delle larve natanti. Esternamente vi è uno strato di cellule follicolari, di forma e grandezza diverse a seconda della specie. Queste cellule si impiantano su una membrana anista, detta corion, separata dall'uovo da un liquido perivitellino, che si accumula dopo l'oviposizione. A contatto dell'uovo sono le cellule testali, in uno strato più o meno continuo. Nelle Ascidiidae queste cellule sono tenute aderenti all'uovo da una seconda membrana anista, distinta dal corion [1].

Questi involucri, e in particolare il corion, non permettono il passaggio di spermatozoi di altra specie, e in alcune specie, come in *Ciona intestinalis*, neppure agli spermatozoi dello stesso individuo. La rimozione degli involucri rende possibile l'ibridazione interspecifica [2, 3] e in *Ciona* anche l'autofecondazione [4]. Per spiegare questi fatti si è rivolta l'attenzione alla costituzione chimica del corion.

Le conoscenze attuali al riguardo consistono nel fatto che esso è costituito principalmente di proteine. Ciò è stato per lo più dedotto dalla sua sensibilità alle proteasi. Per primo Berrill [1] attribuì attività proteolitica all'acqua di schiusa, che ha effetto litico sul corion. Tale effetto è stato in seguito studiato da Tyler [5] e da Osti [6], la quale ne ha messo in evidenza la relativa specificità. Più recentemente Leonardi [7] ha dimostrato che l'acqua di schiusa di *Ciona* idrolizza emoglobina e caseina. Anche il succo gastrico di Crostacei [4, 8] ed estratti del loro epatopancreas [9] attaccano il corion, presumibilmente per il loro contenuto in enzimi proteolitici. Dimostrazioni più dirette della natura proteica del corion di *Ciona* sono date dalla sua sensibilità alla tripsina [4, 9] e dalla reazione xantoproteica positiva [4]. Altri dati sperimentali sono da connettere con la natura chimica del corion. Il trattamento con acqua di mare portata a pH 2,3 [4] o a pH 9,4 (M. Bucaria, non pubblicato), o con versene 0,001 M [10] rende possibile l'autofecondazione in *Ciona*. Invece il trattamento con tioglicolato 0,0005 M per 30 secondi modifica gli involucri di *Ciona* (ma non l'uovo né gli spermatozoi) in modo da impedire anche la normale fecondazione incrociata [3].

(\*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Istologia ed Embriologia della Università di Palermo, e Gruppo di Ricerca per l'Embriologia del C.N.R., sotto la direzione del prof. A. Minganti.

(\*\*) Pervenuta all'Accademia il 27 luglio 1965.

Nella presente ricerca è stata studiata la composizione del corion di *Ciona intestinalis* e (in parte) di *Ascidia malaca* mediante trattamento con enzimi ed altre sostanze, e con colorazioni istochimiche. È risultato che il corion è composto di proteine stabilizzate al chinone, con differenze tra le due specie, e (almeno in *Cionā*) da polisaccaridi neutri ed acidi.

#### MATERIALI E METODI.

Sono state adoperate uova vergini di *Ciona intestinalis*, prelevate dagli ovidutti mediante puntura. Uno studio più limitato è stato fatto anche su uova di *Ascidia malaca*, ottenute nello stesso modo. Le uova sono state sottoposte *in toto* ai vari trattamenti, senza precedente fissazione. Per le colorazioni il corion è stato anche isolato manualmente. Ogni trattamento e colorazione è stato ripetuto da 5 a 15 volte su altrettanti lotti di uova.

1. *Trattamenti con enzimi.* — Sono state usate le seguenti proteasi: tripsina 0,2 % (Sigma Chem. Co., tipo III); chimotripsina 1 % (Sigma, tipo III); pepsina 0,2 % (Sigma, 1 : 60000); e le seguenti carboidrasi: taka-diastrasi 1 % (Park & Davis);  $\alpha$ -amilasi (Sigma, tipo II); lisozima 1 % (Sigma, grado I). Gli enzimi vennero disciolti in acqua di mare (pH 7,8), tranne la pepsina, che fu disciolta in 0,1 N HCl. La papaina fu attivata con cisteina 0,03 M. Le uova furono immerse in queste soluzioni e osservate periodicamente al microscopio. I trattamenti per *Ciona* furono eseguiti in bagno termostatico a 24°C; per *A. malaca* alla temperatura ambiente di circa 28°C;

2. *Trattamenti con altre sostanze.* — Sono stati adoperati: periodato di sodio NaIO<sub>4</sub> (soluzione satura in acqua distillata, diluita 1 : 10 con acqua di mare), come solvente, per ossidazione, di legami tra gruppi alcolici secondari. Ipoclorito di sodio (soluzioni contenenti da 0,2 % a 10 % di cloro attivo, ottenute diluendo con acqua di mare la soluzione concentrata Carlo Erba) come solvente di legami al chinone. Tioglicolato di sodio 2 % e mercaptoetanolo (non diluito) come riducenti di legami -S-S- in gruppi -SH. Questi trattamenti sono stati fatti alla temperatura ambiente di 20°C circa.

3. *Colorazioni e reazioni istochimiche.* — (a) Per proteine: reazione di Gram [11] per gruppi carbossilici; colorazione DDD di Barnett & Seligman [12] per gruppi sulfidrilici legati a proteine; (b) per polisaccaridi: reazione PAS [13] per polisaccaridi neutri (idrolisi per 15 minuti a 20°C e colorazione per 5 minuti); per polisaccaridi acidi: colorazione con alcian blu [13], reazione di Hale [13], colorazione con blu di toluidina 0,015 % a pH 5 e pH 3,4, anche dopo blocco dei gruppi acidi per metilazione e sblocco per saponificazione [13]; (c) per polifenoli; colorazione di Fontana al nitrato argenteo ammoniacale. Per polifenolossidasi: reazione di Bloch nella modificazione di Laidlaw [14] (incubazione con DOPA 0,1 % a pH 7,4 per 6 ore a 37°C).

## RISULTATI.

A) Corion di *Ciona*.

1. *Azione di enzimi.* - Le carboidrasi adoperate (taka-diastrasi,  $\alpha$ -amilasi, lisozima) non hanno causato alcuna apparente modificazione nel corion, neppure in 24 ore di trattamento.

Delle proteasi, la chimotripsina 1% non ha avuto alcun effetto visibile. La tripsina 0,2% e la pepsina 0,2% hanno disciolto il corion in un punto, aprendo una breccia attraverso la quale l'uovo è fuoriuscito; il tempo impiegato è stato in media di 75 minuti per la tripsina, e 25 minuti per la pepsina. Con la tripsina, dopo 5 minuti di trattamento il corion è apparso distinto in due foglietti, l'uno vicino all'altro; l'azione dell'enzima è stata uguale su entrambi. La papaina 2% in 6 ore ha prodotto nel corion diverse brecce, con fuoriuscita dell'uovo attraverso una di esse. Nessuno degli enzimi ha disciolto completamente il corion di *Ciona*.

L'uovo è andato in citolisi per effetto di ognuno di questi trattamenti, ad eccezione di quello con la tripsina.

2. *Azione di altre sostanze.* - Nessuna apparente modificazione è stata causata nel corion da tioglicolato di sodio e da mercaptoetanolo.

Il periodato di sodio lo ha reso meno resistente: dopo un'ora e mezza di trattamento esso era più facilmente lacerato con aghi.

L'ipoclorito di sodio, in soluzioni contenenti da 0,2% a 10% di cloro attivo, lo ha disciolto in un punto, causando la fuoriuscita dell'uovo (andato presto in citolisi); il tempo, da 2 a 35 minuti, è stato proporzionale alla concentrazione di ipoclorito.

Trattando le uova prima con periodato di sodio per 10 minuti e poi con ipoclorito con 0,5% di cloro attivo per 30 minuti, il corion si è disciolto completamente.

3. *Colorazioni e reazioni istochimiche.* - La colorazione di Gram e quella DDD hanno colorato il corion in modo debole ed uniforme. Dopo trattamento con tripsina 0,2% per 10 minuti, la colorazione di Gram è risultata indebolita; essa non è avvenuta affatto dopo trattamento con papaina 2% per 3 ore. È invece apparsa più intensa dopo trattamento con versene 0,001 M per 20 minuti.

Le reazioni PAS e di Hale sono state positive. Dopo trattamento con tripsina 0,2% per 10 minuti la reazione di Hale è stata del tutto negativa; al contrario, essa è stata più intensa dopo trattamento con versene 0,001 M per 20 minuti. Il corion non si è colorato in modo evidente con alcian blu.

Il blu di toluidina ha colorato il corion metacromaticamente. La metilazione ha soppresso ogni colorazione; alla successiva saponificazione, lo strato esterno del corion ha presentato di nuovo metacromasia, mentre quello interno

non si è colorato. La metacromasia è stata soppressa anche da trattamento con tripsina 0,2 % per 10 minuti. Essa invece è apparsa più intensa dopo trattamento con versene 0,001 M per 20 minuti.

La colorazione di Fontana per polifenoli e la reazione per polifenolossidasi hanno dati risultati negativi nel corion. Invece reazione positiva con entrambi i metodi si è avuta nelle cellule testali, le quali si sono dimostrate anche metacromatiche.

### B) Corion di *A. malaca*.

1. *Azione di enzimi.* – Sono state usate tripsina, pepsina e papaina. La tripsina 0,2 % ha disciolto il corion in un punto, provocando la fuoriuscita dell'uovo, in un tempo medio di un'ora e mezza; in 30 ore lo ha disciolto completamente. La pepsina 0,2 % ha ugualmente aperto il corion in un punto, in 45 minuti in media, senza ulteriori modificazioni. La papaina non ha prodotto alcun effetto apparente.

2. *Azione di altre sostanze.* – Nessuna apparente modificazione è stata causata dal tioglicolato di sodio 2 %. Il periodato di sodio ha indebolito il corion, in modo che dopo 7 ore di trattamento esso presentava una minore resistenza alla lacerazione con aghi. L'ipoclorito di sodio, in soluzioni con 2 % a 5 % di cloro attivo, lo ha disciolto completamente in meno di un minuto; con soluzioni con 0,2 % a 0,5 % di cloro attivo il corion si è aperto in un punto in circa 2 minuti, e poi in breve tempo (pochi minuti) si è completamente disciolto.

3. *Colorazioni e reazioni istochimiche.* – Il metodo DDD non ha affatto colorato il corion.

Con la reazione PAS esso si è presentato debolmente colorato, mentre su di esso erano fortemente colorati dei contorni esagonali, verosimilmente in corrispondenza dei limiti tra aree di attacco sul corion delle singole cellule follicolari.

La colorazione di Fontana per i polifenoli e la reazione per la polifenolossidasi hanno dato risultati negativi sul corion. L'ultima reazione è stata invece positiva nelle cellule testali.

### DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.

I risultati ottenuti trattando il corion con enzimi ed altre sostanze si limitano alle sue modificazioni visibili, e non tengono conto di cambiamenti puramente chimici. Nonostante ciò, i dati raccolti permettono di dedurre utili informazioni su questa struttura.

Il corion di *Ciona* e di *A. malaca* è costituito da proteine e da polisaccaridi, con notevoli differenze tra le due specie. Il corion di *Ciona* è più suscettibile agli enzimi proteolitici, mentre quello di *A. malaca* è disciolto più rapi-

damente da ipoclorito. Ciò indica che le proteine del corion hanno diversa composizione nelle due specie, e che sono stabilizzate al chinone, maggiormente in *A. malaca* che in *Ciona*. Al processo di stabilizzazione pare intervengano le cellule testali, che presentano polifenoli e attività di polifenolossidasi. In entrambe le specie le proteine del corion sono povere di amino acidi aromatici, poiché non vengono attaccate dalla chimotripsina; non sono cheratinizzate da legami -S-S-, altrimenti verrebbero attaccate da tioglicolato e da mercaptoetanolo. In *Ciona* esse contengono gruppi -SH (colorazione DDD), che mancano in *A. malaca*, e gruppi carbossilici (colorazione Gram). A queste differenze di composizione si può attribuire il blocco alla fecondazione interspecifica [3].

I polisaccaridi del corion di *Ciona* si mostrano eterogenei. La reazione PAS positiva è data da polisaccaridi neutri; quella di Hale e la metacromasia, da mucopolisaccaridi acidi; dal comportamento della metacromasia dopo metilazione e saponificazione l'acidità pare dovuta a gruppi carbossilici nello strato esterno del corion e da gruppi solforici in quello interno. La mancata colorazione con alcian blu dipende forse da fattori tecnici. In *Ascidia nigra* ed *Ecteinascidia turbinata* il corion si colora tanto con la reazione PAS che con alcian blu, e da ciò Cowden [15] ha dedotto la coesistenza di mucopolisaccaridi neutri ed acidi. Alla presenza di polisaccaridi nella struttura del corion di *Ciona* è dovuto anche l'indebolimento prodotto dal periodato di sodio, già osservato da Dalcq [16] in altra specie.

Il rafforzamento delle colorazioni di Gram, di Hale e metacromatica causato dal versene 0,001 M si può spiegare con la liberazione di gruppi carbossilici, forse per rimozione di ioni metallici con cui erano combinati: potrebbe essere questo processo a produrre lo sblocco dell'autosterilità di *Ciona*, esercitato dal versene (Ortolani [10]).

#### BIBLIOGRAFIA.

- [1] N. J. BERRILL, « Phil. Trans. Roy. Soc. London », *B* 218, 37 (1930).
- [2] G. REVERBERI, « Rend. Accad. Naz. Lincei », (6) 17, 737 (1932).
- [3] A. MINGANTI, « Acta Embryol. Morphol. Exper. », 2, 269 (1959).
- [4] T. H. MORGAN, « J. Exp. Zool. », 80, 19 (1939).
- [5] A. TYLER, « Biol. Bull. », 61, 59 (1936).
- [6] A. M. OSTI, « Rend. Ist. Sup. Sanità », 13, 3 (1950).
- [7] G. LEONARDI, « Rend. Accad. Naz. Lincei », (8) 35, 130 (1963).
- [8] N. J. BERRILL, « Biol. Bull. », 63, 381 (1932).
- [9] A. MINGANTI, « Ric. Scient. », 22, 439 (1952).
- [10] G. ORTOLANI, « Ric. Scient. », 27, 2150 (1957).
- [11] A. G. E. PEARSE, *Histochemistry, Theoretical and Applied*, J. & A. Churchill Ltd., London (1961).
- [12] R. J. BARNETT & A. M. SELIGMAN, « Science », 116, 323 (1952).
- [13] L. LISON, *Histochimie et Cytochimie Animales*, Gauthier-Villars Eds., Paris (1960).
- [14] G. F. LAIDLAW, « Anat. Rec. », 53, 399 (1932).
- [15] R. R. COWDEN, « Acta Embryol. Morphol. Exper. », 4, 123 (1961).
- [16] A. M. DALCQ, « Bull. Soc. Zool. France », 82, 296 (1957).