

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI  
**RENDICONTI**

---

G. D'ANCONA LUNETTA

**Ricerche sulla tunica larvale di *Ciona intestinalis*  
(Ascidia)**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 42 (1967), n.1, p. 76–80.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1967\\_8\\_42\\_1\\_76\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1967_8_42_1_76_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 tunica larvale di Ciona intestinalis (Ascidia)* (\*). Nota di G. D'ANCONA LUNETTA, presentata (\*\*) dal Corrisp. P. PASQUINI.

SUMMARY. — A histochemical study has been made of the composition of the larval tunic of the ascidian *Ciona intestinalis*. The tunic was found to contain (a) proteins, possibly stabilized by SH-group and by quinone groups, and (b) neutral and acid polysaccharides, with sulfate groups. Proteins and polysaccharides are likely to be combined into glycoproteins and mucopolysaccharides of different kinds. No evidence of the presence of cellulose in the tunic has been obtained.

#### INTRODUZIONE.

Le larve di *Ciona intestinalis* sono avvolte da una « tunica » (o mantello, o test), che lungo la coda si espande nelle pinne dorsale e ventrale e che, alla estremità della stessa, forma la pinna caudale, pure posta in un piano sagittale. La disposizione delle pinne può essere diversa in altre specie [1].

La tunica larvale si forma in due tempi. Negli ultimi stadi di vita embrionale l'epitelio di rivestimento secerne una sottile cuticola e poi uno strato di tunica provvisto delle pinne; successivamente, durante la vita libera della larva, lo stesso epitelio forma un secondo strato di tunica più interno [2, 3].

All'inizio della metamorfosi, lo strato esterno della tunica si apre lungo una linea ventrale nel cefalenteron e alla base della coda, e viene eliminato insieme a tutta la tunica caudale, lasciata vuota per la retrazione della coda. Resta così solo lo strato interno, di più recente formazione, che riveste la larva durante la metamorfosi, e che gradualmente si sviluppa nella tunica definitiva.

Sono stati raccolti numerosi dati sulla formazione e sulla struttura della tunica adulta [4], che ha tratto l'attenzione per il suo contenuto in cellulosa. Invece non si conosce praticamente nulla della natura chimica della tunica larvale. Huxley [5] è stato forse l'unico a occuparsene, nel 1852, per affermare che la tunica di larve di *Doliolum* presentava chiare e inconfondibili indicazioni della presenza di cellulosa, senza dire quali fossero queste indicazioni.

La presente nota riferisce i risultati di osservazioni soprattutto istochimiche, dirette alla conoscenza della struttura chimica della tunica larvale di *Ciona intestinalis*.

(\*) 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.

(\*\*) Nella seduta del 14 gennaio 1967.

## MATERIALI E METODI.

Sono state adoperate larve di *Ciona intestinalis* a vari tempi dalla schiusa fino all'inizio della metamorfosi.

Colorazioni e trattamenti sono stati fatti su larve *in toto*, non fissate, usando metodi secondo le modalità descritte dagli Autori appresso citati.

La tunica è abbastanza distinta dal corpo della larva (specie nelle pinne) perché la sua colorazione non venga mascherata da quella eventuale della larva. Comunque, colorazioni e trattamenti sono stati eseguiti, con risultati identici, anche su porzioni caudali della tunica rimaste vuote per la retrazione della coda e su le porzioni di tunica eliminate alla metamorfosi.

## OSSERVAZIONI.

1. - *Ricerca di proteine.*

*Colorazioni.* La tunica si è colorata in modo uniforme con le seguenti colorazioni: con nero d'amido B [6] per proteine in genere; con bleu di bromofenolo [7] per gruppi carbossilici di proteine; col metodo «DDD» [7] per gruppi SH in proteine; col metodo Weigert [8] per fibre elastiche. Non si è avuta alcuna colorazione della tunica: con il reattivo di Millon [9] per proteine non istoniche; con il metodo Unna-Tänzer-Livini [8] per fibre elastiche.

La colorazione con ninidrina [7] per amino acidi liberi ha interessato solo lo strato interno (definitivo) della tunica del cefalenteron in larve prossime alla metamorfosi.

*Trattamento con enzimi proteolitici.* Pepsina (Bayer 1 : 10.000) 0,2% in 0,1N HCl: le tuniche trattate per 24 ore a 25°C sono apparse più rigonfie, e presentavano una minore metacromasia con bleu di toluidina rispetto ai controlli trattati con 0,1 N HCl.

Tripsina (Sigma Tipo III) 0,2% in acqua di mare (pH 7,8). Dopo 6 ore a 25°C la tunica è stata parzialmente disciolta e la metacromasia con bleu di toluidina ridotta. Dopo 24 ore a 25°C la tunica è apparsa maggiormente distrutta, specie nella regione tra tronco e coda; la metacromasia è stata del tutto soppressa.

Papaina (Merck 1 : 350) 0,2%, attivata con 0,03 M cisteina (pH 7,8): dopo 24 ore a 25°C la cuticola esterna è stata rotta in qualche punto; la tunica propria non è apparsa modificata. La metacromasia con bleu di toluidina è rimasta immutata.

Pronasi (Calbiochem) 0,2% in acqua di mare. Il trattamento per 24 ore a 25°C ha disciolto parzialmente la tunica; questa ha perduto ogni colorabilità con nero d'amido e con bleu di toluidina.

Allo scopo di accertare la eventuale stabilizzazione al chinone di proteine, è stata ricercata la presenza di polifenoli mediante il metodo di Fontana [9] e di polifenolossidasi con incubazione con dopa [10]. Nessuno dei due metodi

ha dato alcuna colorazione nella tunica. Invece una colorazione positiva si è avuta nelle cellule testali, come già trovato da Leonardi [11] negli involucri di uova vergini.

## 2. – *Ricerca di polisaccaridi.*

*Colorazioni.* La tunica ha presentato una netta colorazione con il metodo PAS [9] per polisaccaridi neutri; con alcian bleu [9] e col metodo di Hale [9] per polisaccaridi acidi. Con bleu di toluidina (0,015%, pH 5) la tunica si è colorata in modo chiaramente metacromatico. La metacromasia è stata soppressa da metilazione e non è stata ristabilita da saponificazione [9]. Nessuna colorazione si è avuta con la reazione di Langhans [8] che utilizza il liquido di Lugol per la dimostrazione di glicogeno.

*Trattamento con enzimi.* – Il trattamento con  $\alpha$ -amilasi (Sigma Tipo II) 1% in buffer fosfato 0,02 M, pH 7 [9] per 1 ora a 37° C; con taka-diasasi (Parke-Davis) 1% in acqua di mare per 24 ore a 25° C; con ialuronidasi (Wister) 0,15% in buffer acetato 0,1 M, pH 5 [12] per 2 ore a 60° C, non hanno modificato visibilmente la tunica né alterato la metacromasia con bleu di toluidina. Invece il trattamento con lisozima (Armour) 1% in acqua di mare per 2 ore a 25° C ha causato la perdita completa della metacromasia.

*Ricerca di cellulosa.* – Sono state applicate alcune reazioni, usate in passato per mettere in evidenza la cellulosa, ma di specificità non accertata. Una di queste è la reazione di Molisch, con  $\alpha$ -naftolo e acido solforico, usata da Schulze e Kunike [13] per la tunica di ascidie adulte: applicata alla tunica larvale non ha dato alcuna colorazione. Pure negativa è stata la colorazione col reattivo di Herzberg [14] usato nell'industria della cellulosa. La tunica si è disciolta completamente in acido solforico concentrato e si è colorata in giallo con KOH 35% e con NaOH 10%: questi sono stati interpretati come criteri della presenza di cellulosa da Saint-Hilaire [15] per la tunica di ascidie adulte.

Il trattamento con cellulasi (Sigma Tipo I) 1% in buffer acetato 0,1 M, pH 4,6 per 4 ore a 47° C, non ha prodotto modificazioni evidenti nella tunica larvale, e non ne ha alterato la metacromasia con bleu di toluidina. È stata fatta una ricerca quantitativa di glucosio eventualmente liberato in seguito al trattamento con cellulasi; per questa ricerca è stato usato il metodo di Park & Johnson [16]. I risultati non sono stati soddisfacenti, per la presenza di grande quantità di sostanze riducenti nella cellulasi: inoltre non è esclusa la contaminazione con altre carboidrasi dell'enzima non purificato.

## 3. – *Trattamento con altre sostanze.*

Il trattamento con periodato di sodio (soluzione satura in acqua distillata) per 24 ore a 25° C non ha modificato visibilmente la tunica, ma ne ha ridotto notevolmente la metacromasia. L'ipoclorito di sodio (10% in acqua distillata) a 20° C, in 45 minuti di trattamento ha parzialmente distrutto la tunica,

e ne ha completamente soppresso la metacromasia. Lo stesso effetto sulla metacromasia è stato causato da tioglicolato di sodio 0,5 M, pH 7,8 per 24 ore; la tunica non è apparsa visibilmente modificata.

#### DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.

Benché la specificità di molti dei metodi adoperati sia discutibile, i dati portano alla conclusione che la tunica larvale di *Ciona intestinalis* contiene proteine e polisaccaridi neutri e acidi. Le diverse parti della tunica (cuticola, strato interno ed esterno) si sono comportate nello stesso modo con la maggior parte dei metodi ma non con tutti, mostrando così di avere una composizione simile, ma non identica.

Le proteine sono almeno in parte stabilizzate da gruppi SH, e cioè sono cheratinizzate, come indicano la colorabilità col metodo «DDD» e la sensibilità al tioglicolato di sodio. L'effetto dissolvente dell'ipoclorito di sodio potrebbe dipendere da una stabilizzazione al chinone, sebbene questa non sia confermata da presenza di polifenoli e polifenolossidasi.

Le proteine sono verosimilmente combinate con polisaccaridi a formare glicoproteine e mucopolisaccaridi di vario tipo. La presenza di mucopolisaccaridi acidi è indicata dalla colorabilità con alcian bleu e col reattivo di Hale, e dalla metacromasia con bleu di toluidina. La metacromasia può essere attribuita principalmente a gruppi solforici (che probabilmente esterificano i polisaccaridi), perché essa, soppressa da metilazione, non viene ripristinata da saponificazione [9]. Inoltre viene ridotta o soppressa da carboidrasi quale il lisozima, e da agenti che attaccano i carboidrati, come il periodato di sodio. Alla metacromasia partecipano anche gruppi carbossilici di proteine, perché essa viene alterata da enzimi proteolitici, quali la tripsina e la pronasi.

Del resto la presenza di proteine e di mucopolisaccaridi è stata recentemente accertata anche nella tunica adulta di molte specie di Ascidie, tra le quali *Ciona* [4].

Resta da accertare se nella tunica larvale di *Ciona* sia presente della cellulosa come in quella adulta. Questa ricerca non ha dato risultati conclusivi, e perciò deve essere ripetuta con altre tecniche. Una differenza tra la tunica larvale e quella dell'adulto è che la prima viene secreta unicamente dall'epitelio ectodermico, mentre alla formazione dell'altra partecipano anche vari tipi di cellule provenienti dal sangue [4, 15]. È stato supposto che la sintesi della cellulosa sia effettuata da un particolare tipo di queste ultime e precisamente dai vanadociti [17].

#### BIBLIOGRAFIA.

- [1] P. BRIEN, « P. Grassé, Traité de Zoologie », XI, 553 (1948).
- [2] M. ISHIKAWA, E. HIRAI & T. NUMAKUNAI, « Bull. Mar. Biol. Stat. Asamushi », II, 183 (1963).
- [3] R. A. CLONEY, « Am. Zoologist », I, 67 (1961).
- [4] J. GODEAUX, « Studium Generale », 17, 167 (1964).

- 
- [5] T. H. HUXLEY, « Ann. Mag. Nat. Hist. » (10), 25, 119 (1852).
- [6] A. BUSSARD, « Techniques de Laboratoire », J. Loiseleur, Réd., I, 843. Masson, Paris (1963).
- [7] T. BARKA & P. ANDERSON, « Histochemistry », Harper & Row Publ., New York (1963).
- [8] N. BECCARI & V. MAZZI, « Manuale di Tecnica Microscopica », S.E.L., Milano (1966).
- [9] L. LISON, « Histochemie et Cytochimie Animales », Gauthier-Villars Ed., Paris (1960).
- [10] G. F. LAIDLAW, « Anat. Rec. », 53, 399 (1932).
- [11] G. LEONARDI, « Rend. Accad. Naz. Lincei » (8) 39, 118 (1965).
- [12] J. F. A. MCMANUS e R. W. MOWRY, « Staining Methods, Histological and Histochemical », Harper & Row Publ., New York (1960).
- [13] P. SCHULZE & G. KUNIKE, « Biol. Zentralbl », 43, 556 (1923).
- [14] M. R. ROLLINS & V. W. TRIPP, « Methods in Carbohydrate Chemistry », R. L. Whistler, Ed., III, 335. Academic Press, New York (1963).
- [15] K. SAINT-HILAIRE, « Zool. Jahrb., Abt. Anat. », 54, 435 (1931).
- [16] J. T. PARK & M. J. JOHNSON, « J. Biol. Chem. », 181, 149 (1949).
- [17] M. KALK, « Acta Embryol. Morphol. Exper. », 6, 289 (1963).