
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

NUNZIA FARINELLA FERRUZZA, GIUSEPPE REVERBERI

**Fusione di uova di ascidie a seguito di trattamento
con «Polyethyleneglycol»**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 64 (1978), n.4, p. 404–408.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1978_8_64_4_404_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. — *Fusione di uova di ascidie a seguito di trattamento con « Polyethyleneglycol »* (*). Nota di NUNZIA FARINELLA FERRUZZA e GIUSEPPE REVERBERI, presentata (**) dal Corrisp. G. REVERBERI.

SUMMARY. — Polyethyleneglycol (PEG m.w. 6000) has been used to induce the fusion of unfertilized eggs of some species of Ascidians (*Ciona intestinalis* and *Ascidia malaca*).

In order to obtain double giant eggs, the eggs taken from the oviducts and freed from the membranes are kept in a PEG solution side by side.

For *Ascidia malaca* the PEG concentration optimum to obtain the fusion is of 3% or 4% for *Ciona intestinalis* of 6% or 10%. According to the physiological condition of the eggs the fusion can take place after 3 or 4 hours, sometimes after 12 hours.

In either case the giant eggs on having completed their fusion, are isolated, put in (pasturized and filtered) sea water, and then fertilized with sperms of the same species.

An almost normal development up to the larva stage only for the giant eggs of *Ascidia malaca* has been observed, whereas for those of *Ciona intestinalis* no development has been observed. This different result is probably due to the chemical agent (PEG) when it is used at a high level of concentration (6% or 10%) on the cytoplasm of the eggs.

From our observations it is possible to conclude that the PEG is a good chemical agent for the fusion of eggs. This has led us to extend its use of interspecific fusion between eggs of different species these such studies are justified by the possibility of further investigations of the complex relationship of nuclear and cytoplasmic interactions and the role that the membranes would have in the mechanism of the cell fusion.

1. In precedenti comunicazioni [3-4], [5, 6, 7, 8] abbiamo riferito che è possibile produrre fusione tra due o più uova di Ascidie, della stessa o di diversa specie, mettendo a contatto uova previamente private delle loro membrane e che hanno soggiornato in acqua di mare pura per alcune ore.

A seguito della fusione le uova, ovviamente, divengono « giganti »; nel caso in cui la fusione avviene tra due uova esse sono diploidi. A seguito di ciò l'uovo gigante emette dopo fecondazione quattro globuli polari e diviene triploide. La fusione può aversi tra uova della stessa specie o tra uova di specie diversa: l'uovo gigante costituito da due uova di specie diversa può venir fecondato dallo spermio dell'una o dell'altra specie; eventualmente anche di specie diversa dai due partners che si sono fusi. Le uova fuse di determinate combinazioni, sono capaci di svilupparsi: dalla combinazione ♀ di *Ascidia malaca* + ♀ di *Ascidia malaca* + ♂ di *Ascidia malaca* si sono avute larve giganti di aspetto normale che hanno persino compiuto la metamorfosi. Risultati ancora più significativi sono stati ottenuti in altri esperimenti: per essi rimandiamo alla bibliografia precedentemente citata.

Negli esperimenti di questo tipo una grave difficoltà è stata incontrata: la fusione avviene raramente ed è del tutto casuale. Di centinaia di coppie di

(*) Lavoro eseguito presso l'Istituto di Zoologia dell'Università di Palermo.

(**) Nella seduta dell'8 aprile 1978.

uova dello stesso animale messe in contatto e nelle stesse condizioni di sviluppo, solo due o tre coppie si fusero integralmente. Le ragioni di questo fatto non sono conosciute. Di fronte a questa situazione, che ha limitato fortemente i nostri esperimenti ci siamo domandati se un risultato migliore non possa aversi adoperando sostanze capaci di produrre modificazioni della membrana plasmatica dell'uovo (tripsina, isolecitina, ecc.): in fondo la fusione che si ottiene dalle uova invecchiate non può essere provocata altro che da una modificazione chimica o fisica in tale membrana.

2. Attualmente conosciamo un sistema molto valido e diverse sostanze chimiche capaci di indurre la fusione di cellule coltivate *in vitro*. Il sistema più adoperato è quello di trattare le cellule con il virus Sendai inattivato; sui risultati ottenuti da noi con questo sistema o con alcune sostanze chimiche riferiremo altrove.

Qui riportiamo esclusivamente i risultati ottenuti con il « polyethylenglycol ».

L'uso di questa sostanza fu introdotto da Ferenezzy [9], Ahkong [1-2], Lau [10]. I nostri esperimenti non ci hanno dato risultati straordinari: il polyethylenglycol a determinate concentrazioni produce bensì fusione di uova ma purtroppo non nella percentuale che avremmo desiderato. In ogni caso il numero delle fusioni è sempre più alto di quello che abbiamo ottenuto col semplice « invecchiamento delle uova ».

MATERIALE E METODO

La ricerca con il polyethylenglycol allo scopo di ottenere la fusione di uova è stata portata su *Ascidia malaca* e *Ciona intestinalis*. Le uova prelevate dagli ovidutti e liberate delle membrane che le avvolgono furono messe in soluzione di P.E.G. in acqua di mare a diverse concentrazioni (dal 2% al 4% per le uova di *A. malaca* e dal 6% al 10% per quelle di *C. intestinalis*), avvicinate due a due, e lasciate in questa situazione fino ad ottenuta fusione. Dopo la fusione completa esse furono riportate in H₂O di mare normale, e fecondate. Per il trattamento fu usato PEG di peso molecolare 6000 a temperatura ambiente.

La ricerca fu preceduta da una breve investigazione, diretta allo scopo di esaminare l'effetto del P.E.G. sullo sviluppo delle uova normali.

RISULTATI

1. Con le uova di *Ascidia malaca* i migliori risultati sono stati ottenuti a concentrazione di PEG al 3%: le uova giganti ottenute a questa concentrazione sono capaci anche di uno sviluppo normale. Il primo dato che si rileva nelle uova « nude » di *A. malaca*, immerse in acqua marina addizionata di

PEG al 3 % e poste a mutuo contatto, è la loro più stretta *adesione*: anche agitando alquanto l'acqua in cui sono collocate, esse non si separano l'una dall'altra. Col trascorrere del tempo la superficie di adesione delle uova si allarga: a termine di questo processo le uova si fondono completamente. Ne deriva da ciò un uovo gigante: se questo deriva da due uova fuse esso porta un patrimonio cromosomico diploide. Se fecondato, l'uovo gigante emette quattro globuli polari e acquista una condizione triploide. Il suo sviluppo ha principio in questa situazione. La percentuale delle uova che, a seguito del trattamento, si fondono in un uovo gigante non è molto alta: per quale ragione alcune uova si fondono e altre no, non è noto: ciò si verifica anche con uova appartenenti allo stesso individuo e situate nelle stesse condizioni ambientali. Abbiamo rilevato precedentemente che ciò si verifica anche con le uova « invecchiate ». La fusione è proporzionale al tempo di soggiorno delle uova nella soluzione di PEG: talvolta essa avviene solo dopo tre-quattro ore, talvolta dopo ventiquattro ore o più. Le uova giganti ottenute dopo breve tempo da loro soggiorno nella soluzione hanno uno sviluppo regolare.

Alla concentrazione di PEG 1 % le uova non solo non si fondono ma neppure aderiscono tra loro: il contatto si dissolve al primo leggero movimento dell'acqua in cui sono poste.

Alla concentrazione 4-6 % di PEG la fusione delle uova si ottiene in percentuale molto alta, anche del 100 %. Questo risultato richiede però un soggiorno prolungato delle uova nella soluzione; ciò ovviamente danneggia le uova le quali, di fatto, se fecondate, non si sviluppano.

2. Le uova di Ciona, a differenza delle uova di *A. malaca* sono assai più restie a fondersi. Esse richiedono almeno una concentrazione di PEG dal 6 al 10 %. In queste condizioni le uova si accollano ma non si fondono: l'accollamento quando interessa un'ampia superficie dell'uovo simula una vera fusione: in realtà i plasmi non si mescolano, tanto è vero che se le due uova intimamente accollate vengono riportate in acqua di mare pura essi si ridistaccano e riprendono la loro individualità. In alcuni casi però anche le uova di Ciona si fondono completamente come le uova di *A. malaca*. Le ragioni che rendono le uova di Ciona più resistenti alla fusione che le uova di *A. malaca* non sono note: evidentemente si tratta di un fenomeno di membrana: ma finché di queste membrane non si conosce la costituzione chimica e fisica non si può che avanzare delle ipotesi.

3. L'uovo gigante risultante dalla fusione di due uova è sempre fecondato da un unico spermio: penetrazione di due spermii, e in genere fenomeni di polispermia, non furono mai osservati: l'uovo gigante è una vera unità. Fecondato esso modifica la forma, allo stesso modo delle uova normali: da sferico diviene piriforme, poi ritorna perfettamente sferico; gli spermii non dimostrano di risentire per nulla dell'azione del PEG.

A 10-15' dalla fecondazione l'uovo gigante, sia di *A. malaca* sia di Ciona, emette due globuli polari: dopo altri 10-15' ne emette altri due. In totale, l'uovo

gigante emette quattro globuli polari. I tempi di emissione dei globuli polari non differiscono da quelli delle uova normali. Anche la prima segmentazione cade contemporaneamente a quella dei controlli.

La segmentazione è normale: si ha una blastula, successivamente una gastrula.

Da uova giganti risultanti dalla fusione di due uova di *A. malaca* si è riusciti ad avere anche delle larve complete e mobili: questo risultato non è stato mai raggiunto invece in Ciona: probabilmente l'alta concentrazione di PEG adoperato per produrre la fusione ha apportato qualche lesione al citoplasma dell'uovo.

DISCUSSIONE

Da quanto è stato esposto risulta che il PEG è capace di produrre la fusione, oltre che di cellule coltivate *in vitro*, anche di uova di Ascidi. Quali siano le modalità in virtù delle quali viene prodotta questa fusione, non è noto; probabilmente l'azione del PEG non deve essere molto diversa da quella prodotta nelle cellule *in vitro*, dal virus Sendai inattivato: l'azione, in altre parole, deve esercitarsi sulle membrane plasmatiche. Purtroppo della costituzione morfologica e biochimica di queste membrane non conosciamo quasi nulla. Che il PEG agisca sui microfilamenti, che devono essere tra l'altro presenti in queste membrane, è probabile: è stato infatti osservato che le uova sottoposte al trattamento perdono la loro elasticità, la loro turgidezza, si accasciano sotto il proprio peso.

La fusione delle uova; sebbene in percentuale minore, si ottiene anche facendo invecchiare le uova in acqua di mare pura: è possibile che il meccanismo della fusione avvenga, nei due casi, per un'azione diversa sulle membrane plasmatiche. Fusione di uova di Ciona per « invecchiamento » non fu mai osservata: ciò può spiegare perché esse richiedono una maggiore concentrazione di PEG (6-10 %) che in *A. malaca*.

La percentuale delle uova di cui si ottiene la fusione sotto l'azione del PEG sebbene non sia molto alta è sempre più alta di quella che si riscontra nelle uova sottoposte all'« invecchiamento ». Per quale motivo le uova di uno stesso individuo, trattate alla stessa concentrazione di PEG, e sottoposte alle stesse condizioni esteriori, non si comportino ugualmente, alcune fondendosi e altre no, non è comprensibile: diverse ipotesi possono essere proposte (stato fisiologico delle uova; punti di attacco sulla membrana plasmatica, ecc.).

Le uova giganti ottenute con il trattamento con PEG hanno uno sviluppo identico a quello delle uova « invecchiate »: se derivano dalla fusione di due partners emettono quattro globuli polari si dividono con ritmo e pattern normali, sono triploidi. L'ulteriore sviluppo (gastrulazione e neurulazione) è anche normale. In *A. malaca* dalle uova giganti possono aversi anche larve: questo risultato non si è mai avuto con Ciona: ciò può dipendere dal fatto che la fusione tra due uova di Ciona può aversi solo a concentrazione di PEG piuttosto alta 10 % e solo con esposizione piuttosto lunga, condizioni che probabilmente sono tossiche.

Concludendo possiamo affermare che anche se il PEG non è l'agente desiderato per avere un'alta percentuale di fusioni, esso tuttavia, è più efficace del metodo dell'«invecchiamento». Esso è efficace anche nel caso in cui le uova di cui si desidera la fusione sono eterospecifiche: costituisce perciò un mezzo utile per lo studio dei rapporti nucleo-citoplasmatici che è appunto l'argomento inteso da queste ricerche.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Q. F. AHKONG, D. FISCHER, W. TAMPION e J. A. LUCY (1975) - «Mechanisms of cell fusion. *Nature*», 253, 194.
- [2] Q. F. AHKONG, J. ISOBEL HOWELL e J. A. LUCY (1975) - *Fusion of erythrocytes with yeast protoplast induced by polyethyleneglycol*, «*Nature*», 255, 66.
- [3] N. FARINELLA FERRUZZA (1965) - *Sullo sviluppo di uova invecchiate nelle Ascidie* «*Acc. Naz. Lincei*», 39, 338-343.
- [4] N. FARINELLA FERRUZZA (1966) - *Fusioni e sviluppo di uova vergini di Ascidia malaca*, «*Acta Medica romana*», 4, 54-57.
- [5] N. FARINELLA FERRUZZA e G. REVERBERI (1969) - *Gigantic larvae of Ascidians from two fused eggs*, «*Acta Embr. Exp.*», 281-290.
- [6] N. FARINELLA FERRUZZA e G. REVERBERI (1969) - *Single giant larvae of Ascidia malaca from double eggs*, «*Experientia*», 25, 651.
- [7] N. FARINELLA FERRUZZA e G. REVERBERI (1972) - *Hybrids from fused gigantic ascidian eggs*, «*Exptl. Cell. Res.*», 75, 503-505.
- [8] N. FARINELLA FERRUZZA e G. REVERBERI (1972) - *On some results obtained from fused eggs in the Ascidians*, «*Acta Embr. Exp.*», 85-91.
- [9] L. FERENEZY, F. KEVEI e M. SZEGEDI (1975) - *High frequency fusion of fungal protoplasts*, «*Exp.*», 31, 50.
- [10] J. LAU e R. BROUN ARRIGHI (1977) - *Induction of premature chromosome condensation in COH cells fused with polyethylene glycol.*, «*Exp. Cell Res.*», 110, 57.