

10. Anna Maria OSTI. — Sull'origine delle cellule follicolari e delle cellule testali dell'uovo delle Ascidie. (1)

Riassunto. — L'origine delle cellule follicolari e delle cellule testali delle uova di Ascidie viene ricercata differenziando gli elementi ovulari con i colori vitali e studiandoli al microscopio a contrasto di fase.

Nelle specie di Ascidie studiate: *Ciona intestinalis*, *Ascidia malaca*, *Phallusia mamillata*, la funzione litica esercitata, secondo alcuni AA., dalle cellule testali sulle membrane coriali, non è stata riscontrata. Le capsule, in queste specie, vengono invece sciolte da sostanze, di probabile natura enzimatica, secrete dalle larve.

Résumé. — L'origine des cellules folliculaires et des cellules appelées « de test » dans les oeufs des ascidies (le nom de cellules « de test » provenant de la supposition erronée qu'elles formaient le « test » ou « testa », c'est-à-dire la tunique de l'animal), est encore en discussion. L'A., observant les gonades et les oeufs isolés de *Ciona intestinalis*, *A. malaca*, *Phallusia mamillata*, sous le microscope à contraste de phase et utilisant la technique des couleurs vitales, a mis en évidence, dans le cytoplasme de l'oocyte à peine différencié, des éléments germinaux, qui traités par la technique des couleurs vitales, prennent la même coloration que les cellules « de test » de l'oeuf mûr.

Le follicule primaire, constitué par des cellules germinales primordiales qui enveloppent extérieurement l'oocyte, se différencie ensuite en follicule extérieur et follicule intérieur.

Dans les espèces d'Ascidies étudiées, la fonction lytique exercée, selon quelques AA., par les cellules « de test » sur les membranes du chorion, n'a pas été constatée. Les capsules, dans ces espèces, au contraire, sont dissoutes par des substances probablement de nature enzymatique, sécrétées par les larves.

Summary. — The origin of the follicle and « testa » cells of eggs of Ascidiae is studied by differential staining with vital stains and observation with the phase contrast microscope.

In the species of Ascidiae studied (*Ciona intestinalis*, *Ascidia malaca*, *Phallusia mamillata*) the observation of certain authors that « testa » cells

(1) Questo lavoro è stato eseguito presso il Centro di Biologia del Consiglio Nazionale delle Ricerche presso la Stazione Zoologica di Napoli, sotto la guida del professore G. Reverberi.

have a lytic action on the chorial membranes has not been confirmed. The capsules in these species are dissolved by substances secreted by the larvae, probably of enzymatic nature.

Zusammenfassung. — Die Entstehung der Follikel — und der Testa-Zellen der Ascidieeneier wird immer noch besprochen. Der Verfasser hat bei der mikroskopischen Betrachtung, bei Phasenkontrast, der mit der Vitalfärbungstechnik behandelten Gonaden und der einzelnen Eier von *Ciona intestinalis*, *A. malaca*, und *Phallusia mamillata*, im Cytoplasma des kaum differenzierten Oocyt, Keimelemente hervorgehoben, die mit den Vitalfarben die gleiche Farbe der Testazellen des reifen Eies annehmen.

Das primäre Follikel, welches aus primordialen Keimzellen gebildet ist, die den Oocyt umhüllen, unterscheidet sich in äusseres und inneres Follikel.

Bei den beobachteten Ascidieengattungen wurde, nach einigen V.V., die von den Testa-Zellen auf die Chorialmembrane ausgeübte lytische Funktion nicht festgestellt. Bei dieser Gattung werden die Kapseln von Substanzen gelöst, die von den Larven abgesondert werden und wahrscheinlich enzymatischer Natur sind.

I. - OGGETTO DELLA RICERCA

L'origine delle cellule follicolari e delle cellule testali de'le uova di ascidie, come pure la questione che riguarda la funzione di queste cellule, sono tuttora controverse e costituiscono un problema degno di ulteriori esperienze e studi. A tale scopo in questa nota sono considerati i seguenti punti:

- 1) l'origine delle cellule follicolari e testali;
- 2) la funzione de'le cellule testali.

II. - CENNI BIBLIOGRAFICI

A) *Gli involucri oviari.*

a) Nell'uovo ovarico.

L'uovo delle Ascidie, prima di staccarsi dalla parete ovarica, è circondato da una membrana follicolare costituita da due foglietti: il primo, più esterno, detto, infatti, follicolo esterno, è costituito da cellule epiteliali appiattite e rimane nell'ovaio dopo la fuoriuscita dell'uovo; il secondo, più interno, riveste l'uovo durante tutto lo sviluppo embrionale, è costituito da grosse cellule riccamente vacuolizzate, ed è denominato follicolo interno. Esso aderisce al corion, che è una membrana priva di struttura e ialina;

comprese tra il corion e l'uovo vi sono, infine, le cellule « testali »: esse furono chiamate in tal modo da C. KUPFFER ⁽¹⁾ perchè questi riteneva che a tali cellule dovesse attribuirsi la formazione della tunica (testa) dell'Ascidia adulta. Sebbene tale supposizione si dimostrasse in seguito errata, fu, tuttavia, conservata ad esse tale denominazione; recentemente J. HUUS ⁽²⁾ propose per esse il nome di « cellule perivitelliniche ».

b) Nell'uovo libero.

Nell'uovo libero, caduto, cioè, nella cavità ovarica per essere convogliato nel gonodotto, troviamo i seguenti involucri: esternamente, quello corrispondente al follicolo interno che intanto si è rigonfiato e si è trasformato in organo di galleggiamento (Schaumschichte); più internamente le cellule testali separate dal follicolo interno dalla membrana del corion.

B) *Origine degli involucri ovulari.*

L'origine degli involucri ovulari e del loro sviluppo durante l'oogenesi è stato oggetto di numerose ricerche e varie interpretazioni da parte dei diversi AA. Tali studi sono riferiti nei lavori di M. FLODERUS ⁽³⁾ J. SCHAXEL ⁽⁴⁾ e W. WERNICKE ⁽⁵⁾: una visione generale critica nelle varie specie di Ascidie è riportata nel lavoro di Wernicke e nella monografia di HUUS ⁽²⁾.

Ricercatori antichi avevano attribuito alle cellule testali una origine intra-ovulare o nucleare; sino al 1900 circa, la maggior parte degli Autori era d'accordo nei seguenti dati: a) origine delle uova e dell'epitelio follicolare primario dall'epitelio germinale indifferenziato; b) origine delle cellule testali dall'epitelio follicolare primario: esse passerebbero nel citoplasma periferico dell'uovo poi si differenzierebbero; c) distinzione del follicolo primario in follicolo esterno e follicolo interno. (A. KOWALESKI ⁽⁶⁾, E. VAN BENEDEN e CH. JULIN ⁽⁷⁾, T. H. MORGAN ⁽⁸⁾, F. W. BRANCROFT ⁽⁹⁾).

L'ipotesi che l'epitelio follicolare abbia origine da cellule mesenchimatiche fu avanzata per la prima volta da O. SEELIGER ⁽¹⁰⁾: le cellule testali, in questa ipotesi, avrebbero anch'esse un'origine mesenchimale. Tale ipotesi è stata recentemente sostenuta da J. SPEK ⁽¹¹⁾ e da N. KNABEN ⁽¹²⁾. Spek credette di dover ravvisare le cellule testali e follicolari nelle « Tropfenzellen », cellule ameboidi di origine mesenchimale: queste per migrazione si porterebbero nel tessuto germinale. Esse prendono il loro nome da una grossa goccia citoplasmatica che si colora con i colori vitali; sono molto abbondanti nella tunica, ma si possono trovare anche nel connettivo e nel sangue.

Anche Knaben considerò come possibile l'origine mesenchimale delle cellule follicolari e delle cellule testali. Le cellule mesenchimatiche si disseminerebbero secondo questo Autore intorno all'uovo per movimenti ameboidi, e quivi si moltiplicherebbero, probabilmente per mitosi.

E. RIES ⁽¹³⁾ considera tale supposizione errata. Per J. H. TUCKER ⁽¹⁴⁾ le membrane dell'uovo derivano dalle cellule follicolari primordiali dell'epitelio germinale. Egli nega alle figure su cui Spek appoggia la sua tesi un valore dimostrativo e, basandosi sul fatto che Spek non menziona un follicolo esterno e conseguentemente l'esistenza del penducolo follicolare, suppone che tale A. abbia esaminato uova già staccate dall'epitelio germinale ed esterne all'a cavità ovarica; anche Knaben, non avrebbe veduto il follicolo esterno: di fatto egli non accenna al modo con cui le uova sarebbero collegate all'ovaio. Il Tucker, nella *Styela plicata*, ha osservato delle mitosi nelle cellule del follicolo primario: in conseguenza di tali mitosi prende origine l'epitelio follicolare esterno e l'epitelio follicolare interno. Da quest'ultimo, per ulteriore divisione mitotica ad angolo retto rispetto alla superficie dell'uovo, si differenziano le cellule testali che non formano mai, nella *Styela*, uno strato completo ma giacciono isolate in addentellamenti del citoplasma ovulare.

Secondo P. BRIEN ⁽¹⁵⁾ dalla membrana del follicolo primitivo derivano per delaminazione, due membrane, quella più interna le cui cellule spingendosi contro il citoplasma ovulare vi si incrostanto alquanto e si differenziano in cellule testali e quella più esterna, formata dalle cellule follicolari secondarie. I due strati di cellule sono separati dalla membrana anista del corion. Nel momento in cui l'uovo arriva a maturità, l'epitelio follicolare secondario si suddivide in due nuove stratificazioni: il follicolo esterno che rimane nell'ovaio e la membrana di cellule galleggianti che accompagna l'uovo libero.

C) *Differenziamento degli involucri ovarici.*

Durante lo sviluppo dell'uovo le cellule follicolari diventano papillate e formano le cellule galleggianti: a tale scopo esse si vacuolizzano: all'estremità della cellula si nota un vacuolo più grande: fra i vacuoli, sottili filamenti citoplasmatici formano una rete che porta granuli dispersi. Le cellule testali non mostrano, durante lo sviluppo dell'uovo, cambiamenti strutturali, ma solo di volume; esse aumentano in grandezza poche ore dopo la fecondazione (Brien e Knaben); durante l'embrionogenesi, si atrofizzano progressivamente e rimangono nella capsula follicolare dopo la fuoriuscita della larva.

D) *Funzione delle cellule follicolari e delle cellule testali.*

a) Teorie della protezione meccanica.

Sul significato fisiologico delle cellule testali i vari AA. hanno emesso teorie diverse. Per H. FOL ⁽¹⁶⁾ ed altri ricercatori le cellule testali e quelle follicolari non eserciterebbero che una semplice azione protettiva sulla cellula uovo.

MORGAN (17) in *Ciona intestinalis*, vide che, allontanando la membrana coriale si può avere l'auto fecondazione: la rimozione della membrana permette anche la fecondazione delle uova con sperma eterogeno di altre specie di Ascidie, (G. REVERBERI (18); e poichè secondo Morgan l'allontanamento delle cellule follicolari non è sufficiente a permettere la penetrazione dello sperma dello stesso individuo nell'uovo, deve dedursi che le cellule testali, o per se stesse, o a mezzo di una sostanza da esse secreta, devono essere la causa della impedita autofecondazione.

b) Teorie fisiologiche.

C. KUPFFER (1) e H. MILNE EDWARDS (19) avevano, invece, attribuito ad esse la facoltà di formare la tunica degli individui adulti. E. ZAVATTARI (20) precisò che il glicogeno, da tali cellule abbondantemente posseduto, attraverso una serie di scomposizioni e di composizioni chimiche, si trasforma nella tunicina; da questa, poi, deriverebbe la tunica. Per M. DAVIDOFF (21), O. SEELIGER (10), K. HEIDER (22), ed altri, le cellule testali esplicano, invece, una funzione nutritizia per i blastomeri dell'uovo; per BRANCROFT (9) e WERNICKE (5) le cellule testali versano nell'uovo le sostanze avute dall'esterno: anche Spek attribuisce alle sue « Tropfenzellen », che contengono una grande quantità di albumina, proprietà nutritive. Per P. BRIEN e BRIEN-GAVAGE (23) le « Tropfenzellen » di Spek partecipano, per il loro contenuto di glicoproteine, al metabolismo glicogenetico proprio ad ogni ontogenesi. Per C. BIGNARDI (24) i granuli gialli delle cellule testacee di *Ciona intestinalis* sono costituiti, in tutto ed in parte, da sostanza in cui si rinvengono funzioni fenoliche libere.

G. PAULETTA (25) comparando fra di loro i vari stadii di maturazione delle uova di *Ciona intestinalis* e *Phallusia extensa* trova per ogni stadio condizioni diverse con cui si presentano le sostanze fenoliche, i lipidi, i polisaccaridi e gli esteri solforici dei polisaccaridi.

KONOPAKI (26) considera le cellule follicolari e le cellule testali della *Clavelina lepadiformis* come un insieme fisiologico: le cellule follicolari ritengono i grassi e il glicogeno del sangue che trasmetterebbero all'oocite. I protidi semplici che l'epitelio follicolare lascia passare verso le cellule testali subiscono qui una prima tappa di sintesi in vista dell'elaborazione dell'acido timonucleico e dei nucleoprotidi che, dopo una successiva degradazione, passano nell'oocite allo stato di combinazione più semplice. L'oocite a partire da tutti questi costituenti, forma il vitello propriamente detto, come lipoproteide, mentre il glicogeno si accumula allo stato puro attorno ai globuli vitellini.

c) Teorie enzimatiche.

Knaben nelle esperienze sulla *Corella parallelogramma*, ritenendo la membrana coriale come troppo resistente perchè la larva se ne possa liberare con le sole contrazioni muscolari, pensò che le cellule testali svolgessero un'azione litica; a questa azione egli attribuisce il diminuito volume delle cellule testali quindici ore dopo la fecondazione. Knaben impiantò le esperienze nel seguente modo: dopo 15 ore dall'a fecondazione, isolò le cellule testali: messe queste a contatto con uova vergini notò dopo 22 ore il distacco delle cellule follicolari dal corion e vide che questo stesso diventava molto fragile e sensibile agli aghi di vetro.

N. J. BERRILL (27) invece attribuisce la funzione litica delle membrane non alle cellule testali, ma all'embrione: di fatto egli osservò che le uova vergini, messe nell'acqua in cui si erano sviluppate delle larve, sia della stessa specie che di specie diversa, dopo un periodo di tempo variabile, perdevano le capsule.

III. - MATERIALE E TECNICA

Come materiale mi sono servita delle gonadi e delle uova dei seguenti tipi di Ascidie:

Ciona intestinalis,
Ascidia malaca,
Ascidia mentula,
Phallusia mamillata.

Queste ricerche furono eseguite nel periodo che va da maggio a novembre, durante il mio soggiorno alla Stazione Zoologica di Napoli presso il Centro di Biologia del C.N.R.

L'esame del materiale in vivo fu eseguito:

1) applicando la tecnica dei colori vitali, (cfr. J. SPEK (28), GERSCH e E. RIES (29), sulle uova di *Clavelina lepadiformis*, *Ciona intestinalis* e *Phallusia mamillata*.)

I colori vitali più usati furono: il rosso neutro, il cloridrato di bleu Nilo, il bleu toluidina, il bleu brillante di cresile, ed il verde Giano.

Le uova di *Ciona intestinalis*, *A. malaca*, *A. Mentula*, e *Phallusia mamillata* venivano prelevate direttamente dai gonodotti. Esse reagiscono ad uno stesso colorante vitale in maniera molto simile: l'unica differenza che si può riscontrare è data dall'intensità della colorazione: il tono di colore è lo stesso per tutti questi tipi di ascidie. Le uova da colorare erano messe in saliere di vetro contenenti acqua di mare a cui si aggiungeva una goccia di soluzione all'1% in acqua distillata di uno dei colori vitali citati.

2) Mediante il microscopio a contrasto di fase.

IV. - OSSERVAZIONI CON I COLORI VITALI

A. *Sulle uova mature.*

Col rosso neutro il plasma delle cellule follicolari si colora in arancione, il nucleo in rosso ruggine; le cellule testali in rosso ciliegia; la cellula uovo si colora invece con molta difficoltà e solo dopo lungo soggiorno nel colorante.

Il bleu brillante di cresile: colora il plasma delle cellule follicolari in lilla ed il loro nucleo in viola scuro, le cellule testali in azzurro-verde e la cellula uovo in celeste pallido.

Col verde Giano: le cellule follicolari si colorano in lilla rosa, il loro nucleo in verde scuro, le cellule testali in verde scuro ed il citoplasma della cellula uovo in verde pallido, ma il colore viene assorbito molto irregolarmente.

Col bleu di toluidina: le cellule follicolari assumono colorazione lilla-rosa ed il loro nucleo bleu-scuro; le cellule testali si colorano in turchese brillante e l'uovo in celeste pallido. (Vedi Gersch und RIES (29) fig. 4 pag. 183).

Col cloridrato di bleu Nilo: le cellule follicolari si colorano in rosa ed il loro nucleo in azzurro, le cellule testali in azzurro, la cellula uovo assume una leggera tinta cilestrina.

Quando la colorazione si prolunga le cellule follicolari assumono un tono più intenso di colore per la sostanza che si è accumulata nei loro alveoli; nel nucleo delle cellule follicolari si notano formazioni colorate che spiccano nel succo cellulare più chiaro; i granuli delle cellule testali si gonfiano e si ammassano e si ha una colorazione mista.

Queste differenze nell'assunzione dei colori vitali da parte delle cellule follicolari e delle cellule testali sono dovute al fatto che, mentre le cellule follicolari hanno una reazione alcalina, le cellule testali, specialmente nei loro granuli, hanno una reazione acida.

B. *Sulle uova ovariche.*

Per le uova ovariche fu seguito questo procedimento: frammenti di ovaio di Ciona e di A. malaca venivano messi a lungo nei colori vitali, soprattutto nel bleu di toluidina. Nella gonade sono presenti oociti in tutti gli stadi di maturazione: naturalmente quelli che protrudono maggiormente sono quelli in fase di maturazione già avanzata, e che sono circondati dall'epitelio follicolare esterno, quello che alla fuoruscita dell'uovo rimarrà nell'ovaio. Fra questo e il corion, sono le cellule follicolari che formano un rivestimento costituito, a questo stadio, da cellule a forma quadrangolare, con i due lati leggermente rigonfi rispetto alle basi; ogni cellula giace

ordinariamente accanto all'altra, possiede un citoplasma completamente vacuolizzato che si colora in lilla-rosato col bleu di toluidina, con granuli cromatici fra un vacuolo e l'altro, e un nucleo cospicuo colorato in viola scuro.

Nel piano focale sottostante sono ben visibili le cellule testali per la loro colorazione verde-turchese. Esse appaiono come corpi ovoidali di volume molto più piccolo rispetto a quello delle cellule follicolari; il corpo cellulare è occupato da un grosso vacuolo incolore che è parzialmente circondato da altri vacuoli più piccoli colorati intensamente e che danno all'intera cellula testale un riflesso turchese.

V. - OSSERVAZIONI CON IL MICROSCOPIO A CONTRASTO DI FASE

Al microscopio a contrasto di fase l'oocito, che si è differenziato dal suo substrato, appare circondato da altre cellule germinali indifferenziate: (Fig. 1) esse costituiscono il follicolo primario. (Fig. 2). Col bleu di toluidina, i due vacuoli di queste cellule si colorano, il più grande in viola scuro, l'altro, il più piccolo, in bleu. La reazione di queste cellule è dunque quella tipica delle cellule follicolari dell'uovo maturo. Nel citoplasma ovulare, attorno al nucleo, si trovano delle cellule che assumono con il bleu di toluidina, la colorazione azzurro-verdastra propria delle cellule testali (Fig. 1, 2, 3). Il loro corpo cellulare è molto vacuolizzato, con un vacuolo più grosso, eccentrico, incolore e con numerosi altri piccoli vacuoli colorati in verde-azzurro dal bleu di toluidina; una membrana cellulare non è chiaramente visibile. (Fig. 4). Nell'uovo in uno stadio ulteriore di sviluppo il follicolo primario circonda completamente il giovane oocito: esso si differenzia poi in membrana del follicolo esterno ed in epitelio follicolare interno. Il follicolo esterno costituisce una membrana trasparente e sottile, e per mezzo del peduncolo follicolare, si collega alla superficie ovarica; aumentando il volume della cellula uovo il peduncolo diviene più sottile. Le cellule del follicolo interno si rigonfiano notevolmente ed il grosso vacuolo si frammenta in vacuoli più piccoli, ma tutti uguali; il plasma è uniformemente colorato in lilla chiaro: i vacuoli occupano tutto il corpo cellulare: fra di essi si distingue per la sua reazione acida al bleu di toluidina, il nucleo. (Fig. 5-6).

Le cellule indifferenziate poste all'interno del citoplasma sono intanto aumentate rapidamente di numero. Esse si portano alla superficie dell'uovo e si dispongono in addentellamenti del citoplasma; il loro protoplasma si vacuolizza come quello delle cellule follicolari, ma mentre in queste ultime i vacuoli sono tutti uguali di grossezza, in queste cellule, che si riconoscono ormai come le tipiche testali, ve n'è uno più grosso incolore, e altri più

piccoli periferici (fig. 6). Nelle gonadi trattate col bleu di toluidina questi vacuoli, che sono colorati in verde-pallido danno all'intera cellula un riflesso turchese.

Tra le cellule dell'epitelio follicolare interno e le cellule testali compare intanto il corion.

A. - Il differenziamento.

a) delle cellule follicolari.

Mentre l'uovo aumenta in volume e sporge sempre più nella cavità ovarica e il penduncolo follicolare si allunga, le cellule follicolari si gonfiano. Al momento in cui l'uovo, arrivato a maturità, viene espulso, il follicolo interno forma la membrana periferica o membrana galleggiante (Schaum-schichte). Le cellule follicolari, non più costrette dalla membrana esterna, assumono il loro definitivo aspetto, papillate nella *A. mentula* e nella *Ciona intestinalis*, rotonde nell'*A. malaca* e nella *Phallusia mamillata* (fig. 7).

b) delle cellule testali.

Questa distensione delle cellule follicolari provoca un sollevamento della membrana coriale dal citoplasma ovulare; si forma così lo spazio perivitellino in cui si dispongono le cellule testali che giacevano sulla superficie dell'uovo. Una volta che l'uovo sia fecondato, le cellule testali ritornano ad adagiarsi sulla membrana dell'uovo in divisione (fig. 8 e 9).

Non ho mai potuto osservare la migrazione delle cellule testali nella zona perivitellina davanti alla semiluna gialla come ha descritto Conklin nella *Cynthia partita* (30).

VI. LE FUNZIONE DELLE CELLULE.

a) follicolari.

Tutti gli AA. sono d'accordo nell'attribuire alle cellule follicolari la funzione di proteggere la cellula uovo e quella di farla galleggiare.

b) testali.

Costituisce, come abbiamo già visto, un problema insoluto per gli studiosi. Rifacendomi alle esperienze del Knaben, isolai le cellule testali di circa 100 neurole (in *A. malaca*) e le misi intorno a 10 uova vergini. Dopo 10 ore, non notai, nelle uova vergini, così trattate, nessuna modificazione delle membrane; ciò era vero anche dopo 24 e 32 ore: le cellule follicolari rimanevano sempre aderenti alla membrana del corion, e la membrana coriale presentava sempre una forte resistenza agli aghi metallici.

Ripetei allora le prove sperimentali di Berrill, ma, a differenza di Berrill che metteva le uova vergini in acqua in cui si erano sviluppate, fino

a larva, altre uova rivestite dei loro involucri ovulari, io posi le uova vergini nell'acqua in cui si erano sviluppate larve di *Ciona* private con gli aghi, subito dopo la fecondazione, della loro membrana. Questa variante sperimentale avrebbe permesso di verificare se corrispondesse a verità più la teoria di Berrill o quella di Knaben.

Il risultato che ottenni fu il seguente: la membrana coriale delle uova vergini era completamente scomparsa; in pochissimi casi in cui la membrana era rimasta attorno alle uova, le cellule follicolari erano completamente cadute e la membrana era diventata più lassa.

Tale risultato confermerebbe dunque l'ipotesi di Berrill. Comparando l'azione di questa acqua contenente i principi litici delle membrane ovulari, sulle diverse specie di Ascidie notai che la membrana dell'e uova di *Ciona* è quella che è più sensibile. Le uova di *Ciona* perdono per lisi la loro membrana anche se poste in acqua in cui si sono sviluppate uova nude di *A. malaca* e di *Phallusia mamillata*: la reazione cioè non è specifica. Le capsule di *A. malaca*, invece, non vengono disciolte nè dall'acqua in cui si siano sviluppate larve di *A. malaca* stessa, nè da quella in cui si siano sviluppate larve di *Phallusia* o di *Ciona*.

Riguardo alle uova vergini di *Phallusia*, invece, la loro membrana si modifica e si altera più o meno a seconda del soggiorno più o meno lungo nell'acqua in cui si siano sviluppate le larve o di *Phallusia* o di *A. malaca* o di *Ciona*.

Da queste esperienze possiamo concludere: o che non tutte le larve di *A.* posseggono enzimi della stessa potenza litica, o che le membrane coriali delle diverse specie di Ascidie hanno una composizione chimica e strutturale diversa.

Riepilogando queste esperienze, abbiamo:

- | | |
|---|--|
| a) Uova vergini di <i>C. intestinalis</i> in acqua in cui si siano sviluppate larve di <i>C. intestinalis</i> , <i>A. malaca</i> , <i>Ph. mamillata</i> . | Perdono le cellule follicolari, il corion si scioglie e le cellule testali cadono al fondo della capsula. |
| b) Uova vergini di <i>A. malaca</i> in acqua in cui si siano sviluppate larve di <i>A. malaca</i> , <i>C. intestinalis</i> , <i>Ph. mamillata</i> . | Il corion è intatto con le cellule follicolari che vi aderiscono. |
| c) Uova vergini di <i>Ph. mamillata</i> in acqua in cui si siano sviluppate larve di <i>Ph. mamillata</i> , <i>C. intestinalis</i> , <i>A. malaca</i> . | Il corion è rigonfio, più fragile, molte cellule follicolari sono cadute, in qualche caso la membrana coriale è sciolta. |

VII. - DISCUSSIONE

Queste osservazioni, sulle origini delle cellule follicolari e delle cellule testali, furono condotte tutte su materiale vivente. Esse si basano, quasi esclusivamente, sulla diversa reazione delle singole cellule ai colori vitali. Sulla maniera con cui le cellule follicolari e testali si riproducono, io non posso riferire non essendomi servita per i miei studi di materiale fissato. Tucker, nei giovani follicoli di un'ovaia sezionata, vide delle forme mitotiche con i lunghi assi paralleli alla superficie dell'uovo e, dal compimento di queste mitosi, dedusse l'aumento del numero delle cellule follicolari.

Sull'asserzione di Speck e di Knaben circa la natura di tipo ameloide delle cellule follicolari e testali, rimando al lavoro di Turcker che molto estesamente ne discute; dirò solamente che io non ho mai visto movimenti ameboidi di queste cellule sulla superficie del giovane oocite e che concordo pienamente con le conclusioni di Tucker.

Anche la migrazione delle cellule testali nello spazio perivitellino davanti alla semiluna gialla che E. G. CONKLIN ⁽³⁰⁾ riscontrò nelle uova di *Cynthia* partita 5 minuti dopo la fecondazione non fu riscontrata nelle uova delle *Ascidie* da me studiate.

P. Brien descrive la formazione del follicolo esterno solamente nell'uovo arrivato a maturità, mentre, tanto col microscopio a contrasto di fase quanto col microscopio comune, la membrana è ben visibile negli oociti nei primissimi stadi, quando le cellule del follicolo interno non hanno ancora assunto il loro aspetto rigonfio e non hanno ancora rivestito completamente la superficie dell'uovo. Lo stesso A. afferma che le cellule testali diventano ameboidi una volta che si trovino nel liquido perivitellino; io non ho mai scorto alcuna cellula testale muoversi indipendentemente dalle altre e tanto meno vi ho visto emissioni di pseudopodi; tutti i movimenti che le cellule testali possono effettuare nello spazio perivitellino, sono assolutamente passivi e dipendono da pressioni non equilibrate che agenti, esterni all'uovo, esercitano sul mezzo a questo circostante.

Le esperienze da me condotte sulle uova *Ciona intestinalis*, *A. malaca*, *Phallusia mamillata*, hanno dimostrato che in queste specie di ascidie le cellule testali non esplicano alcuna azione litica sulla membrana coriale, come Knaben suppone nelle sue ricerche sulla *Corella parallelogramma*. Tenuto conto delle modificazioni del volume delle cellule testali che si riscontrano durante i vari stadi di sviluppo dell'uovo, e delle posizioni diverse che queste assumono rispetto all'uovo, credo che la funzione delle cellule testali debba piuttosto considerarsi come una funzione nutritiva per la cellula uovo secondo i criteri di Konopacki e degli altri autori che ne hanno studiato la natura chimico-fisiologica.

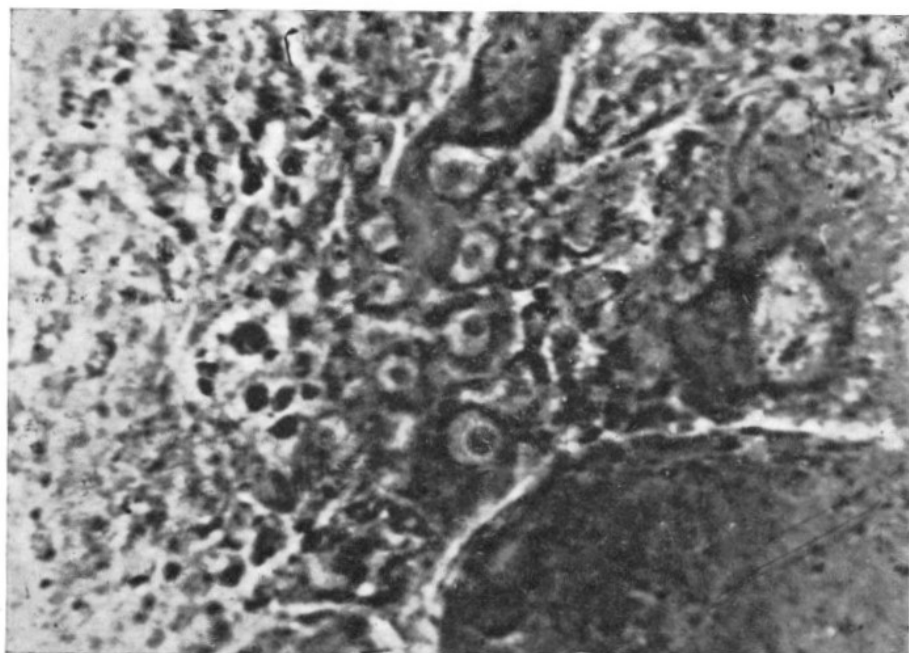


Fig. 1 - Gonadi di *Ciona intestinalis*.

Oociti appena differenziati dal substrato germinale. Sono visibili alcune cellule dell'epitelio germinale indifferenziato. Alcune cellule si dispongono attorno all'oocite per formare l'epitelio follicolare primario.

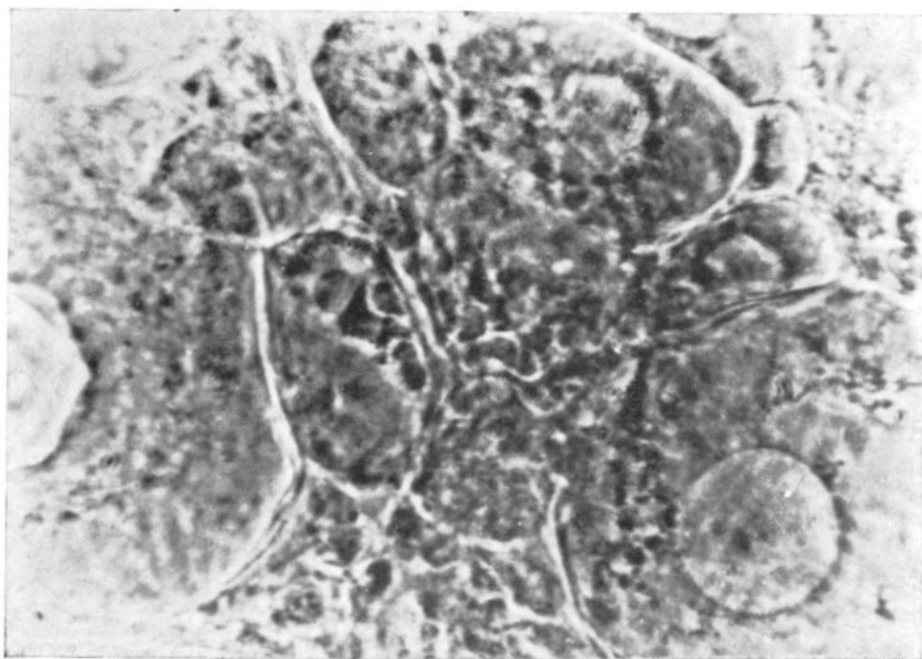


Fig. 2 - Gonadi di *Ciona intestinalis*.

Oociti in vari stadi di sviluppo. Il follicolo primario si è differenziato nei follicoli esterno ed interno. Il follicolo interno non ha ancora formato uno strato continuo di cellule attorno all'uovo; nel citoplasma le cellule testali attorno al nucleo.

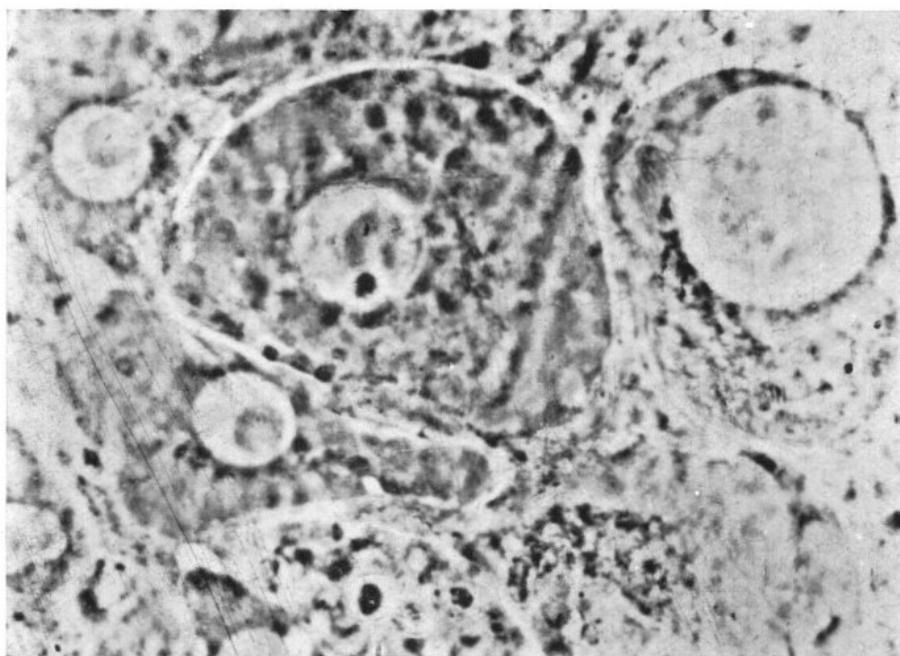


Fig. 3 - Gonadi di *Ciona intestinalis*.

Oociti in vari stadi di sviluppo. Il follicolo primario si è differenziato nei follicoli esterno ed interno. Il follicolo interno non ha ancora formato uno strato continuo di cellule attorno all'uovo; nel citoplasma le cellule testali intorno al nucleo.

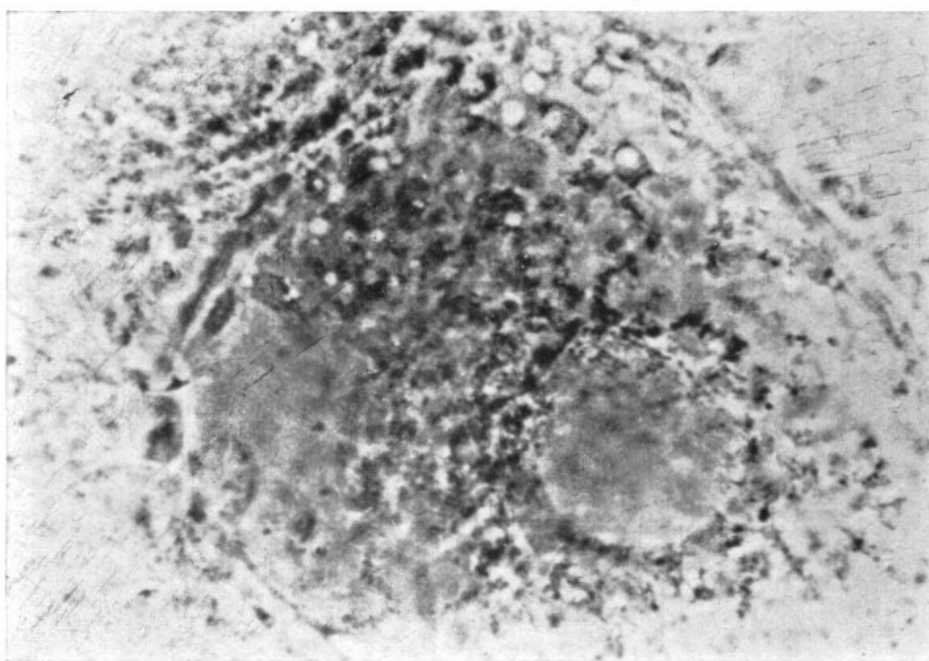


Fig. 4 - Gonadi di *Ciona intestinalis*.

Il follicolo interno ha formato uno strato continuo attorno all'oocita. Cellule testali in cui si distingue un grosso vacuolo, eccentrico ed incolore e numerosi vacuoli cromatinici, che si dispongono alla periferia della cellula uovo, nel piano sottostante alle cellule follicolari.

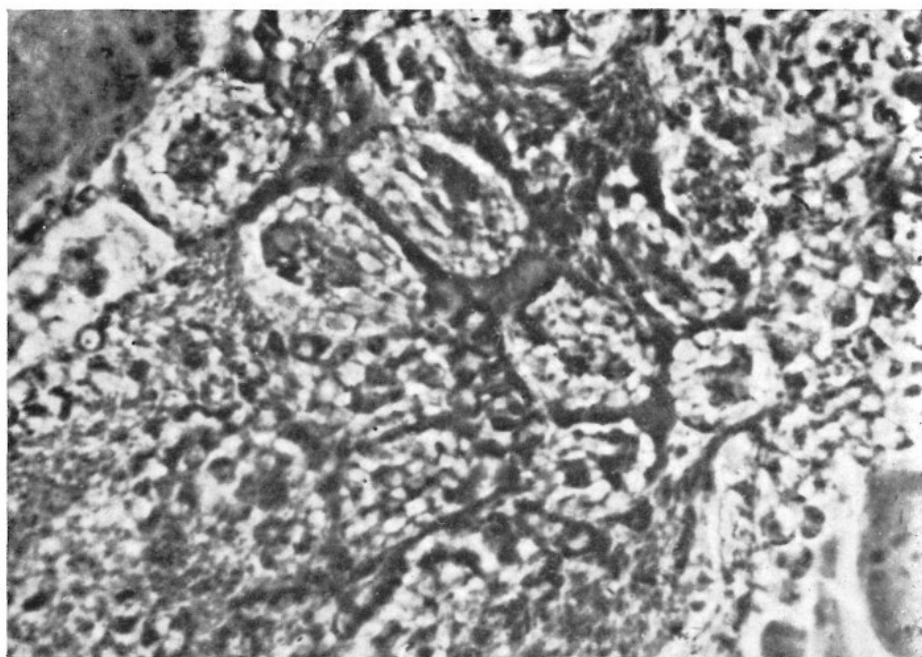


Fig. 5

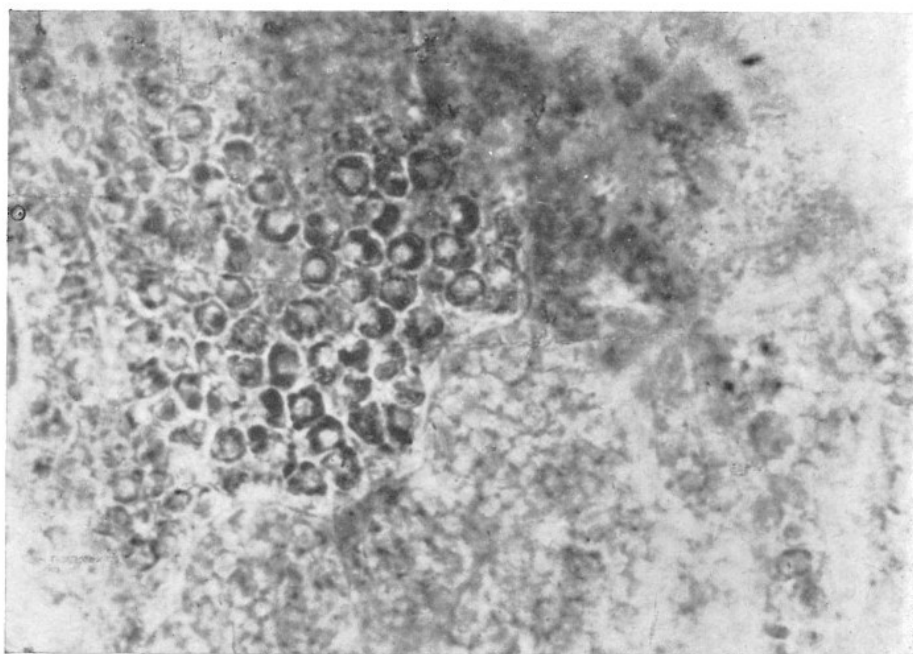


Fig. 6

Figg. 5 - 6 - Gonade di *Ciona intestinalis*.

Le cellule del follicolo interno si sono rigonfiate ed il loro citoplasma è costituito da numerosi vacuoli fra cui è bene identificabile il nucleo più grosso e più scuro. Fra le cellule follicolari, le cellule testali ormai completamente differenziate.

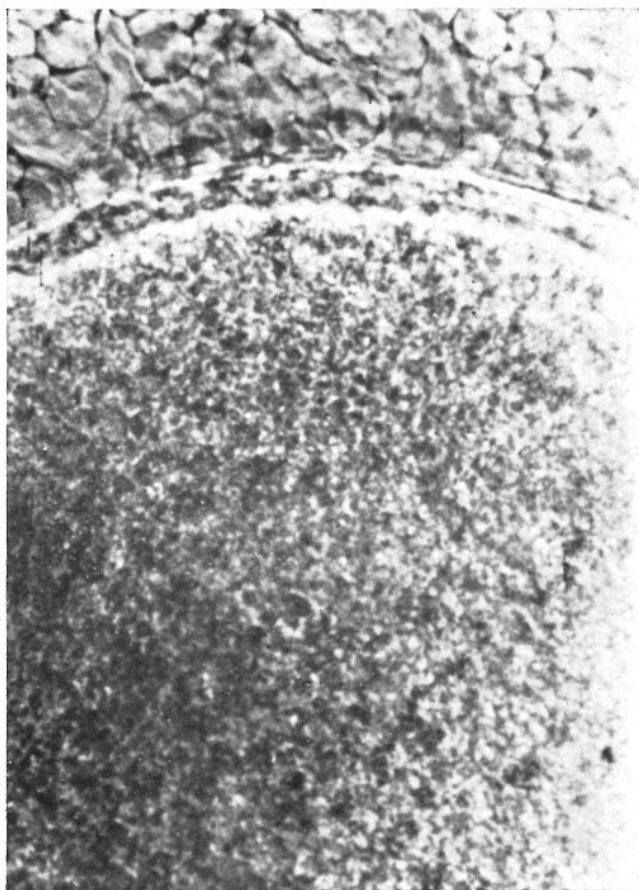


Fig. 7 - Uovo maturo prelevato dal gonodotto.

Sul citoplasma ovulare, separate da questo e dal corion, le cellule testali che formano un epitelio continuo.

Sono visibili le cellule follicolari nella loro parte più prossima all'uovo.

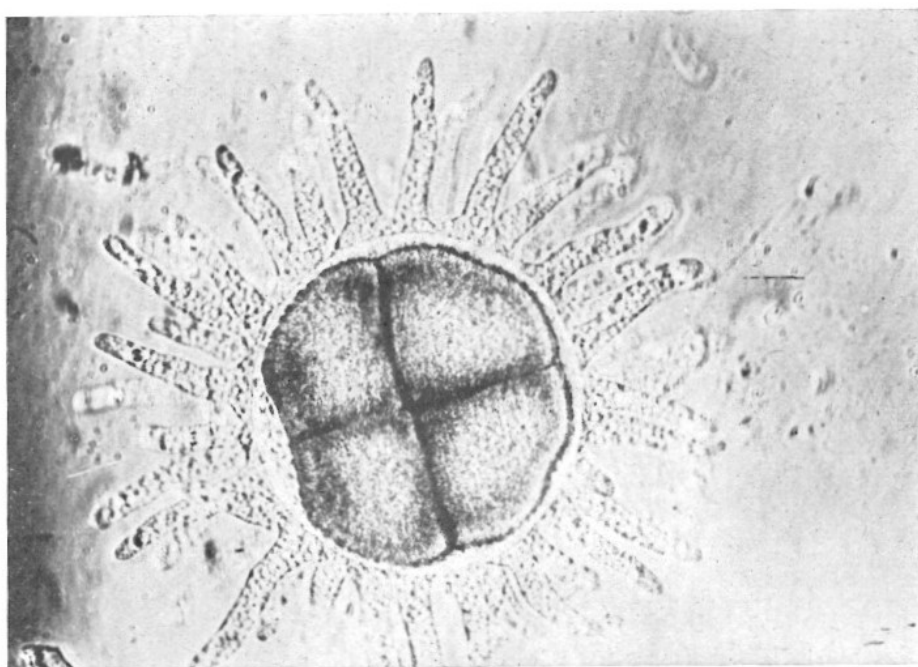


Fig. 8 - Uovo allo stadio di 8 blastomeri.
Le cellule testali sono aderenti alla superficie dell'uovo in divisione.

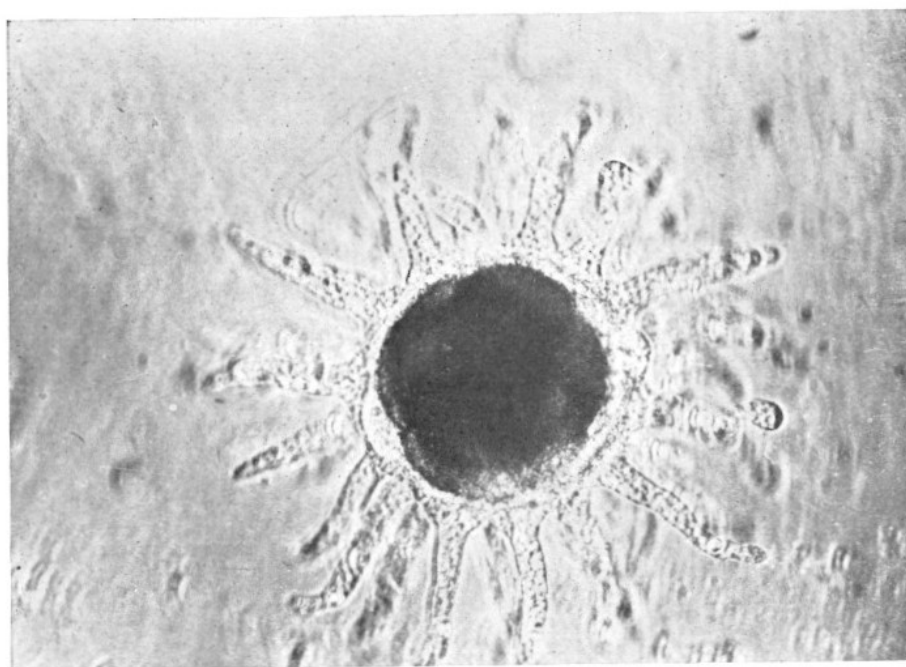


Fig. 9 - Uovo allo stadio di 32 blastomeri.

VIII. - CONCLUSIONI

a) L'oocita appena si è differenziato dal suo substrato, viene circondato dalle cellule germinali indifferenziate che costituiranno il follicolo primario; queste cellule oltre al giovane oocita comprendono nel loro movimento di accerchiamento anche altre cellule indifferenziate che assumono col bleu di toluidina la stessa colorazione che nell'uovo maturo hanno le cellule testali.

Le cellule testali giacciono dapprima attorno al nucleo, nel citoplasma ovulare, successivamente se ne allontanano e si dispongono alla periferia della cellula uovo, in addentellamenti della membrana nel citoplasma ovulare.

b) Il follicolo primario si differenzia in follicolo esterno e follicolo interno. Quando le cellule follicolari e le cellule testali sono completamente sviluppate ed hanno ricoperto la superficie dell'uovo, si forma fra di esse la membrana del corion, secreta, secondo Tucker e Knaben, dalle cellule follicolari.

c) Una volta che l'uovo maturo è caduto nella cavità ovarica, le cellule testali si staccano dalla superficie ovulare sui cui hanno migrato dall'interno dell'uovo e le cellule follicolari, liberate dal follicolo esterno, che è rimasto nell'ovaio, si estendono in lunghezza e larghezza fino ad assumere il loro aspetto definitivo. Quando l'uovo è stato fecondato le cellule testali tornano ad adagiarsi sulla superficie dell'uovo, e qui rimangono durante tutto lo sviluppo embrionale.

Roma, Istituto Superiore di Sanità, Laboratorio di Biologia 27-6-1949.

BIBLIOGRAFIA

- (1) C. Arch. mikrosk. Anat., 6, p. 115 bis 172, (1870).
- (2) Kükenthal u. Krumbach. Handbuch der Zoologie, Berlino e Lipsia, 2, p. 542 (1937).
- (3) Z. Wiss. Zool., 61, 163 (1896).
- (4) Arch. Zellforschung, 4, 265 (1910).
- (5) Zool. Jahrb. Abt. Anat. u. Ontog. d. Tiere, 41, 113 (1920).
- (6) Arch. mikrosk. Anat., 7, 101 (1871).
- (7) Arch. Biol., 6, 237, (1887).
- (8) Jour. Morph., 4, 195 (1891).
- (9) Bull. Mus. Comp. Zool., 35, 57, (1899-1900).
- (10) Broons Klasse. u. Ordnung des Tierreiches, 3, 1893, 1907, fortgesetzt von R. Hertmeyer (1911).
- (11) Roux, Arch. Entw. mech., 3, 119 (1927).
- (12) Bergens. Mus. Aarb., 1, 1 (1936).
- (13) Roux. Arch. Entw. mech., 137, 363 (1937-1938).

- (14) Jour. of Morph., 70, 69 (1942).
 - (15) PIERRE, P. GRASSÉ, *Traité de Zoologie*, 11, 663, Paris (1948).
 - (16) C. R. Acad. Sc. de Paris, 96, 1069 (1883).
 - (17) Proc. Nat. Ak. Sci., 9, 170 (1923).
 - (18) Atti R. Acc. Naz. Lincei, 17, 737 (1933); Pubbl. Staz. Zool. Napoli, 15, 175 (1935).
 - (19) Mém. Acad. Sc. Inst. France, 1, XVIII, 217 (1842).
 - (20) Arch. Fisiol., 20, V, 325 (1922).
 - (21) Mitth. Zool. Stat. Neapel., 9, 113 (1889, 1891).
 - (22) S.B. Ges. Naturf. Freunde, Berlin (1893).
 - (23) Ann. Soc. roy. Belg., 61, (1930).
 - (24) Pubbl. Staz. Zool. Napoli, 15, 194 (1935).
 - (25) Arch. It. Anat. Embr., 47, 659 (1942).
 - (26) C.R. Soc. Biol., 122, XVI, 139 (1936).
 - (27) Phyl. Trans. Roy. Soc. London, 218 (1929).
 - (28) a) Protoplasma, 21, 561 (1934).
b) Protoplasma, 31, 612 (1938).
c) Koll. Zeitschr. 85, Het 2/3, 162 (1948).
 - (29) Roux Arch., 136, 169, (1937).
 - (30) Jour. Akad. N. Sci. Philadelphia, 13, 727 (1906)
-