

Contributo all' istologia e alla fisiologia dei Lamellibranchi.

Di

Dav. Carazzi

in Firenze.

1. Ricerche sulle ostriche verdi.

Con la tavola 18.

1. Introduzione e bibliografia.

Come si vedrà più avanti, le nostre cognizioni sulla causa e sulla sede della colorazione verde nelle ostriche di Marennes sono finora tutt'altro che precise. È inutile ch' io riferisca qui le opinioni dei diversi osservatori precedenti al 1880, perchè esse possono esser lette nei sunti storici premessi alla nota del PUYSEGUR e alla memoria del LANKESTER, lavori conosciuti e citati comunemente.

Del PUYSEGUR (80) non varrebbe la pena di parlare se non avesse avuto l'immeritata fortuna di esser creduto non solo da molti autori di Manuali, ma anche da quei naturalisti che studiarono in seguito le ostriche verdi. Ed è alla continua citazione di lui che si deve la diffusione della credenza (del resto resa pubblica da altri sessantanni prima) secondo la quale le ostriche di Marennes diventano verdi perchè si nutrono di una diatomea verde, la *Navicula fusiformis*, var. *ostrearia*.

Eppure la semplice lettura di quella Nota avrebbe dovuto persuadere qualunque osservatore ch' essa non merita fede; basta ricordare questo soltanto: il PUYSEGUR non ha fatto nessun esame diretto sulle ostriche verdi di Marennes per precisare la sede della viridità. Ed egli confuse il colore proprio dei tessuti dell' ostrica verde col' aspetto di ostriche che sembravano verdi perchè, essendo state tenute

in un bacino pieno di Navicule, ne avevano una grande quantità annidate nello spazio palleale e fra le lamelle branchiali. Ed è curioso notare che il PUYSEGUR citi nel suo lavoro, pur non tenendone conto nessuno, l'importante osservazione del BRÉBISSON, il quale, molti anni prima, aveva detto: »on a cru que cette espèce (la *Navicula*) communiquait sa couleur aux huîtres vertes, tandis qu' il paraît qu' elle prend cette couleur quand elle croît dans un parc ayant de la tendance à verdier les huîtres«.

Quattro anni dopo il RYDER (84) conferma le conclusioni del PUYSEGUR ed aggiunge di aver notato una specie di viridità anche nell' *O. virginica* dell' America e nell' *O. angulata* del Tago, ch' ebbe opportunità di avere da Liverpool. Il RYDER aggiunge che dalle sue ricerche gli è nato »a shadow of doubt that the acquisition of this color comes about as follows: That the coloring is either derived from without, or else may be a hepatic coloring principle, which, on account of some derangement of the normal metabolic processes of the animal, has been dissolved and absorbed by the lympho-haemal fluid, and then imbibed by the blood cells.«

Osservo subito che questa ipotesi della malattia del fegato era stata pubblicata molti anni prima dal COSTE (61).

Al LANKESTER (85) dobbiamo le prime ricerche sull' istologia delle ostriche verdi. Premessa una larga esposizione storica, in parte tolta dal PUYSEGUR, che non è neppure ricordato, il LANKESTER osserva giustamente che, come aveva già detto il RYDER, non è sostenibile la vecchia opinione del BIZIO, secondo il quale l'inverdimento delle ostriche dipendeva dalla presenza di sali di rame nei tessuti. L' autore inglese accetta invece per vera l'asserzione del PUYSEGUR. Descrive e figura la *Navicula*, così abbondante nei »parcs« e che dagli ostricoltori di Marennes è detta il »ross« e con esperienze chimiche e spettroscopiche (già fatte senza risultato dal RYDER) dimostra che il protoplasma bluastro della *Navicula* e il verde-blu delle ostriche di Marennes sono sostanze identiche per le quali propone il nome di marennina.

Passando all' esame diretto delle ostriche il LANKESTER ritiene che nei palpi labiali e nelle lamelle branchiali il verde sia »localised on the surface of these organs in certain peculiar cells of the superficial epithelium. These cells are large subspherical secretion-cells, which are placed at intervals among the smaller columnar cells which constitute the bulk of the epithelial clothing of the gills and of the

labial tentacles. The green colour is concentrated in these secretion-cells, and is localised in the granules which they contain.«

Il LANKESTER, che si era proposto di dimostrare che la sostanza verde veniva assorbita e depositata soltanto nelle »secretion-cells« delle branchie e dei palpi, »and nowhere else«, come stampa lui stesso sottolineando (pag. 78), ha qualche dubbio che traccia di pigmento verde sia diffusa nel protoplasma delle cellule epiteliali; ma aggiunge subito ch'egli ritiene ciò (pag. 90) »as due to optical conditions which allow the colour of those secretion-cells not in actual focus to be transferred by refraction and reflection to the surrounding colourless substance«.

Sempre secondo l'Autore inglese, le cellule di secrezione non si trovano altro che nei palpi e nelle lamelle. E dove esse »occur the green coloration occurs; where they are absent there is no green colour«. Egli nota anche ch'esse non sono esclusive delle ostriche verdi e che si trovano esattamente eguali, ma scolorate, in tutte le altre ostriche. Ed assicura che quelle cellule fabbricano i granuli verdi, i quali sarebbero poi emessi come mucina.

Più avanti il LANKESTER (pag. 92) fa un'altra osservazione: »A very curious condition is commonly exhibited by the secretion cells. They are to be found free on the surface of the epithelium and exhibit slow amoeboid movements. . . . they are secretion cells which had been detached from their position, and were leading a free wandering existence on the surface of the gill.«

Nella tavola che accompagna la memoria del *L.* sono raffigurate diversi esemplari di *Navicula*, un' ostrica verde, delle sezioni di lamella branchiale e delle cellule ameboidi con delle granulazioni blu-verdastre.

Dopo il lavoro del LANKESTER altri ne furono pubblicati in questi ultimi anni, ma tutti di poca importanza; ne darò qui un cenno. Lo CHATIN (93) riprende le ricerche del LANKESTER e le conferma, pur dandole come originali; di suo vi aggiunge un errore, supponendo che le cellule di secrezione, da lui dette »macroblasti«, sieno di dimensioni enormi, 250 μ . Ed anche lui crede, sebbene »d'une façon secondaire et dans une mesure très restreinte, qu'on peut invoquer les contractions amiboïdes et les déplacements des macroblastes pour expliquer la diffusion de la matière colorante. Dans les circonstances normales les contractions sont peu fréquentes et l'on voit rarement un macroblaste passant de l'état statique à l'état dynamique«.

Per il PELSENER (92) invece, il fenomeno dell' inverdimento

è una fagocitosi difensiva. Egli ritiene, come gli altri, che il verde sia dovuto alla *Navicula*, »le pigment insoluble des *Navicula* passe dans le sang . . . les granulations pigmentaires insolubles constituent un produit nuisible dans le sang . . . elles sont mangées par les corpuscules sanguins. Ceux-ci passent dans les branchies et les palpes . . . pénètrent alors entre les cellules de l'épithélium ou détruisent certaines d'entre elles, de façon à arriver à la surface extérieure de l'organe . . . On s'explique facilement que les huîtres vertes placées dans de l'eau sans *Navicula*, se décolorent très vite (en un petit nombre d'heures, 36 au maximum), les corpuscules chargés de pigment étant rapidement éliminés par la grande surface libre des branchies et des palpes.«

Della stessa opinione è il DE BRUYNE (95) nella sua estesa e recente memoria sulla fagocitosi. Anche per lui (pag. 56) »la ,marennine', matière colorante de la Diatomée, est incorporée par les leucocytes; pour l'expulser ils percent l'épithélium tégumentaire, surtout au niveau des branchies et des palpes auxquels ils donnent la coloration particulière«.

Altre due brevi note sull' argomento si devono al RYDER (93) e al JOURDAIN (93), ma non merita conto di parlarne. Il LANKESTER (93, 95) volle asserire ch' egli aveva scorto prima degli altri la fagocitosi e confermò ripetutamente i risultati del suo lavoro del 1885.

Infine di questi giorni l'HERDMAN (96) osservando la colorazione verde in alcune ostriche americane (*O. virginica?*) crede ch' esse sieno malate e aggiunge ch' egli trova il fegato »histologically in an abnormal, shrunken and degenerate condition«. Si tratterebbe dunque della vecchia ipotesi, già data per nuova dal RYDER, della malattia di fegato, alla quale l'HERDMAN aggiunge »an inflammatory condition or leucocytosis«.

In una polemica avuta l'anno decorso io accennai sommariamente (95) ai risultati delle mie ricerche, che sono riferiti per disteso nelle pagine che seguono.

Da questa rapida esposizione della questione si scorge che sulla causa dell' inverdimento delle ostriche di Marennes gli osservatori son tutti d'accordo. Essi ammettono come cosa sicura che il verde venga assorbito dall' apparato digerente colla *Navicula*, e che debba essere eliminato attraverso agli epiteli dei palpi e delle branchie perchè dannoso all' organismo.

Quanto alla sede della colorazione le opinioni sono divise. Per alcuni il pigmento verde è immagazzinato in cellule speciali (di secrezione, macroblasti) dell' epitelio ed è poi emesso come mucina; per altri quelle stesse cellule, dopo essersi caricate di granulazioni verdi, diventano mobili per portar fuori dall' organismo il loro contenuto; per altri, infine, il pigmento è preso dalle cellule ameboidi del sangue, e queste si fanno strada traverso all' epitelio, devastandolo e mangiandolo, per uscire all' esterno.

Io mi proposi di controllare con ricerche mie quelle dei predecessori, per vedere come si potevano conciliare le diverse opinioni, e quale era più la fondata; volevo poi assicurarmi se l' inverdimento era dovuto al nutrimento speciale dell' ostrica di Marennes, cioè alla *Navicula ostrearia*.

Mai più avrei creduto che la conclusione a cui sarei giunto sarebbe stata la seguente: tutto quel ch' è stato detto finora sulle ostriche verdi è completamente sbagliato, ed è la conseguenza di osservazioni o infondate o malamente interpretate. Tuttavia, per quanto inaspettato, questo è il risultato evidente ed, oso dire, incontrovertibile delle mie ricerche, non brevi e neanche sempre facili.

Bibliografia.

1861. Coste, P., Voyage d'exploration sur le litoral de la France et de l'Italie; Industrie de Marennes. 2^{me} ed. Paris. pag. 109.
1877. Posner, C., Histologische Studien über die Kiemen der acephalen Mollusken. in: Arch. Mikr. Anat. 14. Bd. pag. 132.
1880. Puysegur, G., Notice sur la cause du verdissement des Huîtres. in: Revue Marit. Colon. Paris. Tome 64 Livr. 221.
1883. Hoek, P. P. C., De voortplantingsorganen van de Oester [etc.]. Les organes de la génération de l'Huitre [etc.]. in: Tijd. Nederl. Dierk. Ver. Suppl. Deel 1 pag. 113.
1884. Ryder, J., Supplementary note on the coloration of the blood corpuscles of the Oyster. in: 10. Rep. U. S. Comm. Fish Fisher. 1882. pag. 801.
1885. Lankester, E. R., On green Oysters. in: Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 26 pag. 71.
1886. Thiele, J., Die Mundlappen der Lamellibranchiaten. in: Zeit. Wiss. Z. 44. Bd. pag. 239.
1887. Apáthy, J., Studien über die Histologie der Najaden. in: Biol. Centrabl. 7. Bd. pag. 621.
- Davidoff, M., Untersuchungen über die Beziehungen des Darmepithels zum lymphoiden Gewebe. in: Arch. Mikr. Anat. 29. Bd. pag. 495.
- Gruenhagen, A., Über Fettresorption und Darmepithel. *ibid.* pag. 139.
- Mittheilungen a. d. Zoolog. Station zu Neapel. Bd. 12.

1887. List, J. H., Über einzellige Drüsen (Becherzellen) im Blasenepithel der Amphibien. *ibid.* pag. 147.
1888. Paneth, J., Über die secernirenden Zellen des Dünndarm-Epithels. in: *Arch. Mikr. Anat.* 31. Bd. pag. 113.
- Rawitz, B., Der Mantelrand der Acephalen. 1. Theil: Ostrea. in: *Jena. Zeit. Naturw.* 22. Bd. pag. 415.
1889. Cattaneo, G., Sulla morfologia delle cellule ameboidi dei Molluschi e Artropodi. in: *Boll. Sc. Pavia Anno 11* pag. 3.
- Cuénot, L., Etudes sur le sang et les glandes lymphatiques [etc.], 1^{ère} partie: Vertébrés. in: *Arch. Z. Expér.* (2) Tome 7 pag. 1.
1891. Cattaneo, G., Gli amebociti dei Cefalopodi e loro confronto con quelli d'altri invertebrati. in: *Atti Univ. Genova.*
- Cuénot, L., Etudes sur le sang [etc.], 2^{me} partie: Invertébrés. in: *Arch. Z. Expér.* (2) Tome 9 pag. 13.
- Flemming, W., Über Theilung und Kernformen bei Leucocyten, und über deren Attractionssphären. in: *Arch. Mikr. Anat.* 37. Bd. pag. 249.
- Griesbach, H., Beiträge zur Histologie des Blutes. *ibid.* pag. 22.
- Löwit, M., Die Anordnung und Neubildung von Leukoblasten und Erythroblasten in den Blutzellen bildenden Organen. *ibid.* 38. Bd. pag. 524.
1892. Cattaneo, G., Influenza del letargo sulle forme e i fenomeni delle cellule ameboidi negli invertebrati. in: *Boll. Mus. Z. Anat. Genova.* No. 1.
- Pelseener, P., La phagocytose défensive chez les Huitres vertes. in: *Bull. Soc. Malac. Belg.* Tome 27 pag. LXII.
1893. Bizzozero, G., Sulle ghiandole tubolari del tubo gastroenterico [etc.]. in: *Atti Accad. Torino* Vol. 24, 27, 28. 1888—1893.
- Carazzi, D., *Manuale di Ostricoltura e Mitilicoltura.* Milano.
- Chatin, J., Du siège de la coloration chez les Huitres vertes. in: *Compt. Rend.* Tome 116 pag. 1156.
- De Bruyne, C., De la phagocytose observée, sur le vivant, dans les branchies des Mollusques lamellibranches. *ibid.* pag. 65.
- Frenzel, J., Mikrographie der Mitteldarmdrüse [etc.]. in: *Nova Acta Acad. Leop. Car.* 60. Bd. pag. 317.
- Janssens, Fr., Les Branchies des Acéphales. in: *La Cellule.* Tome 9 38. Bd. pag. 1.
- Jourdain, S., Sur les causes de la viridité des Huitres. in: *Compt. Rend.* Tome 116 pag. 408.
- Knoll, Ph., Über die Blutkörperchen bei wirbellosen Thieren. in: *Sitzber. Akad. Wien* 102. Bd. 3. Abth. pag. 440.
- Lankester, E. R., Phagocytes of green Oysters. in: *Nature* Vol. 48 pag. 75.
- Ryder, J., On the cause of the greening of the Oyster [etc.]. in: *Proc. Acad. N. Sc. Philadelphia* f. 1892 pag. 352.
- Saint-Hilaire, C., Sur la fonction du foie des Crustacés et des Mollusques. in: *Revue Sc. N. Pétersbourg* 4. Année pag. 114.
1894. Chatin, A. & Muntz, A., Etude chimique sur la nature et les causes du verdissement des Huitres. in: *Compt. Rend.* Tome 118 pag. 17.
1895. Carazzi, D., Sulla fagocitosi nei Lamellibranchi. in: *Monit. Z. Ital.* Anno 6 pag. 52.

1895. Carazzi, D., Fagocitosi e diapedesi nei Lamellibranchi. in: *Monit. Z. Ital.* Anno 6 pag. 249.
- Green Oysters. in: *Nature* Vol. 52 pag. 643.
- Chatin, J., Du siège de la coloration chez les Huitres brunes. in: *Compt. Rend.* Tome 120 pag. 884.
- De Bruyne, C., Contribution à l'étude de la Phagocytose. in: *Arch. Biol.* Tome 14 pag. 161.
- Lankester, E. R., Green Oysters. in: *Nature* Vol. 52 pag. 28.
- vom Rath, O., Über den feineren Bau der Drüsenzellen des Kopfes von *Anilocra mediterranea* im Speciellen und die Amitosenfrage im Allgemeinen. in: *Zeit. Wiss. Z.* 60. Bd. pag. 1.
1896. Chatin, J., De la phagocytose chez les Huitres. Sur les macroblastes des Huitres, leur origine et leur localisation. in: *Compt. Rend.* Tome 122 pag. 487.
- Herdman, W. A., Report for 1895 on the Lancashire Sea-Fisheries Laboratory Univ. Coll. Liverpool. Liverpool.
- Mayer, P., Über Schleimfärbung. in: *Mitth. Z. Stat.* Neapel. 12. Bd. pag. 303.
- Trambusti, A. Contributo allo studio della cellula epatica. in: *Ricerche Lab. Anat. Roma* Vol. 5 pag. 81.

2. Materiale adoprato e metodi di ricerca.

Durante gl' inverni 1894, '95 e '96 mi sono provvisto ripetutamente di ostriche verdi di Marennes, sia facendole venire indirettamente, col mezzo di un negoziante di Monaco (principato), sia ordinandone direttamente qualche migliaio per volta a La Tremblade. Esse arrivavano alla Spezia sempre vive e in bonissime condizioni; usavo esaminarne subito qualcheduna e dopo mettevo le altre in mare, per servirmene con comodo, perchè la viridità è di lunga durata, come fanno tutti i venditori di ostriche di Marennes, ed ignorano i naturalisti che le hanno finora studiate.

È noto che a Marennes non nascono ostriche, ma che i coltivatori le comperano dai centri di produzione, Arcachon (Bordeaux) e Auray (Morbihan); parlo beninteso della specie *O. edulis*, perchè dell' *O. angulata* dirò in un capitolo a parte, occupandomi delle affermazioni dell' HERDMAN. Intorno al fiume Seudre, specialmente nelle notissime località di Marennes e La Tremblade, le ostriche bianche, deposte nei »parcs« verso la fine di settembre, prendono presto il colore verde, così che a metà ottobre cominciano ad esser vendute. La loro viridità va aumentando durante l' inverno fino a tutto febbraio, poi diminuisce continuamente, per cessare fra la fine

di marzo ed il principio di aprile. Credo opportune queste informazioni per chi volesse controllare le ricerche mie.

Sui metodi impiegati mi estendo qui per non dovere ripetermi; se è necessario indicare sempre con tutta esattezza come si è proceduto nelle investigazioni, lo è tanto più nel caso mio, perchè, come si vedrà più avanti, molti errori commessi dai miei predecessori furono dovuti a difetti di tecnica.

Per l' esame a fresco, che giova sempre fare per quanto esso sia impotente da solo a rischiarare la questione, mi contentavo naturalmente di osservare il pezzo di tessuto nell' acqua di mare. Gli animali che dovevano esser uccisi per ottenerne delle sezioni venivano prima addormentati. La narcosi è importantissima, per osservare i tessuti in condizioni il meno anormali che si può. Abbiamo già tante cause d' errore, dovute ai reagenti impiegati, che sarebbe una grave mancanza non ricorrere all' anestesia per attenuare almeno, se non togliere del tutto, i gravi effetti dello shock operatorio sugli elementi dell' animale che imprendiamo a studiare.

È noto che i lamellibranchi si possono addormentare bene tenendoli nell' acqua alla quale si aggiunge o solo alcool, o cloralio, oppure una soluzione alcoolica d' idroclorato di cocaina. A me parve che il primo metodo desse i migliori risultati, e l' ho preferito anche perchè il più economico. Si mette l' ostrica in un piccolo cristallizzatore quasi pieno d' acqua di mare pulita, e dopo si versa, adagio adagio, dell' alcool, che galleggia per alcun tempo, sciogliendosi lentamente nell' acqua di mare. È noto che questo metodo si deve al LO BIANCO, della Stazione zoologica di Napoli. Se la stanza, nella quale si tiene l' animale, non è riscaldata, sarà difficile, durante la fredda stagione, ch' esso s' addorma; ed in questo caso ho trovato comodo porlo dentro un termostato che mantenevo a circa 25° C. Così ottenevo l' anestesia in 24 ore. L' ostrica rimane in tal modo colle valve socchiuse e riesce quindi molto facile di tagliare con un bisturi affilato il muscolo adduttore. Se voglio preparare i palpi taglio con una forbiciata il cappuccio palleale e con un altro colpo separo dal corpo tutti e quattro i palpi; per le lamelle branchiali con tre tagli di forbice isolo un pezzo rettangolare comprendente tutti e quattro i foglietti delle due branchie. Soltanto dopo fissato, colorato (se la colorazione si fa in toto) e disidratato taglio e butto via i due palpi o i due foglietti branchiali esterni, imbettando e sezionando poi soltanto quelli interni, che non sono mai stati toccati da corpi estranei.

Come liquido fissativo non si possono adoperare le soluzioni cromatiche, platiniche od osmiche, e quindi neanche i liquidi del FLEMMING, dell' HERMANN, del PERENYI ecc.; infatti quelle sostanze nascondono, o per lo meno rendono malagevole la constatazione della sostanza verde. Servono invece l'alcool solo, le soluzioni a base di sublimato e quindi i liquidi del MINGAZZINI e del GILSON. Io ho dato la preferenza a quest'ultimo, che preparo con una lieve modificazione alla formula dell'autore, per avere delle quantità facili a misurare. In un litro d'acqua distillata aggiungo 10 gr. di cloruro di sodio e vi unisco 100 cc. di alcool a 70% nel quale ho sciolto 20 gr. di sublimato corrosivo; poi verso nella soluzione 15 cc. di acido nitrico puro concentrato e 5 cc. di acido acetico glaciale. Credo di poter affermare che questo fissativo è uno dei migliori che abbiamo, e che può esser adoprato con molti e diversi animali.

I piccoli pezzi d'ostrica (palpi, lamelle branchiali, intestino terminale ecc.) si tengono un'ora o due nel liq. del GILSON. Il corpo intero, nel quale tuttavia è sempre bene fare un largo taglio per facilitare la penetrazione del fissativo, si lascia per 4—6 ore. I lavaggi si fanno nell'alcool iodato, evitando l'acqua; e se il pezzo è grosso si cambia l'alcool iodato un paio di volte. I pezzi vi si tengono un paio d'ore se son piccoli; per uno grosso occorrono 24 ore.

Le rimanenti manipolazioni sono le solite, cioè alcool forte, alcool assoluto, olio di legno di cedro, paraffina.

Tanto l'alcool che le soluzioni di sublimato non sciolgono, nè alterano la colorazione verde. Tuttavia osservo che nell'alcool solo e nel solo sublimato si ha un tóno di verde un poco più smorto del colore primitivo, invece nei liquidi che oltre il sublimato contengono degli acidi si ha un tóno di verde leggermente bluastrò. Durante l'indurimento coll'alcool si vedrà sciogliersi una sostanza gialla quando il pezzo contiene anche una qualche porzione del fegato. Quel giallo è contenuto nelle cellule epatiche, ben note a tutti dopo le ricerche del FRENZEL (93).

Dovendo fare delle sezioni continue di un pezzo grande uso di solito la colorazione in tóto; i colori preferiti furono il paracarmine e il carmallume del MAYER; ma molto spesso, specialmente per i palpi e le lamelle branchiali, ho adoprato la colorazione sulle sezioni. Quando queste servivano per stabilire i rapporti fra i vari organi furono fatte da 7 a 8 μ di spessore; ma per le ricerche più delicate di soli 4—5 e anche 3 μ . Per le sezioni continue ho

adoprate il microtomo a bilico (tipo Cambridge, modificato dalla Stazione Zoologica di Napoli) costruito dal JUNG di Heidelberg. È un microtomo praticissimo, sotto tutti i riguardi e che dà ottimi risultati anche con pezzi relativamente grandi, purché l'imparaffinamento sia stato fatto con cura.

Le sezioni continue ho sempre attaccate col semplice e comodo metodo dell'acqua distillata, alla quale aggiungevo piccole quantità d'alcool per facilitare l'adesione. Le sezioni da colorare erano sempre attaccate al coprioggetto.

Per la colorazione delle sezioni, quando si tratta di fare un esame d'insieme, si hanno dei brillanti risultati dal picrocarminio del RANVIER 1% fatto agire per un'ora; si lava rapidamente nell'alcool, si disidrata, si rischiarifica con xilolo e si chiude. Colorazioni più delicate si hanno col carmallume (3 minuti) e coll'emallume del MAYER (1 minuto), lavando nell'acqua con allume 1% e poi con acqua semplice. Ancor più precisa e brillante è la colorazione colla safranina. Io adopero una soluzione già vecchia di due anni, fatta con safranina solubile nell'acqua (di GRÜBLER) gr. 1, acqua distillata gr. 100, alcool a 90% cc. 50. Vi lascio le sezioni per un'ora, lavo rapidamente (30") nell'alcool a 70% acidulato con HCl 0,1%, poi alcool assoluto e xilolo. Questa colorazione dev'essere anche duratura perchè dopo un anno ho trovato i preparati perfettamente colorati.

In alcuni casi, come dirò a suo tempo, avevo bisogno di doppie colorazioni (oltre a quella ricordata del picrocarminio). Il liquido BIONDI-HEIDENHAIN molto spesso fallisce, ma esso è di riuscita certa se si osservano le modificazioni suggerite dal prof. TRAMBUSTI (96). Le sezioni si liberano dalla paraffina col xilolo, si passano nell'alcool assoluto e poi si tengono per due ore in una soluzione d'acido acetico (1 a 500) nell'acqua. Quindi si lasciano per 24 ore in questa miscela, preparata di fresco:

Soluzione madre BIONDI-HEIDENHAIN (1 a 80) gr.	1
Acqua distillata	» 150
Acido acetico 1%	» 2,5

Si passa rapidamente per due volte nell'alcool assoluto, si rischiarifica con xilolo, si lascia asciugare bene e si chiude nel balsamo denso; con queste avvertenze la colorazione ha una maggior durata. Ad ogni modo dopo alcuni mesi il verde di metile scompare, e rimane solo la fucsina.

Una buona doppia colorazione si ottiene colorando successivamente, secondo le indicazioni già date, coll' emallume e poi colla safranina. Ho adoprato anche il Blu di metilene (gr. 0,1; alcool 100; acqua 400) e il Blu Vittoria (gr. 0,1; alcool 10; acqua 90), facendo agire l' uno e l' altro per mezzora. Per colorazione secondaria, dopo l' emallume, la safranina, il blu di metilene e il blu Vittoria, mi son servito di una soluzione di eosina solubile nell' acqua (GRÜBLER) così preparata: eosina gr. 1, alcool 90% cc. 100, acqua distillata 200. Si colora per 10 minuti, si disidrata (mettere una traccia di eosina nell' alcool assoluto), si rischiara con xilolo e si chiude nel balsamo.

Finalmente, in questi ultimi giorni ho provato anche le due miscele recentemente fatte conoscere dal MAYER (96) per l' esame della mucina, cioè il mucicarminio e la mucemateina.

3. Distribuzione della sostanza verde.

Se si apre un' ostrica di Marennes nel tempo del massimo inverdimento, cioè da dicembre a tutto febbraio, si scorge, appena levata una delle valve, il colore caratteristico sulle lamelle branchiali e sui palpi, come fu raffigurato nella sua tavola dal LANKESTER. E quelle e questi, formando uno strato colorato di uno spessore rilevante appaiono, piuttosto che verdi, di un tóno bluastrò; ma se si esamina una sola lamella o un solo palpo la tinta apparirà verde, e tale si scorge poi evidentemente nelle sezioni esaminate per trasparenza. Non tutte le ostriche sono egualmente colorate, ma se si guarda un esemplare nel quale il verde sia abbondante, basterà un poco di oculatèzza per accorgersi, dal semplice esame esteriore, di altri due organi colorati in verde, e sono il mantello e l' intestino terminale, cioè quella parte d' intestino che uscendo dalla massa del corpo, presso il ventricolo del cuore, scende lungo il muscolo adduttore dalla parte aborale, per finire coll' apertura anale. Non sempre il mantello è verde, ma talvolta lo è sensibilmente verso la parte apicale, nella regione dei tentacoli. L'intestino terminale in tutta la parte che non è addossata al muscolo adduttore è rivestito da una tunica palleale e se questa, come succede sovente, ha un pigmento oscuro molto marcato può nascondere la colorazione verde della sottostante mucosa.

Continuando l' esame macroscopico, per avere un' idea d' insieme della distribuzione del verde, sarà bene fare con un coltello sottile e bene affilato un' ampia sezione di tutto l' animale, lasciato su di una delle valve, in modo da tagliare il corpo a metà circa, in un

piano parallelo ai due gusci; si tratta cioè di fare una sezione sagittale, perchè le valve (come tutti sanno) corrispondono ai fianchi del corpo. Nella figura 1 (tav. 18) si vede, semischematicamente, una tale sezione; dalla quale risulta che il verde si continua dentro la bocca oltre i palpi, eppoi giù per il tratto che diremo faringo-esofageo, diminuisce più sotto e scompare completamente nello stomaco e nella porzione che si continua a questo, corrispondente al vero cieco di altri lamellibranchi. Un poco sopra al piccolo foro che mette in comunicazione la porzione suddetta col principio dell' intestino medio, il verde torna a comparire ed è visibilissimo in tutto l' intestino circondante e giù per l' intestino terminale fino all' ano.

Il fegato non appare verde, ma del solito colore rosso bruno (color terra cotta di Siena) un poco più oscuro di quel che si scorge nelle ostriche bianche. Se mettiamo quella metà di ostrica a indurire nell' alcool forte (80—90%) e si cambia il liquido un paio di volte si vedrà sciogliersi un color giallo ch' era contenuto nelle cellule epatiche (vedi le figure nel lavoro del FRENZEL) e tutti i lobuli del fegato prendere una colorazione verde quasi identica a quella delle branchie, dei palpi e della mucosa intestinale, ma d' un tóno un poco più smorto. Ora è noto fin dalle vecchie ricerche dei chimici francesi (DUMAS, BERTHELOT) che il verde delle ostriche di Marennes è insolubile nell' alcool.

Stomaco, cuore¹, organo del Bojanus, glandula pericardica, muscolo adduttore non sono mai colorati in verde. E ricordo qui, una volta per sempre, che ostriche di Marennes ne ho esaminate diverse centinaia a periodi molto diversi, e ripetuti per tre o quattro volte all' anno durante tre anni.

Passiamo adesso all' esame istologico dei singoli organi verdi, mediante l' esame di sezioni ottenute nei modi e colle avvertenze date nel capitolo 2.

Lamelle branchiali. Viste tutte unite a cagione della loro massa esse sembrano molto verdi, ma nelle sezioni sottili il colore si scorge difficilmente ed in minor quantità che nei palpi e in tutto l' intestino circondante e terminale. Consiglio quindi chi volesse controllare le

¹ Il RYDER dice d' aver visto la superficie del ventricolo del cuore verde; egli ha preso certamente abbaglio, credendo superficie del ventricolo il rivestimento palleale soprapericardico. E il mantello, specialmente nell' ostrica americana (*O. virginica*) e nella portoghese (*O. angulata*), può essere abbondantemente verde-giallo, come dirò a suo tempo.

mie ricerche di riservare l'esame delle branchie per ultimo, dopo essersi famigliarizzato con quello dei due organi surricordati.

Se si fa una sezione trasversale di una lamella branchiale molto sottile, cioè sotto i $7\ \mu$, è difficile avere un'idea della distribuzione del verde; è preferibile una sezione di $12-15\ \mu$, messa magari nel balsamo senza colorirla, oppure servendosi di una tinta di color rosso vivace (paracarminio allungato, safranina) per darle una colorazione di contrasto. Sarà meglio evitare le sezioni molto vicine alla base (prossimali) e quelle apicali (distali), perchè esse sono così stipate di cellule di secrezione da non lasciar scorgere bene il verde; si dia la preferenza alle sezioni della parte media della lamella e si vedrà la distribuzione del colore come è rappresentato nella fig. 2 e nella figura 3. Nelle quali si scorge senza nessun dubbio che le cellule di secrezione non contengono sostanza verde, e che questa è contenuta prima di tutto nella parte distale delle cellule cilindriche epiteliali protoplasmatiche, ma non subito sotto la base delle ciglia vibratili, bensì in una zona un poco più profonda, superiore ai nuclei. Evidentemente è proprio il protoplasma cellulare che ha assunto, in quel tratto, la colorazione verde. Anche coi più forti ingrandimenti e coi migliori obiettivi non si può risolvere quella colorazione in granuli distinti, tuttavia, più o meno visibilmente, il protoplasma verde ha un aspetto sottilmente punteggiato. Verso la base dell'epitelio, ma non più dentro alle cellule epiteliali, bensì fra di esse in certi spazi irregolari, si scorgono dei cumoli di granulazioni tondeggianti e del diametro di $1-2\ \mu$, di un colore verde spiccatissimo. Finalmente, nelle lacune sanguigne fra gli amebociti se ne vede qualcheduno pieno di granulazioni verdi, identiche in tutto a quelle degli spazi intercellulari della base dell'epitelio. Questo è quel che si osserva, più o meno facilmente, in maggiore o minore quantità ma costantemente in tutte le ostriche di Marennes inverdite.

Palpi labiali. Si osservino le stesse precauzioni indicate per le branchie. Anche qui l'esame istologico dà sempre questi risultati: cellule di secrezione mai colorate, e si noti, a questo proposito, che la parte più verde del palpo è quella frangiata orale, mentre è pochissimo colorata la porzione liscia aborale; ora le cellule di secrezione sono molto più frequenti in quest'ultima porzione e scarse nella prima (salvo le sommità delle creste e la parte apicale, distale, del palpo). L'esame delle figure 6, 7 e 8 mi risparmia di aggiungere altro; come si vede la distribuzione della sostanza è identica a quella dell'epitelio delle lamelle branchiali.

Cellule di secrezione. Prima di proseguire è necessario ch' io mi trattenga su questi elementi, che dal LANKESTER e dallo CHATIN furono erroneamente creduti la sede dell' inverdimento.

È noto che in tutti i lamellibranchi l' orlo del mantello, la superficie delle branchie e dei palpi sono cosparse di una sostanza lubrica che all' aria si rapprende in una materia molle bianchiccia filamentosa, assai simile per l' aspetto fisico al muco. Tuttavia secondo le idee ancora accettate in istologia quella sostanza sarebbe ben diversa dalla mucina propriamente detta, non avendone i caratteri chimici. Dirò adunque che si tratta di una nucleo-albumina¹ secreta dalle cellule superficiali, le quali, dal POSNER (77) che per il primo le descrisse e figurò nelle branchie delle najadi, e poi da tutti gli autori tedeschi, vennero chiamate *Becherzellen*, benchè nelle branchie, nei palpi e talvolta anche nel mantello abbiano di solito una forma ovoidale o subsferica, piuttosto che a calice. Forma questa ultima che troveremo invece nelle cellule di secrezione dell' apparato digerente (del quale dirò più avanti), e che sono per tanti versi simili alle cellule caliciformi dei vertebrati.

Nell' orlo del mantello dei lamellibranchi queste cellule di secrezione vennero descritte ampiamente ed accuratamente del RAWITZ (88) e nelle branchie, oltre al POSNER già citato, le ricorda e le figura anche il JANSSENS (93). Nei palpi labiali furono notate dal THIELE (86), che ne parla brevemente.

Nelle branchie e nei palpi delle ostriche esse sono abbondanti, molto più di quello che si è creduto finora da coloro che le hanno figurate; specialmente straordinario è il loro numero nella parte più distale di quei due organi. Presso l' orlo, nelle parti apicali dei segmenti secondari delle lamelle branchiali e sulle creste dei ripiegamenti dei palpi esse sono così numerose, così stipate da nascondere completamente le cellule epiteliali cilindriche protoplasmatiche, in mezzo alle quali stanno conficcate. E sia per la grande quantità, sia per la poca adesione che hanno coll' epitelio rimanente, sia per la loro lubricità, esse si staccano facilissimamente dalla mucosa; così che ad un primo esame, fatto su di un pezzo di tessuto maneggiato senza le precauzioni che ho indicate nel precedente capitolo, capita di farsi un' idea erronea della loro distribuzione. Talvolta infatti sembra che manchino ed

¹ Dice il MAYER (96), e mi piace riportare le sue parole (p. 323): »In der That wissen wir vom Schleime der höheren Thiere chemisch noch recht wenig und von dem der allermeisten Wirbellosen so gut wie gar nichts.«

allora il tessuto, esaminato in sezione parallela alla superficie, prende l'aspetto bucherellato, quale ho rappresentato nella fig. 4. E non ho nessun dubbio che in molti casi la così detta membrana finestrata epiteliale degli autori non sia altro che una sezione così fatta, nella quale gli spazi vuoti rappresentano appunto il posto dove stavano incastrate le cellule di secrezione, sgusciate durante i maneggi operatori. E sono quegli spazi vuoti che alcuno ritenne come causati dalla fuoruscita degli amebociti.

Il contenuto delle cellule di secrezione è sempre incolore. A fresco si scorge bene la membrana, ma il nucleo è invisibile; tutta la parte somatica è costituita da grossi granuli subuguali ($2-3 \mu$), assai trasparenti. Le dimensioni della cellula sono rilevanti, di solito 15μ , talvolta 20 ed eccezionalmente fino 25 . La forma è subsferica od ovoida, nelle branchie; nei palpi è più allungata ed anche caliciforme. Per le dimensioni, tanto maggiori di quelle delle cellule epiteliali cilindriche (queste hanno in media 5μ di larghezza e una lunghezza assai variabile, secondo la posizione), per la forma e soprattutto per la grande trasparenza del loro contenuto, le cellule di secrezione spiccano sull'epitelio circostante, e appaiono come se fossero alla superficie di esso.

Ho detto che se il tessuto non è preparato colle dovute e indicate cautele l'esame delle Becherzellen può essere negativo, o per lo meno inesatto, essendo che molte sgusciano fuori durante le manipolazioni. Si deve ricordare poi che parecchie sostanze coloranti le mettono pochissimo in evidenza.

Avendo già detto che le cellule di secrezione sono le stesse già descritte dal RAWITZ nell'orlo del mantello, e che hanno molti ed importanti punti di contatto colle cellule caliciformi dei vertebrati, reputo inutile insistere su questi due punti: 1) le cellule di secrezione sono nel tessuto, e non già alla superficie di esso, 2) esse non possono per la loro natura fare nessun movimento.

Coll'acido osmico le cellule di secrezione prendono una tinta bruna (vedi fig. 5); nelle sezioni fissate coll'alcool, col sublimato, col liquido del MINGAZZINI e con quello del GILSON si differenziano bene dal tessuto circostante, adoprando le sostanze coloranti qui sotto indicate.

Col picrocarminio (lavare rapidamente con alcool; non occorre aggiungere ac. picrico all'alcool assoluto o al xilolo) tutti i nuclei, sia delle cellule protoplasmatiche che di quelle di secrezione, prendono un color rosso vivo, i granuli di queste ultime si colorano

fortemente in giallo, che spicca nel tessuto circostante colorato in roseo. I granuli di secreto non si colorano, nè coll' emallume, nè col mucicarminio o colla mucemateina del MAYER. Lo stesso risultato negativo si ha col carminio e col blu di metilene. Il carmallume talvolta colora leggermente, meno del tessuto circostante, qualche volta un poco di più. Col blu Vittoria, che colora i nuclei e lascia scolorato il protoplasma, i granuli prendono un colore vivissimo; come lo prendono coll' eosina. Colla miscela BIONDI-TRAMBUSTI il nucleo si colora in verde violetto, i granuli in rosso cupo, con un punto centrale più scuro. La safranina colora vivamente il nucleo, ma dà al contenuto una tinta gialla molto smorta e di rado si scorgono dei puntini rosso-vivo, che si direbbe corrispondere al centro dei granuli. Talvolta, specialmente col carmallume, ma anche coll' emallume, la cellula prende un aspetto reticolato. Per il LIST (87) e il JANSSENS (op. cit.) quell' aspetto corrisponde a un vero reticolo di fibrille esistenti fra un granulo e l' altro. Nelle cellule caliciformi dei vertebrati il PANETH (88) osserva: »wenn man in der Theka dieser Becherzellen ein Reticulum findet, so ist dieses nicht protoplasmatischer Natur, sondern besteht aus Secret«. Per il BIZZOZERO (93), invece, »ai granuli è interposta una sostanza che a cagione della forma sferica dei granuli stessi dev' essere configurata a reticolo, a maglie circolari, e che nella parte profonda della cellula si continua col protoplasma circondante il nucleo« (nota 7^a, pag. 120). Io inclinerei piuttosto verso l' opinione del PANETH, non fosse altro perchè l' aspetto a reticolo si scorge qualche volta soltanto, ma non nel maggior numero dei casi; ad ogni modo è certo che quella disposizione è dovuta all' effetto dei reagenti, anche se si tratta, come crede il BIZZOZERO, di una sostanza interposta ai granuli. Non mi pare infondata l' idea, che m' è venuta molte volte nel vedere le cellule colla superficie reticolata, che si tratti semplicemente di una compressione dei granuli, quando questi sono numerosi e assai vicini, sì che prendono una forma poliedrica; e questa dà all' insieme della superficie cellulare un aspetto reticolato.

Ho detto che la safranina mi ha sempre dato una colorazione d' un giallo smorto, mai ho visto le granulazioni colorarsi in rosso; bensì talvolta nel centro esse mostravano un finissimo punto rosso. I diversi aspetti delle cellule di secrezione ho riuniti nella fig. 3. Anche colla miscela BIONDI-TRAMBUSTI il contenuto non si colora sempre egualmente. Queste differenze non sono certo morfologiche, ma piuttosto si deve ritenere col RAWITZ (p. 38) che »wir haben

es hier also offenbar mit zwei verschiedenen Stadien in der Thätigkeit der Becherzellen zu thun«.

Possiamo adesso vedere facilmente in quali errori sieno caduti il LANKESTER e lo CHATIN. Ho già detto che il contenuto delle cellule di secrezione non è mai colorato, ed ha anzi una grande trasparenza; aggiungerò qui che tutte le sostanze coloranti che tingono il contenuto di quelle cellule, come anche qualunque altro colore, non hanno mai la capacità di alterare la sostanza verde delle ostriche di Marennes. Si capisce di quale vantaggio sia questo fatto per lo studio della distribuzione del verde. Ora, come si conciliano questi fatti indiscutibili colle affermazioni dei due autori menzionati? Essi esaminarono dapprima una porzione di lamella a fresco, cioè messa sotto al microscopio appena tagliata dall' animale vivente; e in questo modo le cellule di secrezione apparvero loro verdi per una illusione ottica. Infatti a cagione della grande trasparenza del loro contenuto esse assorbono la luce colorata in verde dal protoplasma inverdito delle cellule epiteliali circondanti e specialmente dalle granulazioni verdi che si trovano nella parte più profonda dell' epitelio e molto spesso sotto alle stesse cellule di secrezione; si vegga infatti le figure 2, 3, 7.

Le cose stanno dunque proprio all' opposto di quel che credette il LANKESTER (pag. 78 e 90), e del resto anche l' esame a fresco, se è proseguito con diligenza, fa entrare in sospetto dell' errore, perchè quando si abbassa lentamente l' obbiettivo sulla preparazione, le prime cellule di secrezione che arrivano in foco si vedono scolorate; ed è solo scendendo nel profondo del tessuto che appaiono verdi.

Come si spiega che tanto l' autore inglese come quello francese non s' accorsero dell' inganno esaminando le sezioni fissate e indurite di lamella branchiale o di palpo? Il LANKESTER non dà nessuna indicazione tecnica, ma ricordo che non dice mai di aver visto la sostanza verde nelle sezioni, soltanto continua a considerare le cellule di secrezione come la sede di essa, perchè di ciò si era persuaso col l' esame a fresco. E probabilmente egli avrà adoprato per fissatore una soluzione cromica od osmica. Quanto allo CHATIN egli dice chiaramente di aver impiegato l' ac. osmico 1 a 500, e questo colora in grigio le membrane e il protoplasma, e colora in bruno il contenuto delle cellule di secrezione. Noto poi, a proposito di queste ultime, che lo CHATIN ignora tutta la letteratura sull' argomento, ed attribuisce loro una dimensione dieci volte maggiore della massima,

quale si riscontra solo eccezionalmente nei più grossi esemplari di *O. angulata*.

Del resto che le affermazioni dei due autori menzionati sieno la conseguenza di errori di tecnica e di poca abilità nell'osservazione, non può cader dubbio, quando si pensa ch'eglino non s'accorsero della colorazione verde del protoplasma delle cellule epiteliali cilindriche, e non videro neppure i grossi cumoli di granuli verdi alla base dell'epitelio. Se poi essi non si fossero limitati all'esame delle sole branchie, ma l'avessero esteso anche al mantello, si sarebbero persuasi d'esser caduti in errore. Infatti mentre qui le cellule di secrezione sono abbondantissime, il verde o manca del tutto, od è molto scarso, appunto perchè esso non si trova mai dentro quegli elementi.

L'esame a fresco di un pezzo d'orlo di mantello d'ostrica di Marennes, cioè dove è più abbondante il pigmento, avrebbe anche dimostrato ai due autori sopra mentovati che la colorazione verde nelle cellule di secrezione è un'illusione ottica. Infatti in questo caso esse assorbono la colorazione dell'epitelio pigmentato circostante e sembrano perciò colorate in giallo bruno¹, al modo istesso che nelle branchie sembrano verdi.

Mantello. Nel tessuto palleale delle ostriche di Marennes il verde si trova talvolta mancante, e sempre in quantità poco notevole. È più facile scorgerlo verso i tentacoli e nell'epitelio del cappuccio palleale; ma se si esamina con diligenza, si riuscirà a scorgerne traccia anche in altre località; così per es. mi è riuscito vederne nel mantello che ricopre il così detto processo orale². Anche qui si trova che la colorazione è nella parte apicale del protoplasma delle cellule epiteliali non pigmentate, e spesso riesce difficile rintracciarla a cagione del pigmento bruno molto abbondante in tanti elementi del mantello. Alla base dell'epitelio si scorgono di tanto in tanto alcuni piccoli cumoli di granulazioni verdi. Inutile ripetere che le

¹ Lo CHATIN (95) s'accorse di questo fatto e ne trasse la conclusione che la colorazione bruna risiede nelle cellule di secrezione, ch'egli si ostina a chiamar macroblasti! Né l'esame delle sezioni poteva farlo accorto dell'errore perchè egli continuò a servirsi dell'acido osmico come fissativo. E certo oltrepassa i limiti dell'umana intelligenza concepire come si possa studiare una colorazione bruna dentro elementi che sono stati prima anneriti col fissativo!

² L'espressione è poco esatta, ma non è mia. Fu introdotta, se non erro, dall'HOEK (83) e l'accetto, per non inventare parole nuove. Il processo orale è indicato nella fig. 1, e si scorge subito che corrisponde bene alla regione del piede delle najadi, p. es.; e per non indurre in errore sarebbe stato meglio chiamarlo processo pedale, o regione ipogastrica.

numerose cellule di secrezione del palleo sono sempre sprovviste di colorazione verde, come di qualunque altra sostanza pigmentata.

Faringe-esofago. In continuità dello spazio lasciato dai palpi si ha la fessura orizzontale che costituisce la faringe; anche in essa l'epitelio forma delle pieghe, ma queste, a differenza delle frange dei palpi, sono regolari e subuguali. La colorazione verde è evidentissima tanto qui che nel successivo esofago. Nella parte apicale dell'epitelio, in una zona di poco sottostante all'orlo dove s'inseriscono le ciglia vibratili, il protoplasma mostra il colore verde, e nell'esofago è più facile scorgere ch'esso forma delle minutissime granulazioni, le quali vanno diradandosi scendendo verso il basso. Alla base delle lunghe cellule epiteliali ritroviamo i soliti cumoli con grosse e ben distinte granulazioni verdi. Vedi del resto la figura 9 che rappresenta una sezione dell'esofago; si noti che il verde prende un tóno più scuro, confrontato con quello dei palpi. Scendendo verso lo stomaco, la colorazione diminuisce sempre, e scompare completamente prima di arrivare in quest'organo.

Stomaco. Se qui manca sempre la colorazione verde, ho tuttavia da far notare qualche particolarità. La parte dorsale dello stomaco (lato sinistro di chi guarda lo stomaco della fig. 1), nella quale sta adagiata la porzione più grossa dello stilo cristallino (fig. 1, *St. c.*), ha l'epitelio senza nessuna specie di contenuto colorato; e qui è evidente la somiglianza coll'epitelio della porzione di stomaco che scende assottigliandosi a tubo nel processo orale (fig. 1, *I. d.*), dove si continua lo stilo cristallino, che finisce nell'ultimo tratto di quella regione, nella figura 1 indicata *I. c.* Se si guarda invece l'epitelio della parte orale dello stomaco, cioè dove quest'organo è più vicino alle branchie, troviamo tante ripiegature della mucosa fra loro subuguali e formate da cellule assai lunghe e sottili. La metà di una di queste ripiegature è disegnata nella fig. 10. Qui il protoplasma delle cellule nella sua parte apicale mostra di esser tutto ripieno di sottilissime granulazioni di color bruno rossastro (*g*); più in basso, e specialmente nella parte basale vicina al connettivo, si trovano dei nuclei di amebociti con intorno delle distinte granulazioni dello stesso colore. È insomma evidente la somiglianza fra questa sostanza bruno rossastra e la sostanza verde degli altri epiteli, sia per il modo con cui è distribuita, sia per le proprietà chimiche, rispetto agli agenti adoperati per fissare e indurire l'animale.

Nello stomaco le cellule di secrezione sono assai scarse; hanno più distinta la forma allungata fusiforme; e come nello stomaco si

trovano anche nei ciechi epatici che sboccano in esso. Il contenuto delle cellule di secrezione è, come sempre, privo di qualunque colorazione.

Intestino medio e terminale. Un poco al disopra del breve cieco dove ha termine lo stilo cristallino, si trova sulla destra una piccola apertura di comunicazione coll' intestino medio (fig. 1 *I m*). Esso principia con un brevissimo cieco (*I r*) e poi sale su per il processo orale, parallelamente al cieco gastrico, che si può anche dire intestino discendente (*I d*), e dalla parte più esterna, cioè verso le branchie. Poco sopra il livello del cuore, l' intestino medio si ripiega a sinistra, risale su per la regione aborale fra lo stomaco e il dorso, si sposta sul fianco sinistro dell' animale e subito dietro il principio dello stomaco si ripiega verso la parte orale, scende fino a passare vicino al termine dello stomaco, qui torna a piegarsi per andare nuovamente nella parte aborale e, giunto dove finisce il ventricolo del cuore (senza attraversarlo), esce dalla massa del corpo. Qui rivestito da una tunica palleale, prende il nome d'intestino terminale e rimanendo nella parte aborale del muscolo adduttore finisce con una piccola coppa anale (*A*, fig. 1).

Una sezione trasversale dell' intestino presa in un punto qualunque del suo lungo percorso, dal foro di comunicazione surricordato fino all' ano, mostra sempre la stessa struttura istologica e la forma ch' è rappresentata nella fig. 11. La mucosa intestinale ha tante piccole ripiegature subeguali, meno che in una porzione, nella quale forma due creste voluminose che sporgono nel lume dell' intestino, in modo da occupare la maggior parte della cavità tubulare (fig. 11 *cr cr₁*).

L' inverdimento dell' intestino medio, come si vedè nella fig. 1, comincia un poco più sopra del foro di comunicazione e si continua sempre eguale, fino all' ano. In tutto questo lungo percorso il verde riprende la tinta brillante che si scorgeva nei palpi e nelle branchie. Nelle creste il colore è più abbondante che nel rimanente della mucosa; ma la sua distribuzione è uguale a quella che abbiamo veduto negli epiteli esteriori. Nella parte apicale delle cellule epiteliali, un pochino al disotto della base delle ciglia vibratili, il protoplasma è uniformemente colorato in verde per breve tratto. In mezzo all' epitelio, e specialmente verso la base, cioè in vicinanza del sottostante connettivo, si trovano numerosi cumoli formati dalle solite granulazioni verdi. Si veda la fig. 12, che rappresenta un breve tratto di cresta dell' intestino circondante, e la fig. 13, che è un pezzo di mucosa

dello stesso intestino in un punto opposto alle creste. Ora, se noi facciamo astrazione dalla lunghezza delle cellule epiteliali, assai maggiore nell' intestino che non nelle mucose esteriori, dobbiamo riconoscere che la distribuzione della sostanza verde è identica tanto nell' epitelio intestinale che in quello dei palpi e delle lamelle branchiali. L' importanza di questa identità non sfuggirà certo al lettore.

Cellule di secrezione dell' intestino. Ho da riferire qui alcune osservazioni non prive d' interesse. Mentre nei palpi e nelle lamelle branchiali la forma delle cellule di secrezione è ovoide, subsferica, o, tutt' al più, fusiforme, qui troviamo caratteristica la forma a calice ed una ancor più diversa, che ho chiamato a clava. Malgrado la grande lunghezza che acquista l' epitelio nell' intestino, non è raro poter seguire tutta la cellula di secrezione, dalla parte basale dell' epitelio fino al limite colla cavità del tubo enterico. Talora la cellula di secrezione è sottile e priva di qualunque rigonfiamento in tutta la sua lunghezza; tal altra ha un lungo pedicello e solo nella parte distale s' allarga a calice o a clava. Il contenuto è formato da granuli molto trasparenti e sempre scolorati.

Mentre nelle branchie e nei palpi non ho potuto osservare il modo di formazione delle cellule di secrezione, qui nell' intestino ne ho seguito lo sviluppo dalla forma iniziale alla base dell' epitelio, fino a quando arrivano, completamente formate, a versare il loro contenuto nel cavo dell' intestino, accanto alle ciglia vibratili delle cellule epiteliali protoplasmatiche. Per la forma varia delle cellule di secrezione si vedano le fig. 12, 13, 14, 14^{bis}. Nelle cellule giovani (*bg*, fig. 13) il contenuto dev' essere chimicamente diverso da quello degli elementi giunti a maturità; ed in questi ultimi si osservano delle differenze, nel modo di comportarsi colle sostanze coloranti, che devono corrispondere a differenze nell' attività funzionale. Si noti la grande somiglianza fra gli elementi giovani che ho figurati in *bg* della fig. 13 con quello indicato *b* della figura 5 della nota 4^a del BIZZOZERO (lav. citato).

Qual' è la prima origine di queste cellule caliciformi? Io escludo assolutamente l' opinione del PANETH (op. cit. pag. 185) secondo il quale »nach Entleerung des Secrets wird aus der Becherzelle wieder eine Epithelzelle«. E son d' accordo col BIZZOZERO che »le cellule mucipare e le protoplasmatiche sono due tipi cellulari perfettamente distinti l' uno dall' altro . . . non ho mai visto niente che mi permettesse di ammettere che una cellula epiteliale adulta possa

trasformarsi in una mucipara o viceversa«. Dobbiamo ritenere che queste cellule si originino da elementi migranti, da leucociti? L'idea non sarebbe nuova del tutto, perchè il DAVIDOFF (87) credette vedere una »genetische Beziehung zwischen den Leucocyten und dem Epithel« (pag. 515). Ora non v'è dubbio per me che i suoi »Secundärkerne« dell'epitelio non sono altro che i nuclei degli amebociti; ma egli non ha davvero dimostrato, come pretenderebbe (pag. 510), che quei suoi nuclei secondari si trasformino nei nuclei primari (Primärkerne) dell'epitelio. Quanto a quest'ultimo mi associo invece all'idea del BIZZOZERO, che i nuovi elementi epiteliali cilindrici si formano dai nuclei basali (vedi le mie fig. 7 e 8), da quei nuclei, cioè, che si vedono tanto numerosi nella parte basale dell'epitelio; per quanto io, meno fortunato del BIZZOZERO, non sia mai riuscito a vederne in mitosi. Se non v'è nessuna ragione plausibile per trovare un legame fra i leucociti e gli elementi dell'epitelio cilindrico, ve ne sarebbe forse per trovarla fra i leucociti e le cellule caliciformi? Non lo credo. Recentemente lo CHATIN (96) ha creduto di vedere degli elementi speciali del connettivo grandi 50, 100 e fino 300 μ (!) muoversi (in dove? da dove?) per recarsi all'epitelio superficiale e trasformarsi in cellule di secrezione. Sarebbero questi elementi i fagociti. Ma non mi pare che le due note dello CHATIN abbiano maggiore attendibilità delle altre due che ho già criticate. Egli non merita d'esser preso in seria considerazione, e d'altra parte dimostrerò più avanti che la pretesa fagocitosi dei lamelli-branchi è del tutto insussistente. Qui dirò soltanto che in più migliaia di sezioni di ogni parte del corpo dell'ostrica, da me esaminate, non m'è mai capitato di vedere un solo elemento che avesse le dimensioni supposte dallo CHATIN.

Nella mia seconda Nota (95) avevo detto che appunto in queste giovani cellule caliciformi, alle quali ho dato il nome di clave, arrivano gli amebociti per caricarsi delle granulazioni verdi. A scanso di equivoci, preciso qui che non intendo già che vi sia nessuna relazione morfologica fra i granuli delle cellule caliciformi e i granuli di sostanza verde. Vi è soltanto fra la cellula di secrezione e i cumoli di granulazioni verdi un rapporto topografico; e precisamente queste si raccolgono nello spazio lasciato dalla clava. Così pure, quando essa s'allunga per arrivare alla superficie dell'epitelio, lo spazio più facilmente permeabile, occupato fra una cellula epiteliale e l'altra dal filamento della cellula di secrezione, è la via preferita dei leucociti per internarsi nell'epitelio.

Fegato. Per terminare la rivista istologica della distribuzione del verde è importante esaminare questa glandula, ch' è ormai consuetudine di chiamare fegato, per quanto la parola non sia molto propria. Nel massimo dell' inverdimento il fegato, osservato dopo la fissazione e l' indurimento, mostra un distinto color verde, per quanto non così brillante come quello delle branchie e dell' intestino. All' esame delle sezioni si osserva che nelle cellule epatiche manca sempre e ovunque la sottile granulazione verde propria del protoplasma apicale delle cellule epiteliali degli organi e tessuti precedentemente descritti. Si scorgono invece nel fegato le distinte granulazioni simili a quelle che stanno alla base degli epiteli e dentro agli amebociti (vedi pag. 404). Queste granulazioni o sono ancora contenute nella cellula sanguigna, o sono, con questa, penetrate nell' interno della cellula epatica; tutte le forme di transizione fra i due stadi si possono vedere con molta facilità nell' esame di sezioni del fegato di ostriche verdi di Marennes.

Ma è di grande importanza studiare l' aspetto diverso che presentano le sezioni del fegato a seconda del diverso periodo d' inverdimento. Al principio, cioè nelle ostriche della prima metà di ottobre, mentre i soliti epiteli sono distintamente, sebbene non abbondantemente, verdi, il fegato fissato e indurito non si mostra colorato in verde, ma bensì in giallastro, ch' è la solita tinta assunta da quest' organo nelle ostriche ordinarie, dopo che l' azione dell' alcool ha disciolto le granulazioni intensamente colorate che danno al fegato fresco la colorazione giallo-rossiccia, che ha comunemente. All' esame microscopico non si scorge ancora una sola granulazione verde, dentro alle cellule epatiche, ma qua e là, sia nella cavità del lobulo epatico, sia, ancor più facilmente, nel connettivo esteriore, si possono vedere alcuni amebociti carichi di granulazioni verdi.

In un periodo d' inverdimento più avanzato una sezione del fegato ha l' aspetto rappresentato dalla figura 15. Gli amebociti con granulazioni verdi si scorgono facilmente, non soltanto nel connettivo e nel lume del lobulo epatico, ma anche proprio nell' interno delle cellule epatiche.

Nel massimo dell' inverdimento, dopo la fissazione e l' indurimento, tutto il fegato si presenta d' un colore verde marcatissimo. L' esame delle sezioni mostra che, oltre ai soliti amebociti carichi di granulazioni verdi, un gran numero di queste ultime riempie, si può dire, tutte le cellule epatiche. Ed è a questo periodo d' inverdimento che in alcuni punti si scorgono dei condotti epatici ripieni di

amebociti, il maggior numero dei quali contiene delle granulazioni verdi-giallastre; appunto uno di tali condotti è disegnato alla figura 16.

Devo osservare a proposito di questi ultimi ch' essi non devono essere confusi colle ramificazioni dei ciechi gastrici, che fanno comunicare lo stomaco col fegato. Infatti, mentre tali ciechi hanno una mucosa assai simile a quella della parete dello stomaco, cioè formata da cellule lunghe, sottili, cigliate, con nucleo ovoidale, ogni tanto interframmezzate da »Becherzellen« e col lume del tubo privo sempre di amebociti; i dotti epatici, invece, come quello della fig. 16, hanno la parete formata da cellule, un poco più brevi, ma simili del resto alle cellule dei lobuli epatici; cioè larghe, corte, senza ciglia, con un vistoso nucleo tondeggiante, e il lume di questi dotti epatici è occupato da numerosi amebociti. Si tratta dunque di due formazioni del tutto diverse e che non hanno fra loro rapporto alcuno.

Quando l' inverdimento è in diminuzione, se si esaminano ostriche già da lungo tempo tolte ai parchi di Marennes, si vedrà che il fegato è privo di amebociti carichi di granulazioni verdi, ma che nell' interno delle cellule epatiche si riconoscono numerose granulazioni d' un verde ingiallito, come si può scorgere nella fig. 17.

Amebociti. Nei vasi sanguigni è poco frequente trovare un amebocito carico di granulazioni verdi, ma talvolta se ne scorge uno o due in mezzo a molti altri scolorati; alla fig. 18 ho riprodotto la sezione di un' arteria del processo orale, nella quale si vede un amebocito con delle granulazioni verdi. Più frequenti, invece, sono gli amebociti, carichi di granuli verdi, alla base dell' epitelio, nel connettivo sottoepiteliale e in quello che sta fra mezzo ai lobuli epatici. Ho già detto che dentro certi condotti del fegato e nell' interno dei lobuli gli amebociti verdi sono straordinariamente numerosi.

L' esame istologico di tutti gli altri organi conferma l' esame macroscopico; in nessuno di essi, all' infuori cioè di quelli qui sopra specificatamente descritti, non si trova mai nè protoplasma cellulare di colore verde, nè granulazioni verdi, nè amebociti carichi di granuli verdi o col protoplasma inverdito. Osservazioni numerose, attente e ripetute in tutti i periodi dell' inverdimento, mi hanno persuaso con tutta certezza ch' esso è limitato agli organi e agli elementi di cui ho parlato in questo capitolo.

4. La causa dell' inverdimento.

Indicata la distribuzione della colorazione verde, è necessario occuparsi della causa dell' inverdimento.

Un terzo di secolo fa il COSTE (61) scriveva: »Les auteurs ne sont pas d'accord sur l'origine de ce principe colorant. Les uns prétendent que c'est le sol lui même qui le contient; d'autres que c'est un animalcule, *Vibrio ostrearius*, ou certaines algues qui le donnent; d'autres enfin l'attribuent à une sorte d'ictère, ou à une maladie du foie, dont la sécrétion surabondante teindrait en vert le parenchyme de l'appareil respiratoire des animaux influencés par le régime auquel on les soumet dans les claires.«

E dopo trentacinque anni noi siamo precisamente allo stesso punto! Tanto è difficile alla verità farsi strada anche nel campo della scienza; tanto essa è confusa cogli errori, che questi possono essere preferiti a quella!

Abbiamo già visto nel primo capitolo che tutti gli autori recenti hanno ammessa per dimostrata l' ipotesi antica, e dal PUYSEGUR fatta sua, che l' inverdimento delle ostriche di Marennes è dovuto alla *Navicula fusiformis*, di cui esse nutronsi specialmente. Questo non è vero, come si può persuadersene dai seguenti esami, che riporto dai miei appunti:

6 dicembre. Apro un' ostrica appena arrivata da La Tremblade, e non ancora rimessa nell' acqua. Colorazione verde intensa e colla distribuzione nota. Esamino il contenuto dell' intestino: in quello terminale non trovo un solo guscio di *Navicula*, e la mucosa è verdissima; nel circondante alcune alghe e fra queste poche *Navicula*, mucosa molto verde; stomaco con parecchie alghe, fra le quali qualche *Navicula*, mucosa niente affatto verde; esofago e faringe mucosa verde, ma nessuna alga.

7 dicembre. Faccio l' esame di altre due ostriche; risultati identici a quello di ieri.

9 dicembre. Esamino l' ultima ostrica tenuta all' asciutto ed ancora vivente. Intestino terminale come al primo esame. Stomaco e intestino discendente scolorati come sempre e senza alghe. Il circondante non è verde, anzi, specialmente nella porzione inferiore (fra lo stomaco e il cuore), ha un colore leggermente giallastro. Nel contenuto numerosissime diatomee e fra queste è abbondante la *Navicula*!

28 dicembre. Nuovo arrivo di ostriche di Marennes, giunte direttamente, ripeto l' esame su di alcune, prima di rimetterle nell' acqua. In una, osservazioni identiche a quelle fatte il giorno 9 corrente; le altre come il primo esame del 6.

Mi pare che questi fatti sieno sufficienti per distruggere l' ipotesi della *Navicula*. Se non lo fossero, mi basterà ricordare il risultato

dell' esame istologico, esposto nel capitolo precedente. Come è conciliabile quell' ipotesi colla presenza del verde nella faringe, nell' esofago e nell' intestino terminale? Come si spiega la mancanza del verde nello stomaco, la parte anteriore (verso le branchie) del quale ha certo un epitelio assimilante? E, soprattutto, come si spiega il modo identico d' inverdimento tanto negli epiteli interni che in quelli esteriori?

Fu detto dal PUYSEGUR che le ostriche verdi levate dall' acqua dove vive la *Navicula* perdono subito il colore, e il PELSENER l' ha confermato, anzi fissò a 36 ore la durata massima della colorazione. Tali asserzioni farebbero certamente ridere qualunque rivenditore d' ostriche, perchè sono assolutamente contrarie alla verità. Riporto anche qui alcuni dati del mio protocollo:

7 marzo 1894. Apro due ostriche arrivate il 20 febbraio, una è molto verde, l' altra pochissimo.

19 marzo. Apro altre quattro ostriche della stessa provenienza, una è verdissima, le altre tre poco, ma sempre in modo visibile.

17 aprile. Altre quattro della stessa provenienza, risultati identici.

3 giugno. Altre tre come sopra. Sono completamente scolorate. Trascorsero dall' arrivo cento giorni.

20 e 23 febbraio 1896. Apro cinque ostriche partite da Marennes il 24 dicembre e tenute in mare alla Spezia. Una è giallastra, le altre quattro distintamente verdi.

Si vede dunque che le ostriche verdi di Marennes, tenute in acque che non hanno la proprietà di dare l' inverdimento, si scolorano lentamente, tanto che il verde è visibile nel maggior numero dei casi, anche ad occhio nudo, dopo due mesi dall' arrivo.

Se questi elementarissimi fatti fossero stati notati una volta sola dagli osservatori che mi precedettero, essi si sarebbero risparmiati molti altri errori, nei quali caddero appunto perchè accettarono senza controllo le affermazioni del PUYSEGUR. Partiti dal preconcepito che il verde era assorbito colla *Navicula*, e vedendo inverdire i palpi e le branchie, supposero, senza far nessun esame per constatarlo, che la sostanza verde assimilata dall' apparato digerente fosse dannosa all' ostrica e perciò venisse eliminata attraverso l' epitelio dei palpi e delle lamine branchiali. Abbiamo visto che il LANKESTER e lo CHATIN credettero le »Becherzellen« incaricate dell' escrezione, e che al primo autore nell' esaminare a fresco un pezzo di lamella capitò di vedere degli elementi uscire, carichi di granulazioni verdi, dall' epitelio e perdersi nell' acqua circostante. Il LANKESTER non riconobbe in tali elementi gli amebociti del sangue ed affermò ch' essi erano le cellule di secrezione diventate semoventi!

Il DE BRUYNE e il PELSENEER rilevarono l' errore in cui era caduto l' illustre professore di Oxford, ma ne commisero un altro, sostenendo che gli amebociti erano organi di escrezione ed anche dei fagociti. Anzi il DE BRUYNE (95) volle vedere in questa escrezione, spesso accompagnata da fagocitosi, un fenomeno tutt' altro che raro negli epiteli dei palpi e delle branchie dei lamellibranchi. Così è che, secondo tali idee, la colorazione verde delle ostriche di Marennes negli epiteli esteriori sarebbe dovuta all' accumularsi degli amebociti che, caricatisi nel sangue delle granulazioni verdi, cercano la via d' uscita, insinuandosi fra le cellule epiteliali e talvolta anche rodendone, mangiandone parecchie. È adunque necessario soffermarsi ad esaminare quanto c' è di vero in questa diapedesi escretoria, in questa pretesa fagocitosi. Io ho già sollevato altrove delle gravi obiezioni alle vedute del DE BRUYNE, e farei a meno volentieri d' insistere su questo argomento se ciò non fosse necessario al mio assunto, specialmente per quel che dovrò dire più avanti circa l' ufficio degli amebociti nell' epitelio. E non è da trascurare anche la circostanza che tale supposta fagocitosi e tale supposta diapedesi escretoria, ritenute per vere dal DE BRUYNE, acquistarono credito nella scienza perchè ottennero l' approvazione del LANKESTER e del PELSENEER. Occorre quindi prendere in disamina le osservazioni del sullodato autore belga.

Nell' esame di un pezzo di epitelio, tagliato dalle branchie o dai palpi e messo subito sotto al microscopio, sarà capitato a chiunque di vedere degli amebociti uscire fuori dal tessuto e poi spandersi nel liquido ambiente. Ma a nessuno venne in mente di dare importanza a tali osservazioni perchè era troppo elementare l' obiezione che quel pezzo di tessuto si trovava in condizioni ben lontane da quelle normali all' organismo. Non fu di questa opinione il De B., che si compiacque a soffermarsi lungamente e a figurare tali fenomeni di patologia sperimentale, da lui reputati fisiologici. E reso accorto che tali procedimenti operatori non potevano venire accolti senza diffidenza, egli credette di farli accettare accompagnandoli da osservazioni fatte su pezzi di tessuto rapidamente uccisi e fissati, le quali confermavano i risultati cui era pervenuto coll' esame a fresco. Ma egli commise due gravi dimenticanze. Non si ricordò prima di tutto che negli epiteli da lui esaminati esistono le »Becherzellen«, alle quali aveva accennato nel principio del suo lavoro (pag. 10), anzi cadde nell' errore opposto a quello del LANKESTER, credendo che le cellule di secrezione descritte da quest' ultimo sieno dei »leucocytes

à boules (pag. 19)« e infatti nella tav. 2, fig. 9 e 10 disegna e nel testo, a pag. 26—27, descrive dei leucociti che sono invece delle vere cellule di secrezione. In secondo luogo il DE BRUYNE dimentica che i lamellibranchi possiedono dei nervi e dei muscoli, e che perciò devono soffrire delle gravi alterazioni, a cagione dello shock operatorio, se vengono amputati senza prima essere insensibilizzati sottoponendoli a narcosi profonda. Conseguenza della prima dimenticanza fu che il DE BRUYNE credette erosioni epiteliali le lacune lasciate dalle cellule di secrezione sgusciate dalle loro nicchie durante i maneggi operatori; conseguenza della seconda dimenticanza fu di prendere per un fenomeno normale la fuoruscita dei leucociti. Questa era invece una diapedesi sperimentale, dovuta alla pressione del liquido sanguigno, impedito al ritorno in seguito alla forte contrazione tetanica, provocata dall' amputazione. Gli amebociti, numerosi nell' epitelio (come dirò a suo tempo), subivano le conseguenze di questo aumento di pressione e trovavano facile la via all' uscita dall' epitelio, da una parte per la poca resistenza che questo presentava, non essendo più in condizioni normali, e dall' altra per le frequenti cavità lasciate dalle cellule di secrezione sgusciate durante i maneggi operatori.

Che così vadano le cose potrà persuadersene chiunque confrontando due sezioni di palpo o di lamella branchiale ottenute, una senza avere preparato il tessuto con tutte le precauzioni da me indicate nel capitolo secondo, e l' altra invece seguendole accuratamente. Mentre la prima sezione mostrerà sovente delle cavità intraepiteliali, e numerosi amebociti fuorusciti, la seconda avrà l' epitelio integro, salvo qualche cavità che rappresenta, senza dubbio, la nicchia di una corrispondente cellula di secrezione; e sarà ben raro scorgere qualche amebocito uscito dal tessuto, e in questo caso ci si persuaderà facilmente che trattasi di elementi esportati dalla superficie di sezione per opera del coltello o dei lavaggi fatti prima di chiudere la sezione. E specialmente nelle fette più spesse, e quindi più consistenti, sarà ben difficile scorgere un solo amebocito fuori dall' epitelio.

In conclusione, una distruzione cellulare per opera dei leucociti non esiste negli epiteli delle branchie e dei palpi, come ritengo non esistere in essi una diapedesi escretoria degli amebociti.

Del resto l' esame istologico, da me esposto nel capitolo precedente, distrugge, se mai vi fosse bisogno di altri argomenti, l' ipotesi del PELSENEER e del DE BRUYNE, accettata dal LANKESTER, che

l' inverdimento delle lamelle branchiali e dei palpi, nelle ostriche di Marennes, sia dovuto agli amebociti carichi di granulazioni verdi, che si preparano ad un esodo escretorio attraverso l' epitelio. Se così fosse bisognerebbe che la colorazione verde esistesse solo negli amebociti e non già nel protoplasma delle cellule epiteliali cilindriche, come sempre succede. Che se poi qualcuno volesse, per sostenere l' idea dell' escrezione, credere che l' amebocito cede la sostanza verde al protoplasma delle cellule epiteliali, risulterebbe ad ogni modo che la diapedesi non avrebbe ragione di essere.

Mi pare di avere dimostrato ad esuberanza che delle tre cause d' inverdimento, quella maggiormente accreditata, e che veniva riferita alla sostanza colorante della *Navicula*, va certamente esclusa.

Quanto ai risultati che ottenne il LANKESTER dall' esame spettroscopico della sostanza verde delle ostriche di Marennes e di quella che si trova nel protoplasma della *Navicula fusiformis*, e secondo i quali esisterebbe una perfetta identità fra le due materie coloranti, non ho nessuna difficoltà ad accettarli per buoni. Soltanto che, invece di credere che le ostriche inverdiscono perchè si nutrono della *Navicula*, dobbiamo ammettere che si colorano egualmente questa come quelle perchè il protoplasma della diatomea è capace di fabbricare la sostanza verde, al modo stesso che la fabbrica il protoplasma dell' epitelio dell' ostrica. I due fatti sono in correlazione, ma non già che l' uno sia l' effetto e l' altro la causa; come ho detto da principio, questo semplice e logico ragionamento era stato fatto molti anni or sono da un certo BRÉBISSON, citato dal PUYSEGUR.

E siccome non v' ha dubbio che la sostanza verde è un composto organico differente da tutti quelli finora conosciuti, sia vegetali che animali, come hanno dimostrato in modo patente due chimici illustri, il DUMAS e il BERTHELOT, mi pare giusto accettare il nome che a quella sostanza volle dare il LANKESTER, e la chiamerò anch' io »marennina«.

Passiamo adesso alla seconda causa, la malattia di fegato, »l'ictère«, citata dal COSTE. Ammesso intanto che il verde si fabbrichi nei lobuli epatici la causa ci resterebbe egualmente inspiegabile, a meno che non ci si contenti di vane parole. Perchè s' è giusto parlare d' itterizia quando vediamo le sostanze della bile nella pelle di un uomo, che significato può avere tale parola quando si tratta delle ostriche verdi? L' HERDMAN (96) dice di aver visto delle ostriche Americane (*O. virginica*?) di color verde-giallastro col fegato istologicamente anormale, raggrinzito (shrunken)

e degenerato. Ma che vuol dire un'asserzione tale, quando non è accompagnata da nessuna spiegazione, da nessuna prova di fatto che la sostenga? ed io credo ch'egli sarebbe imbarazzato seriamente se dovesse dirci che cosa intende per fegato istologicamente degenerato o anormale. Del rimanente è giusto ricordare che l'HERDMAN esclude, per le ostriche di Marennes, che si tratti di malattia¹.

Ma la migliore dimostrazione che il fegato non è la causa dell'inverdimento si ha dallo studio istologico delle ostriche verdi, esaminate quando principiano ad inverdire, quando sono molto verdi, quando cominciano a sverdire, e quando sono completamente scolorate.

Le ostriche di ottobre hanno già l'epitelio dei palpi, delle lamelle branchiali e dell'intestino di color verde, nei luoghi e nei modi ricordati nel capitolo precedente. Il fegato invece è completamente sprovvisto di colorazione verde; e tutto al più si riesce a scorgere qualche amebocito con granulazioni verdi nel connettivo che sta framezzo ai lobuli epatici, e raramente nella cavità del lobulo. In un periodo più avanzato gli amebociti con granulazioni verdi sono più abbondanti, tanto nel connettivo che nel lume del lobulo; inoltre qualche amebocito si vede già penetrato nell'interno della cellula epatica. Questa seconda fase è rappresentata dalla figura 15. Più innanzi, quando l'inverdimento comincia a decrescere ma si scorge ancora visibilmente nei soliti epiteli, non è raro trovare amebociti, dappresso o dentro ai lobuli, con granulazioni verdi; però dove esse sono straordinariamente abbondanti è nell'interno della cellula epatica, e si deve notare anche la circostanza che il colore verde è più smorto, quasi giallastro. È questo terzo periodo quello che è dato dalla figura 17. Più tardi, quando le ostriche verdi mancano da lungo tempo da Marennes e che sono già completamente, o quasi,

¹ Dell'HERDMAN devo rilevare un'altra cosa. Nel lavoro citato (pag. 15 dell'estratto) scrive: »One author, however, CARAZZI, considers that the macroblasts are surface cells, which are taking up substances from without for purposes of nutrition« ecc. ecc.

Ora nella mia lettera alla »Nature« (Vol. 52 n. 1357) si legge: his gland-cells (del LANKESTER) are the Becherzellen ... which are inside the branchial epithelium, and not on its surface ... the gland-cells are never green! ... the green colouration is merely due to a true assimilation of nutritive substance, which takes place through the agency of the epithelium ecc. ecc. — Se l'HERDMAN capisce alla rovescia quando si scrive nella sua lingua, che cosa farà dire mai agli autori stranieri quando scrivono nella propria?

sverdite negli epiteli, mostrano il fegato senza amebociti verdi, ma con delle granulazioni giallastre dentro alla cellula epatica. E non può sorgere dubbio che queste ultime non sieno altro che una modificazione ulteriore di quelle verdi e verdi-giallastre che esistevano nelle fasi surricordate dell' inverdimento.

Questi fatti certi e indiscutibili, osservati ripetutamente, escludono senz' altro anche la seconda causa. Non è vero, dunque, che le ostriche inverdiscano per uno speciale funzionamento o malattia del fegato.

Rimane, per esclusione, la terza causa, cioè che l'inverdimento dipenda da una speciale proprietà del fondo dei parchi e delle »claires« vicini alle rive della Seudre, e nei quali le ostriche sono tenute a soggiornare per qualche tempo.

Che questa non fosse una supposizione senza fondamento risulta già da quello che scriveva il COSTE e che, come tante altre cose, sfuggi ai miei predecessori. Riporto qui le sue precise parole: »De ces trois opinions, celle qui attribue à la nature du sol le pouvoir de verdier semblerait la plus conforme au véritable état des choses. C'est du moins, ce que tendent à établir, d'une part, l'analyse comparative des terres prises dans les claires qui verdissent et dans celles qui n'ont pas cette propriété, et, de l'autre, les expériences de la Commission de pisciculture de La Rochelle. Ces expériences prouvent que les marnes bleues-verdâtres ont, comme le territoire de Marennes et au même degré, la propriété de colorer les huîtres; en sorte que, d'après les résultats que cette commission a obtenus dans les bassins artificiels où elle poursuit ses essais, on serait en droit de conclure que, partout où l'on pourra organiser, sur nos côtes, des réservoirs argileux semblables à ceux dont je parle, on réussira à créer la même industrie que sur le litoral de l'anse de la Seudre« (pag. 118).

E dopo letta quest' ultima frase e la lunga nota nella quale il BERTHELOT comunica al COSTE i risultati della sua analisi chimica della sostanza verde¹, verrebbe quasi voglia di chiedersi: Ma che il PUYSEGUR abbia tirata fuori la storiella della *Navicula* per mettere fuori di strada apposta chi avrebbe potuto fare concorrenza all' industria delle rive della Seudre? La burla sarebbe davvero ben riu-

¹ Di quella nota riporto almeno due righe: »Chauffée au rouge et incinérée, puis traitée par une goutte d'HCl dilué, elle [la materia verde] a précipité en bleu le prussiate de potasse, ce qui indique la présence d'une proportion sensible de fer dans les tissus incinérés«.

scita, s' essa potè far dire tanti grossi errori anche a naturalisti illustri!

Del resto, dopo le ricordate osservazioni, altre recenti e non meno importanti furono pubblicate nel 1894 da due chimici francesi AD. MUNTZ et A. CHATIN¹. Riportati i dati dell' analisi del BERTHELOT, i due autori osservano non esserci alcun rapporto di composizione fra il verde delle ostriche e la clorofilla delle piante, come pure colle diverse altre specie di materia colorante conosciuta, tanto di animali che di vegetali. E giustamente rilevano che questa conclusione riduce a niente l' opinione secondo la quale la viridità delle ostriche sarebbe dovuta al semplice assorbimento di alghe verdi o ad una malattia del fegato.

Nell' analisi del fango secco dei parchi o »claires« di Marennes, a febbraio, essi trovarono 77,8 per mille di sesquiossido di ferro. Ora è da notare che durante l' estate il fondo dei parchi è tenuto all' asciutto, esposto all' azione dell' ossigeno e della luce, e quindi si compie una ossidazione della superficie del terreno (questo viene anche zappato) e la conseguente trasformazione del solfuro e del protossido di ferro, contenuto nelle argille che costituiscono il terreno dei parchi, in sesquiossido ed anche in solfato di ferro. Infatti alla fine del »parage«², cioè al tempo in cui verrà messa nuovamente l'acqua nei parchi, il fango, primitivamente di color nero, s' è trasformato in fango ocreo.

I due chimici passarono in seguito all' analisi delle ostriche e studiarono comparativamente la quantità di ferro delle branchie e del rimanente del corpo; questo confronto non poteva avere molta importanza per essi, anzi lascia dubbioso assai il lettore che pensa all' inverdimento come ad un fenomeno che si specializza nelle branchie. Ma quelle cifre sono evidenti per me che ho dimostrato quanta parte di pigmento verde si trovi nell' intestino e nel fegato. Un altro dato oscuro per i due chimici, ma di una ben facile spiegazione per me, è questo: in ostriche non verdi, di Cancal e delle Sables d' Olonne, essi trovarono una quantità di ferro maggiore di quella contenuta nelle ostriche verdissime di Marennes del mese di febbraio. Si vedrà nel capitolo seguente la ragione di questo fatto³.

¹ Da non confondersi con JEAN o JOANNES CHATIN.

² I preparativi che si fanno alle »claires« nei mesi estivi costituiscono, secondo l' espressione degli ostricoltori della Seudre, il »parage du sol«.

³ Copio dagli autori succitati queste due tabelle:

Se si tien conto che gli ostricultrici della Seudre, per ottenere l'inverdimento delle ostriche, cambiano l'acqua delle »claires« molto raramente¹, noi abbiamo ben chiara la spiegazione del fenomeno. Le ostriche immerse nei fondi di Marennes formano, coll' attività del protoplasma delle cellule epiteliali, una sostanza pigmentata, che, in quel caso speciale, prende il colore verde perchè nell' acqua si trovano disciolti diversi composti, fra i quali ha certo una notevole (ma non esclusiva) importanza il sesquiossido e forse anche il solfato di ferro. L' inverdimento continua, anzi si accentua sempre più, finchè il liquido è sempre lo stesso e finchè i principi minerali, disciolti in quell' acqua, non sono stati consumati dagli animali che vi stanno immersi per inverdire e che sono sostituiti da altri ogni dieci o quindici giorni. Ma col finire dell' inverno quei principi solubili e assimilabili sono esauriti ed allora cessa l' inverdimento. È necessario asciugare i parchi, lasciarli per alcuni mesi esposti al forte calore del sole, che secca e fa screpolare il fango, ed all' azione prolungata dell' ossigeno, aiutata anche dalla zappatura, perchè nuove quantità di protossido e di solfuro di ferro vengano trasformate, per ossidazione, in sesquiossido e solfato di ferro.

E non solo per conseguenza logica dell' esame dei fatti che ho esposti, e per la necessaria esclusione delle altre due pretese cause, noi dobbiamo concludere che l' inverdimento è dovuto alla speciale qualità del fondo dei parchi di Marennes, ma anche, e soprattutto, perchè soltanto con questa causa s'accordano i risultati dell' esame istologico esposti nel terzo capitolo, risultati incompatibili colla supposizione della *Navicula* o della malattia di fegato.

Analisi del Ferro nelle ostriche

Marennes (a febbraio)	ferro % nelle branchie	gr. 0,07,	nel resto del corpo	0,032
Cancale (a febbraio)	» » » » »	0,038	» » » »	0,024
Cancale (a maggio)	» » » » »	0,08	» » » »	0,047
Arcachon (a maggio)	» » » » »	0,06	» » » »	0,035
Sables-d' Olonne (aprile)	» » » » »	0,08	» » » »	0,04

Marennes verdissime,	ferro % nelle branchie	gr. 0,0702
Arcachon debolmente verdi	» 0,0625
Cancale, bianchissime (febbraio)	» 0,0379
Cancale, bruno verdi (maggio)	» 0,0504
Sables-d' Olonne, verde bruno scuro	» 0,0833

¹ »Celles qui se trouvent aux distances les plus favorables boivent deux ou trois jours avant et autant après les grandes marées . . . l'eau ne s'y renouvelle jamais entièrement, ou, si ce complet renouvellement a lieu, ce n'est qu'à assez grands intervalles.« (COSTE, op. cit. pag. 110.)

A chi m' incolpasse di aver trascurato i metodi microchimici per l'indagine dei metalli contenuti nella marennina, farò osservare che in questo caso si tratta di un composto organico, e non già d'un semplice sale del ferro (sia con un acido organico che con uno inorganico). E mi permetto di aggiungere che i risultati ottenuti recentemente da qualche autore, nell' investigazione del ferro nei composti organici, sono assai discutibili. E richiamo a questo proposito l' attenzione del lettore sulle meditate dichiarazioni esposte dal BUNGE nella sesta lezione del suo »Trattato di Chimica fisiologica«. Interessanti ricerche biologiche, per controllo delle mie osservazioni, potrebbe fare con facilità chi risiedesse a Marennes, o per lo meno sulle coste vicine.

A me rimane adesso da esaminare quale sia il significato fisiologico della marennina, e vedere per quanto è possibile, in qual modo essa, dopo essere stata fabbricata dal protoplasma della cellula epiteliale, venga assunta dall' amebocito, per poter essere trasportata al fegato.

5. Gli amebociti, loro relazioni colla marennina; significato fisiologico di questa.

Che il pigmento verde sia fabbricato dal protoplasma delle cellule epiteliali cilindriche dell' intestino, dei palpi, delle branchie e, talora, anche del mantello, non può esser più messo in dubbio; che gli amebociti trasportino la marennina dalle mucose al fegato, risulta del pari in modo evidente. Sarebbe certamente di grande interesse poter conoscere in qual maniera si compie il fatto intimo del passaggio dalla cellula epiteliale all' elemento sanguigno, ma in gran parte tale ricerca non ho potuto fare in modo soddisfacente; tuttavia non è senza importanza prender nota di alcuni fatti che ho constatati intorno a questo argomento.

Amebociti. La mia attenzione doveva specialmente rivolgersi a questi elementi, tanto importanti, ma tuttora poco studiati; infatti ricerche di qualche interesse sugli amebociti dei molluschi non abbiamo all' infuori di quelle del CATTANEO (89, 91), del GRIESBACH (91), del CUÉNOT (91) e del KNOLL (93). Ai due primi e all' ultimo si devono specialmente ricerche di morfologia, mentre il CUÉNOT s'occupa di preferenza dell' importanza funzionale del sangue e delle glandule da cui traggono origine le sue cellule.

Al CATTANEO spetta il merito della distinzione fra gli ame-

bociti osservati in buone condizioni di vita, cioè appena levati dal sangue, e quelli alterati e che da molti osservatori erano stati descritti come normali. Basta un solo minuto primo perchè gli amebociti perdano la loro forma ed emettano i sottili ed affilati prolungamenti sarcodici, ben diversi dai veri pseudopodi (più scarsi, di solito tozzi, ed anche quando allungati, colla parte terminale non già appuntita ma clavata). Dove non convengo pienamente col CATTANEO è nel ritenere che la forma globulare dell' amebocito sia già un segno di regressione. Secondo me questa comincerebbe soltanto coll' emissione dei processi sarcodici. Del resto nel suo secondo lavoro il CATTANEO ammette che la forma ovale o globulare senza pseudopodi può essere normale (pag. 36). Negli esami a fresco del sangue contenuto nel cuore di ostrica, fatto colla maggiore rapidità possibile, ho visto amebociti tondeggianti e talvolta con brevi pseudopodi. Solo più tardi compaiono le estrusioni sarcodiche. All' esame delle sezioni, nei pezzi preparati senza prima sottoporre l' animale all' anestesia, ho visto sovente dei leucociti con prolungamenti sarcodici ed altri tondeggianti. Nei pezzi di animali anestesizzati gli amebociti sono o tondeggianti o con brevi e tozzi pseudopodi. Le solite dimensioni sono da 12 a 15 μ ¹.

Un fatto che ho constatato nell' esame delle sezioni (preparate colle avvertenze tante volte indicate) e che ritengo non ancora conosciuto², è il duplice aspetto assunto dagli amebociti. Non intendo parlare del contenuto diverso del loro protoplasma, dovuto alla presenza di granulazioni provenienti da sostanze estranee; errarono certamente i non pochi osservatori che, basandosi su quelle differenze di contenuto, vollero classificare gli amebociti in diverse categorie, mentre morfologicamente l' amebocito è sempre uno, ed è priva di qualunque importanza una differenziazione basata sulla diversità del materiale estraneo assunto dal protoplasma cellulare. Ma io voglio riferirmi ad una

¹ In una breve nota il CATTANEO (92) riferisce l' osservazione seguente. Una *Glomeris* ed una *Helix* in letargo avevano gli amebociti di forma globulare, o tutto al più con una o due ottuse e brevi protuberanze e col corpo cellulare foggiate a callotta o a disco. Negli stessi animali, osservati durante la buona stagione, gli amebociti erano o con lunghi e ramificati pseudopodi (*Helix*), o arrotondati, con uno, due brevi pseudopodi (*Glomeris*), e tutti sempre col corpo cellulare sferico globulare. Sarebbe da vedere se fra il letargo e l' anestesia provocata vi fossero dei rapporti.

² Il MAZZARELLI (Monografia delle Aplysiidae, Napoli 1893), dice a pag. 96: >Gli amebociti sono di forma tondeggianti e di due sorta: grandi e piccoli«. In fatti nella tav. 4, fig. 7 ne figura uno più grande e due più piccoli; ma non ne fa altrimenti parola.

duplicità costante nell'aspetto dell'amebocito indipendente dalle sostanze estranee, e che presenta anche tutte le forme intermedie da un aspetto all'altro, si che ne concludo che a quella duplicità corrisponde un diverso atteggiamento funzionale. Già nella figura 3 in *a* e *a*, sono rappresentati i due aspetti dell'amebocito, ed essi possono scorgersi meglio, ad un ingrandimento doppio, nella fig. 20. Nel primo aspetto (*a*) l'elemento presenta un jaloplasma più denso e sottilmente granuloso, il nucleo ha la figura dei soliti nuclei in riposo, cioè colla membrana nucleare distintamente visibile e colla sostanza cromatica sparsa a piccoli tratti nel carioplasma. Nel secondo aspetto (*a*₁) l'elemento appare anche, di solito, rimpicciolito, ma i caratteri essenziali che lo distinguono facilmente sono: la tenuità, la perfetta omogeneità del jaloplasma e la contrazione del nucleo, che resta intensamente ed uniformemente colorato, senza distinzione di membrana nucleare e di filamenti cromatici. Molto spesso il jaloplasma intorno al nucleo è così trasparente che forma come un alone chiaro che va sfumando verso il protoplasma più esterno. La prima volta che avvertii questa duplicità fu nell'esame di una sezione colorata colla safranina, ed era ovvio il dubbio che si trattasse di un effetto della colorazione, la quale si sa che agisce in modo capriccioso¹; ma ho potuto constatare che tale diversità si scorge bene anche nelle sezioni colorate coll'emallume, ed ancor meglio in quelle in cui all'emallume era fatta seguire l'eosina. In queste ultime l'amebocito dell'aspetto *a* presenta il jaloplasma leggermente colorato anch'esso dall'emallume, e niente dall'eosina; nell'aspetto *a*, questa tinta colora sensibilmente il protoplasma cellulare, in mezzo al quale spicca l'azzurro intenso del nucleo. Anche l'emallume seguito da safranina, o il solo carmallume, mantengono la distinzione fra i due tipi; la differenza dei nuclei è poi costante e manifesta con tutte le sostanze coloranti adoperate.

Un secondo dubbio si presenta, che la diversità d'aspetto sia un risultato del fissativo, perchè le sezioni di cui ho parlato finora erano ottenute soltanto da pezzi di ostrica fissate col liq. del GILSON. Ma le stesse differenze ho riscontrato negli amebociti di pezzi di branchia fissati col liq. dell'HERMANN o del FLEMMING. Anzi nei miei appunti del 1893 trovo un disegno di un pezzo di lamella

¹ Del rimanente dire che l'azione della safranina è capricciosa, non è che una frase fatta per nascondere la nostra ignoranza, e che può fare il paio colla solita espressione: l'eccezione conferma la regola!

branchiale fissata col liq. dell' HERMANN, e in una lacuna vedo raffigurati due amebociti coi due aspetti diversi del nucleo; e si noti ch' io allora non mi occupavo degli elementi del sangue, ma soltanto della struttura delle branchie.

Anche, si potrebbe obiettare che i due aspetti dipendano dall' azione del rasoio, il quale taglia a punti di spessore diverso, o non taglia del tutto, il corpo dell' amebocito. Ma, evidentemente, in questo caso al nucleo più chiaro dovrebbe corrispondere il jaloplasma più chiaro e, viceversa, al nucleo più scuro il jaloplasma più denso. Invece, come abbiamo visto, i rapporti sono inversi.

Sembrami dunque di poter concludere che due sono gli aspetti normali dell' amebocito, ai quali corrisponde una diversità funzionale, ma non una differenza morfologica; infatti, se si volesse ammettere quest' ultima non si potrebbe spiegare l' esistenza di tutti gli stadi di transizione dal primo al secondo aspetto.

La seconda fase funzionale dell' amebocito (α) richiama alla memoria l' aspetto del nucleo in divisione iniziale. Che i nuclei degli amebociti si dividano anche nei molluschi non può più essere messo in dubbio. L' APÁTHY (87) l' aveva osservato per il primo nelle najadi e il CATTANEO nei cefalopodi, ed è strano che lo neghi recisamente il GRIESBACH nei lamellibranchi. »Ich habe,« egli dice, »in den Leucocyten der Acephalen, welche dem Herzen lebenskräftiger Thiere entstammten, weder eine directe Theilung oder eine Fragmentirung im Sinne ARNOLD's, noch eine mitotische Kerntheilung, wie sie APÁTHY gesehen haben will, wahrzunehmen vermocht (pag. 77)«. Anche il CUÉNOT, che nel suo precedente lavoro parlando dei leucociti dei vertebrati aveva almeno ammessa »une scission accidentelle du noyau«, nella sua più recente pubblicazione (91), nelle conclusioni generali, scrive: »je ne crois pas que les amibocytes puissent jamais se reproduire par division, comme le pensent LÖWIT et d'autres auteurs (pag. 655)«. Ma al CUÉNOT non è sfuggita la frammentazione del nucleo, ch' egli interpreta come indizio della degenerazione, della morte dell' elemento. Più recentemente il KNOLL figura parecchi amebociti coi nuclei in divisione diretta, la quale egli ammette con una certa esitanza. »An den letzteren [figure] dürfte wohl zur Genüge ersichtlich sein, dass es sich hier in der That um directe, amitotische Theilung der Kerne handelt (pag. 465)«. Del resto anche il CATTANEO (91) nelle conclusioni del suo lavoro dichiara, »che la forma di divisione nucleare per frammentazione si appalesa come una

modalità di divisione secondaria o regredita . . . quasi una ripetizione atavica di un processo che non può giungere alla sua completa esplicazione (pag. 45)«. La divisione indiretta non è stata osservata negli amebociti dei molluschi, ad eccezione dell' APÁTHY, ed oltre che dal GRIESBACH è negata anche dal KNOLL (pag. 450).

Come si scorge da questo breve cenno, la questione è intricata; e lo è del rimanente tutta la questione dell' amitosi¹. E neanche i maestri della citologia sono d' accordo, anzi dopo i due lavori del FLEMMING (91) e del LÖWIT, nei quali il primo conclude che i leucociti dei vertebrati si dividono tanto per mitosi che per amitosi, e il secondo nega violentemente la prima, accettando soltanto la seconda, il campo è diviso in due parti. E i più col FLEMMING, il VOM RATH ecc., ammettono che la divisione diretta sia un segno di degenerazione cellulare. Ma, s' io non mi sbaglio, ogni anno che passa toglie forza sempre più a codesta maniera di vedere. E dopo il LÖWIT, il FRENZEL, il VERNON e più recentemente il MEVES, il PREUSSE ecc. (senza parlare dei botanici, anch' essi ormai numerosi), son ben molti gli osservatori che riconoscono nell' amitosi un modo di divisione molto diffuso, avente anch' esso lo scopo di riprodurre la cellula e capace di ripetersi numerose volte.

Per quel che riguarda gli amebociti delle ostriche io ho riscontrato molto frequente la divisione diretta nucleare, i nuclei doppi e le forme anulari già descritte dagli autori. Alcuni di questi amebociti, col nucleo in divisione o già diviso ho rappresentato nella fig. 19. Quale significato ha questa divisione? Se si tien conto che non ho mai potuto constatare con certezza che la divisione del nucleo fosse seguita da quella della cellula, si dovrebbe intendere che, piuttosto d' una vera divisione, trattasi di una frammentazione nucleare, come la chiamò l' ARNOLD. Sembrerebbe quindi ch' essa, secondo le opinioni già citate del CATTANEO, del CUÉNOT, del FLEMMING, del VOM RATH ecc., non debba significare altro che una degenerazione cellulare, un segno certo della morte della cellula.

Ma i risultati delle mie osservazioni si oppongono decisamente a questo modo di vedere, ed io son persuaso che la frammentazione nucleare degli amebociti è anch' essa un atteggiamento funzionale della cellula, anzi costituisce il fatto essenziale dell' assunzione della sostanza assorbita o,

¹ Vedi i riassunti annuali del FLEMMING in: *Ergebnisse f. Anatomie und Entwickl.* fino al principio del 1895.

per dir meglio, fabbricata dal protoplasma della cellula epiteliale cilindrica. E mi sovviene a questo punto una frase molto significativa del VOM RATH (95): »Amitose tritt hauptsächlich in Zellen auf, die in Folge besonderer Specialisirung einer intensiveren Assimilation, Secretion oder Excretion vorstehen« (pag. 19—20¹).

Nelle ostriche verdi gli amebociti arrivano nel connettivo sottopiteliale delle mucose esterne e di quelle delle vie digerenti, penetrano numerosi anche nelle ultime lacune dei segmenti branchiali. Qui assumono il secondo aspetto, quello che ho chiamato di attività funzionale (α), e penetrano dentro all' epitelio, non solo fra cellula e cellula, ma anche nell' interno di esse. Che gli amebociti abbondino negli epiteli funzionali si scorge dall' esame di quasi tutte le figure che accompagnano il presente lavoro; ch' essi vadano fra cellula e cellula non solo, ma penetrino anche dentro al protoplasma cellulare, come già da tempo aveva sostenuto il DAVIDOFF, è cosa certa per me, e si vede nelle figure 7^{bis} e 8. Ora è appunto negli amebociti penetrati molto avanti nell' epitelio che si trovano numerosi i nuclei in divisione o in frammentazione. Chi difende l' ipotesi della degenerazione dirà che ciò succede perchè qui nell' epitelio gli elementi invecchiati del sangue vanno appunto a finire; ma questa supposizione non s' accorda con quel che risulta evidentemente dalle mie ricerche, cioè che gli amebociti si recano nell' epitelio per assumere la marennina, che poi trasportano al fegato.

Si tenga conto di un altro fatto. Accanto alle granulazioni verdi della base dell' epitelio si trovano sempre dei nuclei o, meglio, dei frammenti di nuclei, che indubbiamente appartengono ad amebociti (vedi le figure 3, 7, 12 e specialmente la fig. 8). Nelle sezioni molto

¹ Veramente quell' espressione del VOM RATH si trova in un suo precedente lavoro del 1893 (Beitr. z. Kennt. der Spermatogenese von *Salamandra maculosa*. in: Zeit. Wiss. Z. 57. Bd. pag. 147), ma è riportata e confermata nel lavoro citato.

Devo anche ricordare che un lontano accenno a questa mia ipotesi si trova adombrato nel FLEMMING (91); infatti a pag. 291 egli dice: »Fragmentirung des Kerns, mit oder ohne nachfolgende Theilung der Zelle, ist überhaupt in den Geweben der Wirbelthiere ein Vorgang, der nicht zur physiologischen Vermehrung und Neulieferung von Zellen führt, sondern wo er vorkommt, entweder eine Entartung oder Aberration darstellt, oder vielleicht in manchen Fällen (Bildung mehrkerniger Zellen durch Fragmentirung) durch Vergrößerung der Kernperipherie dem cellulären Stoffwechsel zu dienen hat«. E in nota il FLEMMING aggiunge che quest' ultima riflessione l' ha presa da un lavoro del CHUN (Über die Bedeutung der directen Kerntheilung, Königsberg 1891), ch' io non ho potuto vedere.

sottili non sempre si scorge il nucleo che accompagna le granulazioni verdi, ma lo si vedrà in un punto perfettamente corrispondente della sezione che precede o che segue a quella che n'è priva. Nelle sezioni più spesse (da $7\ \mu$ in su) il nucleo non manca mai. In qual modo dalla sostanza verde, diffusa nella parte apicale del protoplasma della cellula epiteliale, si passi alla forma di granuli verdi ben distinti ed accompagnati da nuclei di amebociti, io non posso dire; e si capisce che un fatto così intimo di meccanica e di chimica citologica non sia di facile constatazione. Certo è che dopo la loro formazione i granuli verdi vengono raccolti dagli amebociti, per essere trasportati nel connettivo sottostante, o nelle lacune sanguigne; nè in queste, nè in quello si vedono mai granulazioni verdi che non sieno inglobate da un vero e proprio amebocito. Si è esso ricostituito dai frammenti nucleari? Anche questo punto difficile rimane finora oscuro per me; ricordo soltanto che l'amebocito carico di granulazioni verdi e che è già uscito dall'epitelio per tornare nel connettivo o nella lacuna sanguigna, ha il nucleo coll'aspetto di riposo (*a*). Devo aggiungere che alcune volte l'amebocito carico di granulazioni verdi ha delle dimensioni maggiori (qualche volta sensibilmente maggiori) delle ordinarie; ciò che si vede bene nella figura 12. Si potrebbe da questa osservazione trarre la conseguenza che l'amebocito si riforma da una specie di sincizio dei frammenti nucleari? Si spiegherebbe così la formazione dei megacariociti notati da molti osservatori?

Significato fisiologico della marennina. Risultato delle mie ricerche, e che non mi pare privo d'importanza, è che il protoplasma di tutte le cellule epiteliali, sia delle mucose esterne che di quelle interne (escluse quelle cellule che sono adibite a funzioni speciali secretorie, sensorie, pigmentarie) ha la capacità di fabbricare sostanze che verranno utilizzate dall'organismo. Non sono dunque soltanto le cellule assorbenti dell'intestino e dello stomaco che possiedono questa capacità assimilatrice; ma essa è posseduta in grado eminente anche dall'epitelio branchiale, da quello dei palpi, della faringe, dell'esofago e persino delle cellule epiteliali del mantello, coll'eccezione già fatta. Gli elementi necessari per fabbricare la marennina vengono tolti dal liquido ambiente, e, per una speciale attività del protoplasma delle cellule epiteliali, elaborati in modo da ottenere la sostanza verde. Succederebbe qui qualche cosa di simile a quel che avviene nelle cellule della mucosa intestinale dei vertebrati nell'assunzione del grasso.

Il quale, contrariamente a quel che sostennero RANVIER, HEIDENHAIN ed altri, verrebbe elaborato dall' attività del protoplasma cellulare, che prenderebbe dal chilo gli elementi (acidi grassi, glicerina) necessari. E rammento di proposito questa somiglianza di risultati, perchè rimasi colpito dall' aspetto delle cellule figurate dal GRUENHAGEN (87) confrontate con quelle degli epiteli da me studiati¹.

Ma quale è lo scopo della marennina, quale ufficio compie essa nell' organismo dell' ostrica? Dal protoplasma epiteliale passa sotto forma di granuli nell' interno degli amebociti e da questi viene trasportata al fegato. La si ritrova nell' interno delle cellule epatiche; anzi qui subisce certo qualche modificazione. Scompare essa, vien del tutto disciolta nel parenchima epatico, oppure viene utilizzata in parte, ed in parte ripresa dagli amebociti per venire trasportata nella glandula periauricolare? Io non sono ancora in grado di deciderlo.

Quanto all' ufficio della marennina abbiamo due ipotesi: o si tratta di un pigmento respiratorio o di un vero alimento. La prima è seducente, specialmente tenendo conto che la marennina contiene del ferro, questo energico trasportatore dell' ossigeno, tanto nel mondo inorganico che nell' organico; si aggiunga che quella sostanza contiene probabilmente dello zolfo, compagno minore del ferro quale veicolo dell' ossigeno. Starebbe contro l' ipotesi del pigmento respiratorio la differenza di quel che accade della sostanza corrispondente dei vertebrati, l' emoglobina, la quale viene continuamente ricostruita nell' organismo all' incirca collo stesso ferro, mentre la marennina si forma continuamente *ex novo* negli epiteli a contatto col liquido esterno. E le sta contro anche la non infondata supposizione che farò più avanti sull' ufficio degli amebociti. Per queste ragioni opinerei piuttosto che la marennina sia un vero alimento; ma per esserne certi bisognerebbe conoscere meglio l' istologia dell' apparato digerente, del fegato e delle glandole escretorie nei lamellibranchi e molto di più bisognerebbe conoscere la fisiologia di quegli organi, la quale, malgrado numerosi lavori, è assai poco progredita². Specialmente importante sarebbe conoscere

¹ Si confronti colle mie figure la figura 1 tav. 7 della memoria del GRUENHAGEN. Mi dispiace di non aver potuto prender visione del più recente lavoro del NICOLAS su questo stesso argomento, ma so che arriva alle stesse conclusioni del GRUENHAGEN.

² Sull' istologia degli organi escretori abbiamo molte ricerche, ma tutt' altro che sufficienti. Sull' apparato digerente quasi niente, se ne toglie alcune buone contenute in un vecchio lavoro del SABATIER (*Etudes sur la Moule commune*,

i rapporti reciproci che passano fra il fegato e gli organi escretori propriamente detti. Certo che la vecchia opinione, del FREDERICQ e di altri, di considerare il fegato come una glandula di secrezione, anzi, come fecero certuni, paragonarla al pancreas, non regge. C. SAINT-HILAIRE (93), più eclettico, accorderebbe al fegato da una parte un'azione escretoria, dall'altra secretoria e forse anche di riassorbimento. Noto ch'egli dice espressamente: »Les pigments qui se trouvent dans les cellules du foie, d'après mes observations proviennent des pigments des aliments (pag. 116)«. Come s'è visto, dalle mie osservazioni risulta certamente che il fegato compie un ufficio di assorbimento, supposto dubitativamente dall'autore russo; nel rimanente il mio giudizio sarebbe prematuro, ma non mi parrebbe esatto considerarla, come tanti fecero, una glandula escretoria, e soltanto la crederei in piccola parte secretoria¹.

Un' obbiezione che non può non essersi presentata alla mente del lettore è la seguente: ma perchè dare l'importanza di pigmento respiratorio o di alimento ad una sostanza che non si trova altro che nelle ostriche della riva della Soudre e per qualche mese all'anno? Se la marennina dovesse compiere così importanti uffici, come son quelli che le attribuisco, non dovrebbe essa esser sempre presente nelle ostriche tutte?

La risposta è semplice: fra le ostriche di Marennes e quelle di fondo delle altre località non v'è differenza che nel colore, ma del rimanente il pigmento speciale esiste sempre e colla stessa distribuzione, come la marennina nelle ostriche della Soudre. Nel marzo dell'anno scorso (1895), appena mi convinsi che il fenomeno dell'inverdimento era una vera e propria assimilazione, presi un'ostrica, tenuta a vivere da molti mesi sul fondo di un vivaio del Golfo della Spezia, e la preparai nei modi consueti. All'esame delle sezioni, nei palpi, nell'esofago, nell'intestino, nel fegato, inglobato sotto forma di granuli dagli amebociti, trovai un pigmento di color giallo facilmente

1875) che insieme a grossolani errori contiene molte accurate e importanti osservazioni. Sull'istologia del fegato abbiamo le ricerche del FRENZEL, ma egli si occupa soltanto degli elementi isolati, osservati a fresco.

¹ Il FRENZEL limita il suo giudizio sul significato fisiologico del fegato dell'*Ostrea edulis* a questa osservazione molto giusta, ma altrettanto ovvia: »Da aber, wie wir oben erwähnten, die Mitteldarmdrüse [questo è il nome che il FRENZEL dà al fegato, ed è certamente adoprato in senso improprio e molto equivoco] der Auster räumlich stark entwickelt ist, so können wir durchaus nicht annehmen, dass ihre Function eine untergeordnete sei« (pag. 325).

visibile quando si adopera una tinta di contrasto rossa (paracarminio, safranina). Osservo una volta per sempre che questo pigmento, o, per meglio dire, questa sostanza nutritiva, non può esser confusa col pigmento che colora le parti superficiali dell' animale, specialmente l' orlo del mantello. La marennina e le sostanze analoghe gialle, brune ecc. che si riscontrano nelle ostriche hanno la distribuzione largamente descritta al terzo capitolo e non sono solubili niente affatto nell' alcool. Invece il pigmento superficiale del mantello non si trova che nel suo epitelio e manca negli altri organi. Quanto al contenuto di color giallo rossiccio, proprio delle cellule epatiche, esso è completamente solubile nell' alcool, come lo sono certi pigmenti speciali che si trovano talvolta nelle branchie e sempre nel muscolo adduttore della sola *O. cochlear*.

Le ostriche, che invece di esser tenute a fondo, stanno sospese nell' acqua profonda, secondo i soliti metodi italiani (vedi CARAZZI, 93), mostrano, talora scarso, talora abbondante, il pigmento solubile nell' alcool, ma non si può mettere in evidenza la sostanza analoga alla marennina. Questo si capisce facilmente se si tien conto che il ferro è uno dei principali elementi necessari alla sua formazione; ora, in una grande massa di acqua in movimento non può essere presente quella quantità di sali di ferro che l' ostrica può avere a disposizione stando a contatto col terreno in un parco dove l' acqua è poca e tranquilla. Quanto al fondo, sul quale vivono le ostriche colla sostanza gialla, del Golfo della Spezia, esso è formato da un limo del quale non occorre neanche fare l' analisi per assicurarsi che vi abbonda il ferro, perch' esso è un deposito dell' argilla ocreacea, ricchissima di quel metallo, trasportata dalle acque che scendono dai colli sovrastanti alla spiaggia, argilla che sta fra uno strato e l' altro del calcare rético onde quei colli sono costituiti.

Tornando ai risultati dell' analisi chimica fatta dai signori MUNTZ e CHATIN riescono evidenti i rapporti fra le cifre delle tabelle che ho messo in nota alla pag. 413. Il ferro è contenuto in tutte le ostriche, è più scarso in quelle scolorate, più abbondante nelle altre; sieno esse di Marennes o di altre località, sieno esse verdi, o rossastre o brune. E siccome la marennina e le sostanze analoghe non stanno solo nelle branchie e nei palpi, ma anche nell' intestino e nel fegato (fors' anche, modificate, nelle glandule pericardiche), si capisce che il ferro venisse trovato anche nell' analisi del corpo, privato delle lamelle branchiali e dei palpi. E si capisce che il $\frac{1}{2}$ del ferro fosse nel corpo circa la metà di quel che nelle branchie, perchè in queste il

tessuto privo di marennina si riduce quasi a niente, essendo l'organo specialmente formato dall'epitelio assimilatore, mentre nel corpo, oltre ai tessuti e agli organi surricordati contenenti ferro, altri voluminosi se ne trovano (muscolo, connettivo, gland. genitali) che ne son privi¹.

Ma se il ferro è indubbiamente uno dei principali componenti della marennina e delle sostanze analoghe, non è certamente il solo, e alla varia quantità di esso in confronto cogli altri elementi, alla presenza o mancanza di alcuni di questi, deve attribuirsi il variare della colorazione.

Ostriche portoghesi verdi. È qui il caso di ricordare uno speciale inverdimento, ch'ebbi occasione di constatare in ostriche del tipo *O. angulata* e *O. virginica*, anzi probabilmente proprio della prima specie, nota in Francia col nome di *Huitre portugaise*, perchè fu importata, casualmente, dalle foci del Tago a quelle della Gironda (Bordeaux).

Verso la fine del 1890 venne alla Spezia il yacht »Sunbeam« di proprietà di un lord inglese; rimase alcuni mesi nel Golfo e verso la fine dell'anno fu messo in uno dei bacini del r. Arsenal per essere ripulito nella chiglia. Questa aveva numerosi mitili ed alcune ostriche, forse un duecento dell'età di un paio d'anni. N'ebbi parecchie e volli tenerle a crescere in un vivaio, dentro a dei cesti, perchè m'accorsi subito che non appartenevano a nessuna delle tre specie proprie del Mediterraneo². Nell'aprirne qualcheduna fui colpito dal colore distintamente verde di tutta la superficie del mantello; le branchie erano mediocrementemente verdi, degli altri organi non ebbi l'avvertenza di fare l'esame. Nel 1893 tornai ad esaminare queste ostriche, che nel frattempo erano cresciute molto, prendendo la forma irregolare (molto più lunghe che larghe) propria delle ostriche del gruppo *angulata-virginica*; e di queste avevano il colore rossastro dell'impressione del muscolo adduttore e i sessi separati. Se tutti questi caratteri sono comuni colla nostra *O. cochlear*, le dimensioni e la forma non permettevano neanche la supposizione che si trattasse di questa specie; era dunque certamente una delle due

¹ Si capisce che questa espressione va presa in senso relativo. Non intendo già dire che il muscolo, il connettivo ecc., manchino assolutamente di ferro, ma soltanto che in tali parti del corpo non si trova traccia del pigmento organico, tipo marennina, ricco in ferro.

² Vedi il mio Manuale di ostricoltura, pag. 6.

sopra ricordate, e le larve dovevano essersi fissate alla chiglia del »Sunbeam« quando questo, prima di venire alla Spezia, era nell' Atlantico. Dove precisamente fosse stato non avevo avuto l' avvertenza d' informarmi, e non potei sapere in seguito, perchè il yacht, tosto ripulito, lasciò il Mediterraneo.

Quello che mi colpì nel secondo esame del 1893 fu che l' ostrica, vissuta in mezzo a tutte le *O. edulis* del vivaio che non inverdiscono mai, aveva ancora distinta la colorazione verde del mantello. Ciò mi sorprese, perchè io credevo allora al PUYSEGUR, LANKESTER ecc., e datano appunto da quel tempo le mie prime ricerche sulle ostriche verdi. Nel 1894 e nel 1895 le ostriche del »Sunbeam« erano ancora ingrossate; esaminate di primavera avanzata si mostravano in floride condizioni, grasse, molto nutrite, i ♂ con numerosi gruppi di spermatozoi, le ♀ con abbondanti uova. Il colore del mantello da verdastro era passato più decisamente ad una tinta giallastra.

Parmi indubbio che ad ostriche identiche si debba riferire l' osservazione dell' HERDMAN »in which enormous numbers of wandering leucocytes filled with large green granules come out the surface of the body and especially on the mantle« (pag. 16 dell' estratto). Infatti nelle mie osservazioni istologiche ho trovato gli stessi fatti notati per le ostriche di Marennes, sia nell' intestino che nelle branchie e nei palpi; la sola differenza era che tutte le lacune del mantello erano piene zeppe di numerosi amebociti carichi di granulazioni verdi-giallastre. Ancora dalle prime osservazioni si scorgeva che il verde non era di quel colore brillante, d' un tóno caldo, quale si osserva nelle ostriche di Marennes, nel massimo dell' inverdimento, ma di un colore più tendente al giallo. Nelle osservazioni successive il color giallo delle granulazioni era più evidente, specialmente nel 1895. Le granulazioni dell' intestino, delle branchie e dei palpi s' erano fatte più rade, e i singoli granuli molto più piccoli, irregolari, angolosi, non già grossi e tondeggianti come nelle ostriche di Marennes. E in queste ultime osservazioni anche il mantello mostrava qualche diminuzione nel numero di amebociti carichi di granulazioni, le quali avevano subito nella forma anch' esse le modificazioni mentovate.

Quanto alla pretesa »leucocitosi« dell' HERDMAN non riesco a capire neanche che cosa voglia dire, e mi pare che adoprare questa parola parlando di ostriche sia un non-senso. E, all' opposto dell' HERDMAN, son sicuro che anche queste ostriche sono perfettamente

sane. Egli afferma, come ho già detto, ma non ne dà una sola prova, che in quelle da lui prese in esame il fegato era malato.

La sola differenza notevole fra le ostriche del »Sunbeam« e quelle di Marennes è la grande durata del pigmento e l'abbondante quantità di amebociti del mantello, che lo contenevano. Da che dipenda questo riversarsi di amebociti con granulazioni nel torrente sanguigno e quindi nelle lacune del palleo, non saprei dire con precisione; forse l'inverdimento era avvenuto con tanta intensità che il fegato non aveva potuto provvedere al rapido assorbimento degli amebociti carichi di granuli, e perciò essi erano andati in circolazione. Questo diffondersi delle cellule sanguigne con granuli nei tessuti connettivi ha finito poi con trasformare molte di quelle cellule in vere cellule fisse; così che nelle mie ultime osservazioni ho trovato i sottili granuli gialli raccolti in cumoli ed in mezzo ad essi un nucleo assai ridotto e sformato; in tal modo i granuli sembravano far parte del lasso tessuto connettivale.

Quello che risulta dalle mie ricerche, sia sulle ostriche di Marennes che su quelle portoghesi, è la grande importanza che hanno gli elementi del sangue nel trasporto delle sostanze assimilate dagli epitelii funzionali.

Contrariamente a quello che si credeva finora, non è già il plasma sanguigno, ma bensì l'amebocito che prende la sostanza nutritiva assimilata, anzi fabbricata, negli epitelii e la trasporta al fegato.

E, appunto, il risultato di maggiore importanza, che mi sembra emerga dalle mie ricerche, è l'aver messo in luce che gli amebociti, come giustamente aveva già conchiuso nel suo lavoro il CUÉNOT, »sont des organites d'une importance capitale dont les fonctions multiples sont toutes en rapport avec l'assimilation et la nutrition« (pag. 650). Secondo la convinzione ch'io mi son fatta, tutte le funzioni di nutrizione, respirazione ed escrezione compresa, hanno per immediato e necessario intermediario l'amebocito¹. Potrà egli in seguito a

¹ Per avere già enunciato questa idea io mi presi dell' »ill-informed«, e a proposito della respirazione mi scaraventarono addosso tutti in una volta PAUL BERT, KRUKENBERG e FREDERICQ; e certamente, se l'avessero conosciuto, non mi avrebbero risparmiato neanche il vecchio HARLESS, il vero padre dell'emo-cianina, da lui scoperta cinquantanni or sono nell' *Helix* (1847). Mi contenterò

cenogenetici differenziamenti cedere parte di queste sue attribuzioni o ad albuminoidi del sangue (del resto elaborati dall'attività del suo protoplasma) o ad elementi speciali, quali le emazie, ma egli rappresenta da solo l'unità morfologica, che contiene in sé stessa tutte le attività funzionali necessarie per il trasporto dei materiali di nutrizione.

Conclusioni generali.

1. Le ricerche istologiche fatte finora sulle ostriche verdi di Marennes trassero a conclusioni erronee gli osservatori che le compirono.

2. Errarono il LANKESTER e lo CHATIN credendo che le cellule di secrezione o macroblasti contenessero il pigmento verde. Quelle cellule sono indubbiamente e sempre scolorate; esse funzionano come »Becherzellen«, per secernere una sostanza che ha l'aspetto fisico, se non le proprietà chimiche, del muco.

3. Errarono del pari i due autori summentovati quando attribuirono a quelle cellule la proprietà di essere semoventi.

4. L'opinione del PELSENEER, del DE BRUYNE e del LANKESTER che la colorazione verde dei palpi e delle branchie nelle ostriche di Marennes sia effetto di un trasporto, dall'apparato digerente all'esterno, di materiale dannoso al sangue, trasporto che si compirebbe per opera degli amebociti del sangue ad uno scopo escretorio, e con una diapedesi attraverso ai tessuti, accompagnata molto spesso (DE BRUYNE) da una distruzione epiteliale per opera degli amebociti, è completamente erronea.

di fare umilmente osservare: che i tre autori citati si sono occupati di molluschi cefalopodi; che l'emocianina in molti lamellibranchi, l'ostrica compresa, nessuno, finora, l'ha vista; che in altri vi sono appositi elementi contenenti un composto analogo all'emoglobina; che nell'*Aplysia punctata* il plasma sanguigno contiene l'emocianina in così piccola quantità (1,77%, se pure è emocianina) che »cet albuminoïde ne peut très probablement jouer aucun rôle dans la respiration« (CUÉNOT, pag. 29)! E ricordato tutto ciò mi pare che voler sostenere che l'emocianina è la sostanza colla quale i molluschi assumono l'ossigeno è come dire che nei vertebrati l'impressione visiva si compie colla rodopsina.

Nei cefalopodi, in molti gasteropodi, in alcuni lamellibranchi l'emocianina costituisce il pigmento liquido respiratorio; in altri altre sostanze la sostituiranno; in altri infine la funzione è compiuta da vere emazie (*Solen legumen*, *Arca tetragona*). Ma in molti molluschi l'emocianina non è che supposta. E nell'*Aplysia depilans*, neanche può supporre la presenza di un albuminoide con funzioni respiratorie (CUÉNOT, pag. 46, 91!).

5. Una diapedesi escretoria e una fagocitosi, cioè una distruzione epiteliale, come l'osservò il DE BRUYNE, non sono già fenomeni fisiologici, ma di patologia sperimentale.

6. Che la causa dell'inverdimento delle ostriche di Marennes sia dovuta al nutrirsi che fanno i molluschi di una diatomea verde (*Navicula*), come credettero il PUYSEGUR, il LANKESTER, lo CHATIN, il PELSENER, il DE BRUYNE, l'HERDMAN ecc., è del pari infondato. La presenza o l'assenza della *Navicula* non influiscono menomamente sull'inverdimento.

7. Non regge neanche l'ipotesi del RYDER e dell'HERDMAN che l'inverdimento sia una malattia di fegato o una leucocitosi (!).

8. Il fenomeno dell'inverdimento è una vera e propria assimilazione, compiuta dal protoplasma della parte apicale delle cellule cilindriche epiteliali di tutte le mucose sia esterne che interne, escluso lo stomaco e tutta quella parte d'intestino nella quale sta lo stilo cristallino. L'epitelio del mantello, tolte le cellule sensoriali, pigmentate e secretorie, ha la capacità di fabbricare la sostanza verde. L'ha in grado più elevato l'epitelio delle branchie, eccettuate le cellule secretorie, e così pure la mucosa dei palpi, dell'esofago, dell'intestino medio e terminale, fino all'ano, eccettuate le Becherzellen e le cellule claviformi.

9. La sostanza verde o marennina non esiste già formata all'esterno, ma viene fabbricata con elementi presi al liquido ambiente, dall'attività del protoplasma epiteliale, al modo stesso che il protoplasma delle cellule dell'intestino medio dei vertebrati fabbricherebbe il grasso, secondo il modo di vedere del GRUENHAGEN, del NICOLAS e di altri.

10. Nell'interno dell'epitelio, nel tratto dove si forma la marennina, il color verde ha un aspetto diffuso, tutt'al più finissimamente granuloso. Scendendo verso la parte prossimale (basale) dell'epitelio, la marennina si vede raccolta in grossi granuli del diametro di uno o due μ .

11. Uno dei principali componenti della marennina è il ferro, ma non esclusivo; e la sua presenza necessaria non basta per formare il pigmento verde. Esso entra anche nella composizione di altri pigmenti simili alla marennina, ma di colore diverso giallo, bruno ecc.

La marennina è un composto organico diverso da tutti quelli conosciuti. Questo fatto è stato dimostrato dal DUMAS e dal BERTHELOT.

12. Gli amebociti del sangue si caricano dentro all' epitelio delle granulazioni verdi e, facendosi strada per il connettivo sottostante, si portano al fegato.

13. Nel fegato gli amebociti vengono assorbiti dalle cellule epatiche, qui le granulazioni verdi sono profondamente modificate.

14. All' infuori degli epiteli, specialmente menzionati, degli amebociti e del parenchima epatico, nessun altro organo o tessuto dell' ostrica contiene le granulazioni verdi, la marennina. Quand' essa si scorge nel tessuto connettivale, è sempre nell' interno di un elemento sanguigno.

15. Si può supporre che la marennina sia un pigmento respiratorio, ma è più ovvio considerarla come un vero alimento.

16. Nelle ostriche di località disparate (anche della Spezia) tenute a vivere sul fondo, dove il fango contiene argille ocracee (ferruginose), si riscontrano dei pigmenti (giallo, bruno ecc.) analoghi per il modo di formazione, per la distribuzione e per il loro comportarsi coi soliti agenti istologici (fissatori, induritori, coloritori ecc.) alla marennina verde delle ostriche di Marennes.

17. La perdita della colorazione verde ha luogo in un periodo che varia a seconda del tempo che ha durato l' inverdimento. Di solito il verde persiste visibilmente per uno, due e anche tre mesi. Nello sverdimento si scolora prima il protoplasma della parte apicale dell' epitelio, poi il rimanente epitelio; ma nel fegato le granulazioni di marennina, parzialmente scolorate, durano a lungo e spariscono solo quando negli epiteli è già cessata da parecchio tempo la colorazione.

18. Gli amebociti delle ostriche, pure essendo di una sola specie, si presentano con due aspetti diversi, i quali devono corrispondere a un diverso atteggiamento funzionale (respiratorio?). Potrebbe darsi che uno di codesti atteggiamenti prelude alla frammentazione nucleare, la quale è il fatto istologico che precede l' assunzione della marennina da parte dell' amebocito. Tale frammentazione nucleare, o divisione diretta del nucleo, non rappresenta, dunque, una degenerazione dell' amebocito, come da molti fu asserito.

19. Dopo presi i granuli di marennina o di altri pigmenti analoghi, l' amebocito si reca al fegato; non è dunque, come si credeva, il plasma solo incaricato del trasporto del materiale assimilato dal protoplasma delle cellule epiteliali.

20. Il fegato delle ostriche ha certamente una funzione di assorbimento.

Firenze, maggio 1896.

Spiegazione delle figure della tav. 18.

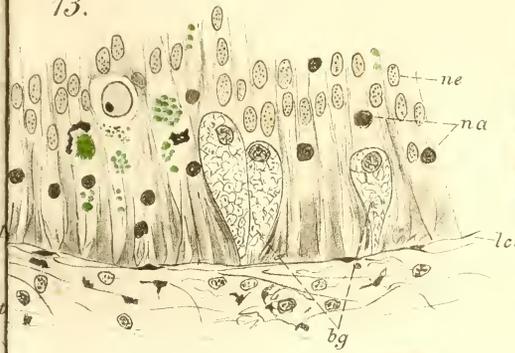
I disegni furono fatti colla camera chiara ABBE (beninteso esclusa la fig. 1), fin dove possibile; e, meno pochi, coll' obiettivo a immersione om. apocr. 2 mm. dello ZEISS e oculare comp. 2, 4, 8. L'ingrandimento è approssimativo. Salvo indicazione contraria, le figure rappresentano sempre sezioni di *Ostrea edulis* verde di Marennes.

- Fig. 1. Sezione semischematica in un piano mediano sagittale, parallelo alle due valve, di un' ostrica nel massimo dell' inverdimento. Gli organi inverditi sono rappresentati di color verde, il fegato verdastro oscuro, come si scorge dopo l' indurimento coll' alcool. *Cp* cappuccio palleale, *P* palpi, *S* stomaco, *Imc* intest. medio circondante, *F* fegato, *Im* porzione ricorrente dell' intestino medio, *LBr* lamella branchiale, *Id* intestino discendente, nel quale va a terminare lo stilo cristallino, *PrO* processo orale, cioè tutta la parte anteriore-inferiore del corpo compresa fra il muscolo add. e le lam. branch., *Ir* cul di sacco dell' intest. ricorrente, *Ic* cieco dell' intest. discendente, *Nv* ganglio viscerale, *A* ano, *M* muscolo add., *O* orecchietta, *V* ventric. del cuore, *St.c* stilo cristallino nello stomaco, *E* esofago, *Nc* ganglio cerebrale. Grand. nat. di un' ostrica di dimensioni medie.
- Fig. 2. Segmento di una lam. branch. Soltanto due segmenti secondari (*ss*) sono interamente disegnati; *cs* cellule di secrezione. $\times 240$.
- Fig. 3. Segmento second. apicale della fig. precedente. Ho raccolto i diversi aspetti delle cellule di secrezione (*cs*) descritti nel testo; *na*, nucleo di amebocito, *a* e *a₁* amebociti, *a₂* amebocito con granulazioni verdi. $\times 550$.
- Fig. 4. Sezione parallela alla superficie di un palpo labiale, ma un poco obliqua. Le cavità *f* indicano i posti dove stavano nicchiate le cell. di secrez., *cs* alcune di queste cellule rimaste in posto. $\times 240$.
- Fig. 5. Porzione di lam. branch. in sezione longitud.; fissazione all' acido osmico; *cs* cell. di secrez., *n* nicchie delle medesime. $\times 550$.
- Fig. 6. Sezione trasversale di un palpo labiale, non colorato. *Or* lato orale e *Abor* aborale, *mc* mucosa, *cr* creste della stessa, *forn* fornic. $\times 68$.
- Fig. 7. Una cresta di palpo labiale in sez. trasv.; *cs* cell. di secrezione, *na* nuclei di amebociti penetrati nell' epitelio, *a* amebociti del tessuto connettivo. $\times 550$.
- Fig. 7 bis. Porzione di fornice della stessa sezione, *a*, amebocito dentro una cell. epiteliale, il nucleo di questa è respinto in alto. $\times 550$.
- Fig. 8. Un altro pezzetto di fornice di una sez. di palpo; *cs* cell. di secrez., *ne* nuclei delle cell. epitel., *a*, un amebocito dentro ad una cell. epitel., *na* porzioni di nuclei di amebociti in mezzo alle granulaz. verdi. $\times 1100$.
- Fig. 8 bis. Un amebocito in divisione. $\times 1100$.
- Fig. 9. Sezione della mucosa faringea in un piano perpend. a quello della fig. 1 (piano long. o frontale); *cs* cell. di secrez., *ne* nuclei delle cell. epit., *a*, nuclei di amebociti penetrati nell' epitelio. $\times 275$.
- Fig. 10. Sez. trasv. della mucosa dello stomaco verso la parte orale e media dell' organo; *ne* nuclei dell' epitelio, *na* nuclei di amebociti, *cà* cumoli di granuli bruni con nuclei di amebociti, *lc* limite fra la mucosa e il connettivo sottostante. $\times 260$.

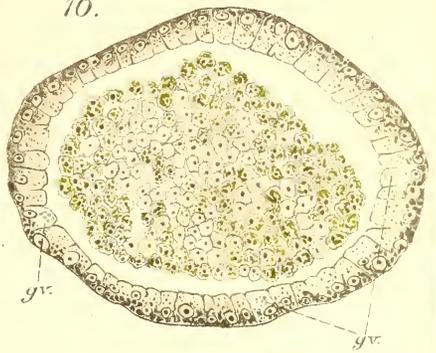
- Fig. 11. Sez. trav. d' intestino terminale. *Ms* muscolo add., *M* tunica palleale, *c* connettivo, *mc* mucosa, *cr cr*, creste della mucosa, *f* fornici della stessa. $\times 68$.
- Fig. 12. Porzione di una sez. d' intestino circondante; epitelio di una cresta; *cs* cell. di secrez., *ne* nuclei dell' epitelio, *a*, nuclei di amebociti penetrati nell' epitelio, *le* limite dell' epitelio col connettivo, *a*, grosso amebocito con granuli verdi. $\times 260$.
- Fig. 13. Porzione basale di mucosa dell' intestino medio in una regione opposta alle creste; *bg* cell. di secrez. non ancora sviluppate, le altre lettere come nella fig. precedente. La parte apicale dell' epitelio, cioè verso il lume dell' intestino, non è figurata. $\times 550$.
- Fig. 14 e 14 bis. *Ostrea edulis* di Spezia. Porzioni di sez. trasversale dell' intest. circond. per far vedere diversi tipi di cellule di secrezione (*cl*) a forma di clava. $\times 550$.
- Fig. 15. Sez. del fegato; un lobulo è figurato intero; *a* amebociti con granulaz. verdi, *ce* cell. epatiche, *na* nuclei di amebociti. $\times 550$.
- Fig. 16. Sez. trasv. di un dotto epatico pieno di amebociti, il maggior numero dei quali contiene delle granulaz. verdastre; in alcune cell. epatiche si vedono dei granuli verdi (*g.v*). $\times 275$.
- Fig. 17. Porzione di un lobulo epatico di ostrica verde in un periodo più avanzato di digestione della fig. 15. $\times 550$.
- Fig. 18. Sez. trasv. di una piccola arteria del processo orale; *a* amebociti, *a*, idem con granuli verdi. $\times 240$.
- Fig. 18 bis. Alcuni amebociti della fig. precedente. $\times 550$.
- Fig. 19. Amebociti dentro o vicino all' epitelio dei palpi labiali e con diversi aspetti di divisione diretta, da un preparato colorato colla safranina. $\times 1100$.
- Fig. 20. I due aspetti funzionali dell' amebocito. Da un preparato colorato colla safranina. $\times 1100$.

NB. La colorazione verde che si scorge nelle figure corrisponde alla colorazione realmente esistente nelle ostriche verdi di Marennes; del rimanente per i diversi aspetti di quella colorazione cfr. il testo.

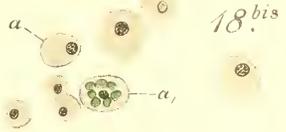
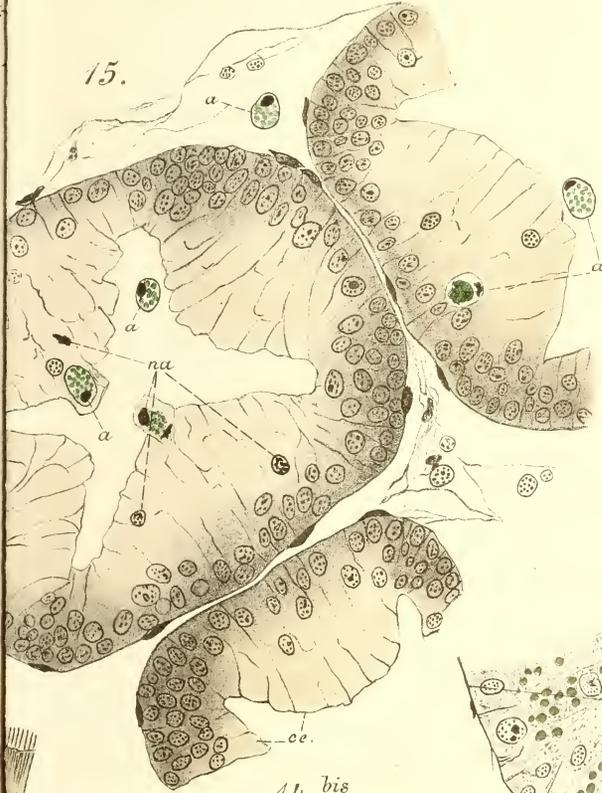
13.



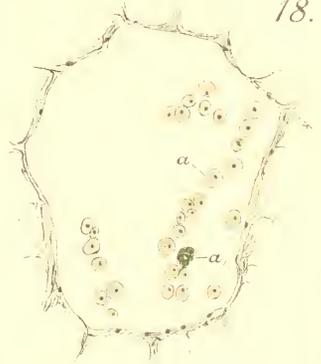
16.



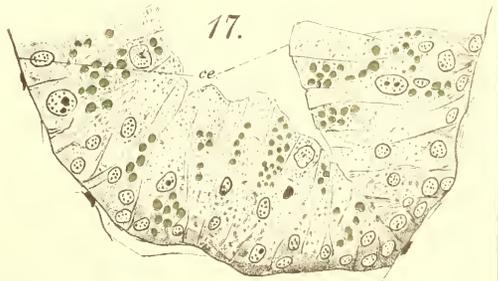
15.



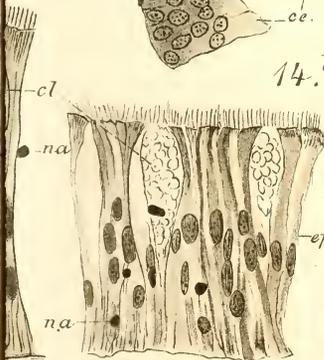
18.



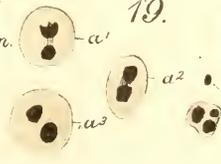
17.



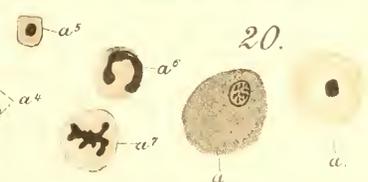
14. bis



19.



20.





ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Mittheilungen aus der Zoologischen Station zu Neapel](#)

Jahr/Year: 1897

Band/Volume: [12](#)

Autor(en)/Author(s): Carazzi Dav.

Artikel/Article: [Contributo all' istologia e alla fisiologia dei Lamellibranchi. 381-431](#)