

ULTRAESTRUCTURA DE LOS ÓRGANOS ECTODÉRMICOS AMPULARES EN LAS LARVAS DE DOS ESPECIES DE ASCIDIAS (*TUNZCATA*)

X. Turon*

Recibido: 3 mayo 1989
Aceptado: 3 noviembre 1989

SUMMARY

Ultrastructure of the ectodermic ampullae in the larvae of two ascidian species (*Tunicata*).

The ultrastructure of the ectodermic ampullae in the larvae of *Diplosoma spongiforme* (Giard) and *Polysyncraton lacazei* (Giard) (family *Didemnidae*) is studied. These organs are tubular in shape and are made up of secretory cells in both species. The ampullae of *Diplosoma spongiforme* produce a dark secretion at their distal end, whereas the cells in their lateral walls undergo a process of vacuolation. These features are not found in *Polysyncraton lacazei*. The postmetamorphic development of the ampullae is different in both species. The possible role of the ampullae in tunic supply and attachment is discussed.

Key words: Ultrastructure, ectodermal ampullae, attachment, larvae of ascidians, *Diplosoma spongiforme*, *Polysyncraton lacazei*.

RESUMEN

Se estudian aspectos ultraestructurales de los órganos ectodérmicos ampulares de las larvas de *Diplosoma spongiforme* (Giard) y *Polysyncraton lacazei* (Giard) (familia *Didemnidae*). En ambas especies se trata de órganos tubulares formados por células glandulares secretoras. Los órganos ampulares de *Diplosoma spongiforme* producen una secreción electrodensa en su zona distal, mientras que las células de las paredes laterales presentan una marcada vacuolización del citoplasma apical. Estas características no se han observado en *Polysyncraton lacazei*. El desarrollo postmetamórfico de los órganos ampulares en ambas especies es también distinto. Se discute la posible función de estos órganos en la fijación al sustrato de las larvas y en la producción de túnica.

Palabras clave: Ultraestructura, órganos ampulares, adherencia al sustrato, larvas de ascidias, *Diplosoma spongiforme*, *Polysyncraton lacazei*.

INTRODUCCIÓN

Los órganos ectodérmicos ampulares son estructuras epidérmicas con un espacio hemocélico interior que se hallan en la parte anterior

del tronco de la larva en numerosas especies de ascidias. Su número y forma (digitada, capitada, bulbosa, vesicular, anular...) varía según las especies (BERRILL, 1950). En muchos casos (normalmente en las larvas de las especies so-

* Dep. Biología Animal (Invertebrados). Fac. Biología. Avda. Diagonal, 645. 08028 BARCELONA.

litarias) estos órganos no son visibles en la fase larvaria, pero aparecen y se desarrollan rápidamente al iniciarse la metamorfosis (CLONEY, 1978).

Su función parece ser la de órganos secundarios de fijación: inicialmente las larvas se adhieren al sustrato por medio de la secreción cementante de sus papilas adhesivas, pero éstas se retraen y desaparecen rápidamente, por lo que en los estadios metamórficos y post-metamórficos la fijación la aseguran los Órganos ampulares, a los que se atribuye la formación de una sustancia adhesiva (CARLISLE, 1961; LANE, 1973; CLONEY, 1978, 1982; CLONEY & TORRENCE, 1984).

En ciertos casos, los órganos ampulares desaparecen al cabo de cierto tiempo. En la familia Polyclinidae, por ejemplo, estos órganos son vesiculares (se han separado del cuerpo de la larva por constricción) (GRAVE, 1921; SCOTT, 1946, 1952; CARLISLE, 1952) y en el momento de la metamorfosis se desplazan hacia la zona de la túnica en contacto con el sustrato y desaparecen al poco tiempo (SCOTT, 1952). En *Distaplia occidentalis* Bancroft (familia Polycitoridae) los órganos son tubulares y se desarrollan en el momento de la metamorfosis, alcanzando 2-3 veces la longitud del cuerpo y desapareciendo al cabo de unos días (CLONEY, 1978; TORRENCE & CLONEY, 1981).

En otros casos, sin embargo, los órganos ampulares no desaparecen, sino que persisten en la colonia adulta, donde forman el sistema estolonial, como en la familia Clavelinidae (PÉRÈS, 1948), o llegan a formar un complejo sistema vascular, como en algunas formas coloniales de la familia Styelidae: *Botryllus*, *Botrylloides*, *Symplegma* y *Metandrocarpa* (NEWBERRY, 1965; DE SANTO & DUDLEY, 1969; BRUNETTI & BURIGHEL, 1969; BURIGHEL & BRUNETTI, 1971; MUKAI et al., 1978). Por último, en la familia Didemnidae los órganos ampulares del ascidiozoide desaparecen, pero los blastozooides desarrollan estructuras homologables a ellos, los vasos de la túnica (MILLAR, 1951; MACKIE & SINGLA, 1987).

Además de la función como órganos de fijación, se atribuye también a los órganos ampulares y sus derivados la capacidad de secreción de nueva túnica (SCOTT, 1952; BREWIN, 1959; NEWBERRY, 1965; KATOW & WATANABE, 1978; MACKIE & SINGLA, 1987), función circulatoria (especialmente en las colo-

nias de Styelidae: BURIGHEL & BRUNETTI, 1971; MUKAI et al., 1978) e incluso función respiratoria (BERRILL 1929; CLONEY, 1978). Las estructuras derivadas de los órganos ampulares tienen en muchos casos capacidad contráctil, contrayéndose a veces en forma coordinada, como en algunos Styelidae (DE SANTO & DUDLEY, 1969; MUKAI et al., 1978; MACKIE & SINGLA, 1983) o asincrónica como en *Molgula* (TORRENCE & CLONEY, 1981) y *Diplosoma* (MACKIE & SINGLA, 1987).

A pesar de estos puntos de interés, los estudios sobre la morfología o el desarrollo de estos órganos son escasos. Únicamente ha sido bien estudiado uno de sus derivados: el sistema vascular de las formas coloniales de Styelidae (DE SANTO & DUDLEY, 1969; KATOW & WATANABE, 1978; MACKIE & SINGLA, 1983). La morfología ultraestructural de los órganos ampulares en estadios postmetamórficos de *Molgula occidentalis* Trausdedt ha sido estudiada por TORRENCE & CLONEY (1981). Este trabajo presenta el primer estudio ultraestructural de los órganos ampulares en el estadio larvario de ascidias, concretamente en las especies *Diplosoma spongiforme* (Giard, 1872) y *Polysyncraton lacazei* (Giard, 1872), ambas de la familia Didemnidae.

MATERIAL Y MÉTODOS

Colonias maduras de *Polysyncraton lacazei* y *Diplosoma spongiforme* fueron recogidas en la localidad de Tossa de Mar (Gerona). Inmediatamente fueron colocadas en cristalizadores aireados donde al cabo de unos minutos empezaron a liberar espontáneamente algunas larvas, que se recogieron con una pipeta y fueron colocadas en el líquido fijador.

La fijación se realizó durante dos horas en una mezcla de glutaraldehído (2.5%) y paraformaldehído (2%) en tampón cacodilato 0.1 M (pH = 7.2) y la postfijación en tetraóxido de osmio (1%) en el mismo tampón. A continuación el material fue deshidratado por una serie de concentraciones ascendentes de acetonas e incluido en Araldita (ACM, Durcupan) o en Spurr (AG, Fluka).

Las secciones finas se obtuvieron con un ultramicrotomo Reichert Om-U2 con cuchilla de diamante. El contraste se realizó con acetato de uranio y citrato de plomo. La observación se efectuó en un microscopio electrónico Philips EM 301 del Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Barcelona.

Algunas de las larvas obtenidas no fueron fijadas sino que se depositaron en cápsulas de Petri con portaobjetos en el fondo, a los que al cabo de unos minutos se adherían espontáneamente e iniciaban la metamorfosis. Los cristales portaobjetos, con las larvas adheridas, fueron mantenidas en acuario durante unos días, con el fin de observar el desarrollo de los órganos ectodérmicos en las primeras fases del crecimiento de las nuevas colonias.

RESULTADOS

Diplosoma spongiforme (Giard, 1872).

La larva de esta especie posee normalmente 4 órganos ampulares (a veces más) de forma alargada y terminados en un engrosamiento bulboso (fig. 1). Sus dimensiones son de aproximadamente 70-80 μm de diámetro y hasta 200 μm de longitud. Estos órganos son muy aparentes durante la metamorfosis (fig. 2) y el estadio de colonias juveniles, en el que adquieren gran desarrollo.

La extremidad engrosada está formada por una capa de células secretoras (fig. 3). Estas células son columnares, de unos 30 μm de alto y 6 μm de ancho. El núcleo se encuentra en la zona basal de las células, y el citoplasma está casi totalmente ocupado por gránulos de secreción de 0.5 a 2 μm de diámetro rodeados por membranas de tipo unitario y de contenido generalmente uniforme y electrodensos, aunque en algunas células el contenido es mixto, formado por una inclusión electrodensa rodeada por una matriz más clara de aspecto granular (fig. 4).

Las paredes laterales de los órganos ectodérmicos están formadas por células cuboidales (fig. 5) cuyo citoplasma está prácticamente ocupado por pequeñas vesículas y retículo endoplasmático liso y rugoso. Los núcleos se encuentran en la zona media-distal de las células. La parte basal de estas células está muy replegada; la membrana del polo basal forma un laberinto de digitaciones (fig. 6). En la parte distal de las células el citoplasma tiene un aspecto desorganizado y aparecen grandes vesículas con un contenido claro, idéntico al de la túnica colindante. Numerosas células aparecen desgajadas en la pared del órgano ampular, a las que quedan unidas por estrechos puentes citoplasmáticos (figs. 5, 7), formándose de esta manera una capa de células de aspecto filopodial

que envuelven el órgano ampular y que confieren un aspecto reticulado a la túnica larvaria. En la cavidad interna del órgano ampular existen células hemocélulas libres en número muy escaso.

En los ejemplares observados durante el período metamórfico y postmetamórfico, los órganos ampulares se desarrollan enormemente llegando en ocasiones a alcanzar los 2 mm. de longitud (equivalente al doble de la longitud de un zooide) y actúan como tirantes de fijación de la nueva colonia. Se ha constatado también que las colonias jóvenes de *Diplosoma* cambian continuamente de forma e incluso realizan cortos desplazamientos, en los que podría intervenir la acción de los órganos ampulares, pues se ha observado que los órganos ampulares situados en la dirección del movimiento se acortan, mientras que los situados en la parte posterior se alargan y acaban desprendiéndose del sustrato.

Polysyncraton lacazei (Giard, 1872)

Los órganos ampulares son más numerosos (10-12 pares) y cortos en esta especie que en la anterior. Forman una especie de corona en la parte anterior de la larva, rodeando a las tres papilas adhesivas (fig. 8). Su forma es tubular y no presentan engrosamiento de la zona terminal. Las dimensiones aproximadas de uno de los túbulos son de 75-85 μm de diámetro y hasta 190 μm de longitud. Durante la metamorfosis los tubos se alargan y sus extremos distales, en contacto con el sustrato, se dilatan formando ampollas (fig. 9).

En sección longitudinal (fig. 10) puede observarse que estos órganos tienen el aspecto de un tubo corto de paredes delgadas. Únicamente el extremo apical está formado por células más altas. La luz del tubo está repleta de células hemocélulas. Se observa una zona de túnica clara (libre de fibras) frente al extremo distal del órgano ampular.

Las células de la extremidad distal son columnares (25 μm de alto \times 6 μm de ancho). El núcleo se encuentra normalmente en la zona central o proximal de las células y presenta un conspicuo nucleolo (fig. 11). El citoplasma se caracteriza por la presencia de un sistema de Golgi bien desarrollado, retículo endoplasmático y pequeñas vesículas de contenido poco electrodensos que abundan en la región distal de las células (fig. 12).

Las células de las paredes laterales de los

órganos ampulares presentan un aspecto similar a las anteriores, si bien son de forma cuboidal (aproximadamente 10 x 10 μm) y presentan un menor desarrollo del retículo endoplasmático y de los gránulos de secreción. La membrana basal no presenta invaginaciones, ni hay indicio de que algunas células de la pared pasen a la túnica como en la especie anterior.

El lumen del conducto que forma el órgano ampular está ocupado por grandes células hemocíticas esféricas densamente empaquetadas, con gran abundancia de vesículas de diversos tamaños en su citoplasma (fig. 11).

La observación de colonias juveniles ha permitido apreciar que los órganos ampulares se alargan de forma muy moderada, limitándose a alcanzar la superficie de la túnica en contacto con el sustrato, donde sus extremidades anteriores se dilatan formando ampollas (fig. 9) que dejan de ser visibles a los pocos días. No se han observado en las colonias jóvenes de *Polysyncraton* los continuos cambios de forma y posición de la especie anterior.

DISCUSIÓN

El estudio ultraestructural revela ciertas diferencias en los órganos ampulares de estas dos especies. En ambos casos se trata de un epitelio glandular, pero destaca en primer lugar la diferenciación de las células apicales de *Diplosoma spongiforme* que forman conspicuos gránulos de secreción de contenido normalmente electrodenso, mientras que en *Polysyncraton lacazei* no se produce este tipo de gránulos. CLONEY (1978) ha observado que en algunas especies los órganos ampulares presentan gránulos de secreción conspicuos, mientras que en otras no se forman dichos gránulos, relacionándolo con la capacidad de las primeras especies para fijarse de nuevo al sustrato si son arrancadas del mismo, y atribuyendo al contenido de los gránulos propiedades cementantes. KATOW & WATANABE (1978) describen la presencia de gránulos de secreción de contenido electrodenso en las ampollas terminales del sistema vascular en *Botryllus primigenius* Oka, mientras que

FIGURAS 1-7. *Diplosoma spongiforme* (Giard).

FIGURAS 8-12. *Polysyncraton lacazei* (Giard).

FIGURA 1. Visión lateral de la larva. Las flechas indican los órganos ampulares. pa: papilas adhesivas. x 56.

Lateral view of the larva. Arrows mark the ampular organs. pa: adhesive papillae. x 56.

FIGURA 2. Estadio metamórfico mostrando el desarrollo de los órganos ampulares (cabezas de flecha). x 56.

Metamorphic stage showing the development of the ampular organs (arrowheads). x 56.

FIGURA 3. Extremo distal de un órgano ampular de la larva, mostrando la disposición de las células secretoras. h: hemocele; t: túnica. x 1.880.

Tip of an ampular organ showing the arrangement of the secretory cells. h: hemocoel; t: tunic. x 1.880.

FIGURA 4. Zona basal de una célula secretora. g: gránulo de secreción; mb: membrana basal; n: núcleo. x 9.720.

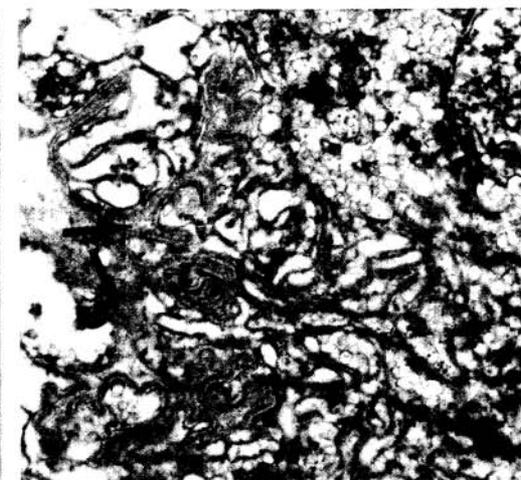
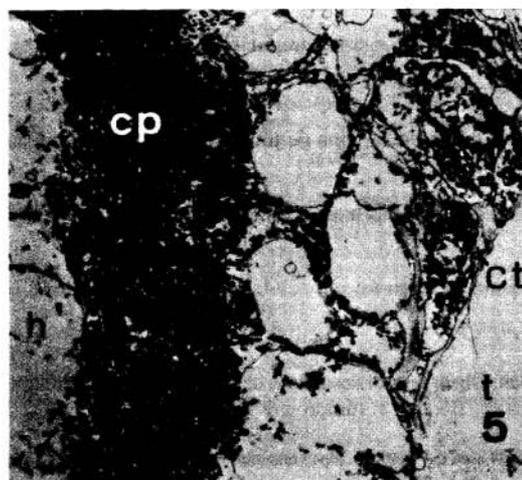
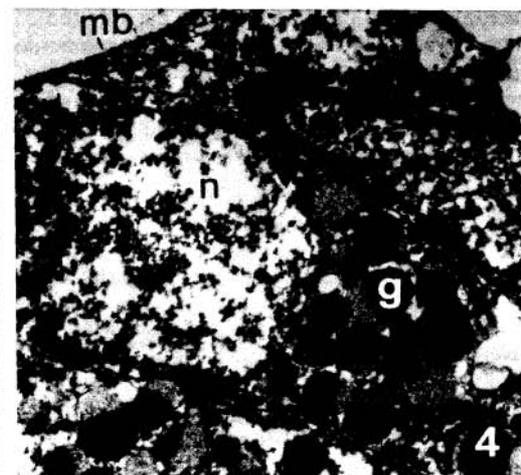
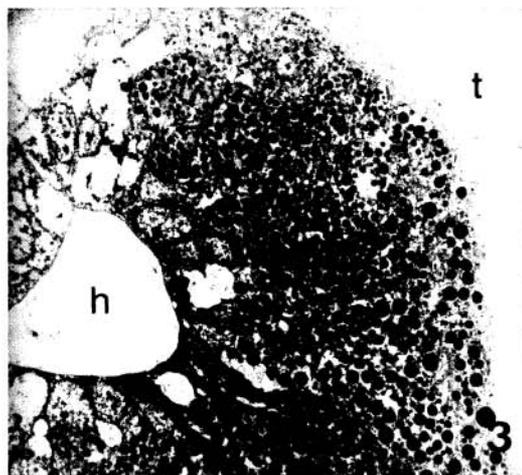
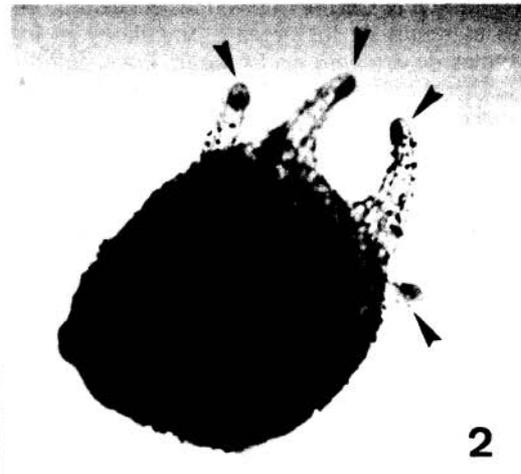
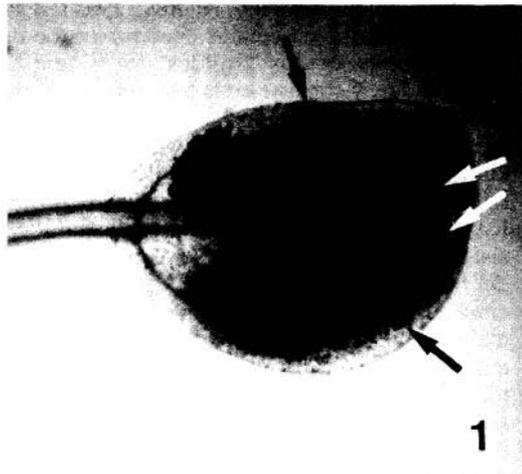
Basal region of a secretory cell. g: secretion granule; mb: basement membrane; n: nucleus. x 9.720.

FIGURA 5. Vista general de la pared lateral de un órgano ampular. cp: células de la pared; ct: células desplazadas hacia la túnica; h: hemocele; t: túnica. x 2.500.

General view of the ampular organ's lateral wall. cp: wall cells; ct: cells entering the tunic space; h: hemocoel; t: tunic. x 2.500.

FIGURA 6. Zona basal de una célula de la pared de un órgano ampular. Obsérvese el profundo plegamiento de la membrana basal (flechas). x 16.400.

Basal zone of a cell of the wall. Notice the deep infoldings of the basement membrane (arrows). x 16.400.



TORRENCE & CLONEY (1981) los encuentran en los extremos de los órganos ampulares en juveniles de *Molgula occidentalis*. Estos autores confieren a dichas secreciones el papel de sustancias cementantes. La observación de estadios postmetamórficos permite apreciar que, efectivamente, los órganos ampulares de *Diplosoma spongiforme* juegan un importante papel en el anclaje de la colonia en estadios juveniles, mientras que en *Polysyncraton lacazei* la función adhesiva, si existe, es mucho menos importante, dado el escaso desarrollo de estas estructuras después de la metamorfosis.

Por otro lado, en ambas especies hay indicios de que los órganos ampulares intervienen en la secreción de túnica. En *Polysyncraton lacazei* esto se manifiesta por la naturaleza secretora de sus células (las distales especialmente) y por la presencia de una capa de túnica más clara, en la que todavía no han aparecido fibras, frente a ellas. En *Diplosoma* el fenómeno se da principalmente en las células laterales: el citoplasma apical de las células se vacuoliza y se transforma, en un proceso muy similar al

denominado tunificación (PÉRÈS, 1947). Este autor lo describe en células epidérmicas de diversas zonas de los zooides de la familia Didemnidae, y consiste en la transformación del citoplasma distal de las células en sustancia tunical, arrastrando núcleos y fragmentos de citoplasma hacia la túnica. Una descripción detallada de un fenómeno similar la han realizado KATOW & WATANABE (1978) en las células del sistema vascular de *Botryllus* (sistema derivado de los órganos ampulares de la larva); el citoplasma distal de las células se convierte en una región clara, de contenido similar a la túnica, que se separa de las células y migra hacia la túnica, donde acaba por desaparecer. En *Diplosoma* este fenómeno puede deberse, bien sea al crecimiento de las vesículas en la región distal, que acaba desgajando fragmentos de células con núcleos, bien al movimiento ameboide de las propias células hacia la túnica.

Otra característica del epitelio ampular en *Diplosoma* ausente en *Polysyncraton* es el alto grado de plegamiento de su superficie basal. Ello está posiblemente relacionado con el dis-

FIGURA 7. Detalle de la zona apical de las células de la pared (cp) mostrando la desorganización y vacuolización del citoplasma distal y el desplazamiento de células filopodiales (ct) hacia la túnica, quedando unidas a la pared del órgano ampular por estrechos puentes citoplasmáticos (cabezas de flecha). x 4.240.

Detail of the apical region of the cells in the wall (cp) featuring vacuolation and disorganization of the apical cytoplasm and migration of filopodial cells (ct) into the tunic. Slender cytoplasmic bridges (arrowheads) are established between them and the cells in the wall. x 4.240.

FIGURA 8. Visión lateral de la larva de *Polysyncraton lacazei* mostrando la corona de órganos ampulares (oa) y las papilas adhesivas (pa). x 53.

Lateral view of the larva of *Polysyncraton lacazei* showing the collar of ampular organs (oa) and the adhesive papillae (pa). x 53.

FIGURA 9. Estadio postmetamórfico mostrando el crecimiento de los órganos ampulares (flechas). x 120.

Postmetamorphic stage showing the development of the ampular organs (arrows). x 120.

FIGURA 10. Sección longitudinal de un órgano ampular. Obsérvese la zona de túnica clara en la parte distal del mismo (flechas). ch: células hemocélicas; t: túnica. x 407.

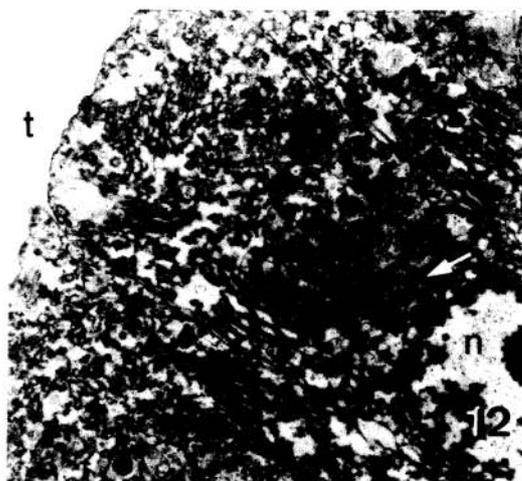
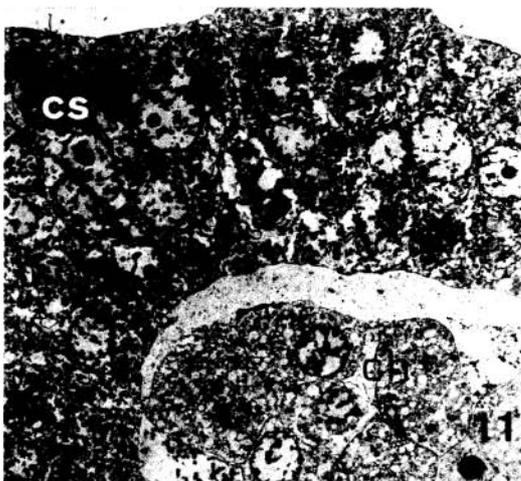
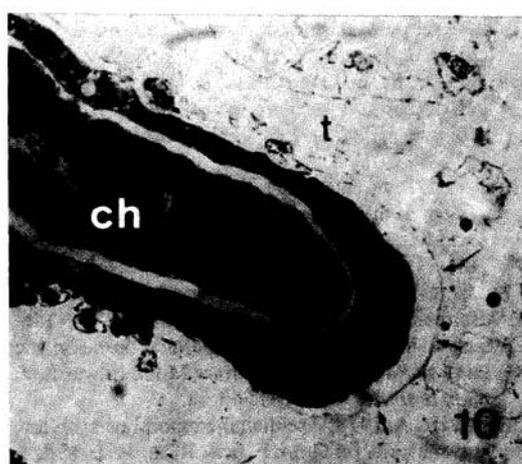
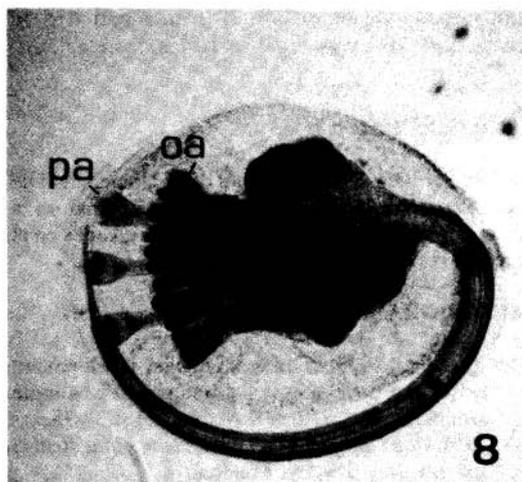
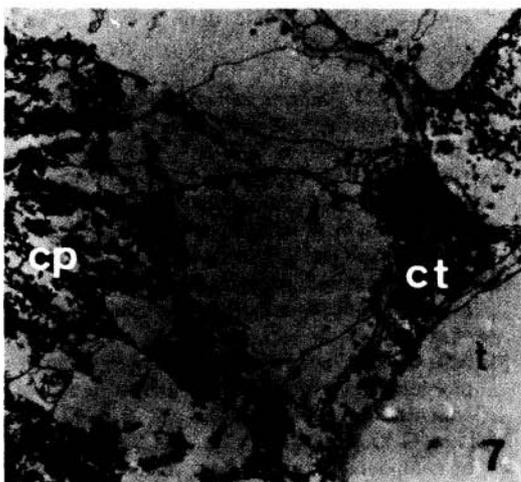
Longitudinal section of an ampular organ. Notice the clear region in the tunic surrounding the distal tip (arrows). ch: hemocoelic cells; t: tunic. x 407.

FIGURA 11. Región distal de un órgano ampular. cs: células secretoras; ch: células hemocélicas. x 1.690.

Distal region of an ampular organ. cs: secretory cells; ch: hemocoelic cells. x 1.690.

FIGURA 12. Región apical de las células secretoras distales. Obsérvese el desarrollo del retículo endoplasmático, dictiosomas, gránulos de secreción y cuerpos membranosos (flecha). t: túnica. x 7.500.

Apical cytoplasm of a secretory cell from the tip of the ampular organ. Notice the well developed endoplasmic reticulum, Golgi systems, vesicles and membranous bodies (arrow). x 7.500.



tinto grado de extensión que alcanzan tras la metamorfosis estos órganos en las dos especies.

AGRADECIMIENTOS

Al Servicio de Microscopía de la Universidad de Barcelona, por la eficaz ayuda de su personal en la resolución de los problemas técnicos planteados en el presente estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- BERRILL, N. J. 1929. Studies in tunicate development. I. General physiology of development of simple ascidians. *Phil. Trans. Roy. Soc.*, 218: 37-78.
- 1950. *The Tunicata. With an account of the British species*. Ray Society. London.
- BREWIN, B. I. 1959. An account of larval budding in the compound ascidian *Hypsistozoa fasmeriana*. *Quart. J. Microsc. Sci.*, 100: 575-589.
- BRUNETTI, R. & BURIGHEL, P. 1969. Sviluppo dell'apparato vascolare coloniale in *Botryllus schlosseri* (Pallas). *Pubbl. Staz. Zool. Napoli*, 37: 137-148.
- BURIGHEL, P. & BRUNETTI, R. 1971. The circulatory system in the blastozoid of the colonial ascidian *Botryllus schlosseri* (Pallas). *Boll. Zool.* 38: 273-289.
- CARLISLE, D. B. 1961. Locomotory powers of adult ascidians. *Proc. Zool. Soc. London*. 136: 141-146.
- CARLISLE, M. A. 1952. On ampullary tissue in the larva of *Polyclinum aurantium* Milne Edwards. *J. mar. biol. Ass. U.K.*, 31: 63-64.
- CLONEY, R. A. 1978. Ascidian metamorphosis: review and analysis. In: CHIA, F. S. & RICE, M. E. (Eds.), *Settlement and metamorphosis of marine invertebrate larvae*: 255-282. Elsevier North Holland Biomedical Press. New York.
- 1982. Ascidian larvae and the events of metamorphosis. *Amer. Zool.*, 22: 817-826.
- CLONEY, R. A. & TORRENCE, S. A. 1984. Ascidian larvae, structure and settlement. In: COSTLOW, J. D. & TIPPER, R. C. (Eds.), *Marine biodeterioration: interdisciplinary study*: 141-148. Naval Institute Press. Annapolis.
- DE SANTO, R. S. & DUDLEY, P. L. 1969. Ultramicroscopic filaments in the ascidian *Botryllus schlosseri* (Pallas) and their possible role in ampullar contractions. *J. Ultrastr. Res.*, 28: 259-274.
- GRAVE, C. 1921. *Amaroucium constellatum* (Verrill). II. The structure and organization of the tadpole larva. *J. Morph.*, 36: 71-101.
- KATOW, H. & WATANABE, H. 1978. Fine structure and possible role of ampullae on tunic supply and attachment in a compound ascidian. *Botryllus primigenius* Oka. *J. Ultrastr. Res.*, 64: 23-34.
- LANE, D. J. W. 1973. Attachment of the larva of the ascidian *Diplosoma listerianum*. *Mar. Biol.*, 21: 47-58.
- MACKIE, G. O. 1986. From aggregates to integrates: physiological aspects of modularity in colonial animals. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, 313: 175-196.
- MACKIE, G. O. & SINGLA, C. L. 1983. Coordination of compound ascidians by epithelial conduction in the colonial blood vessels. *Biol. Bull.*, 165: 209-220.
- MILLAR, R. H. 1951. The stolonial vessels of the Didemnidae. *Quart. J. micr. Sci.*, 92(3): 249-254.
- MUKAI, H.; SUGIMOTO, K. & TANEDA, Y. 1978. Comparative studies on the circulatory system of the compound ascidians, *Botryllus*, *Botrylloides* and *Symplegma*. *J. Morph.*, 157: 49-78.
- NEWBERRY, A. T. 1965. Vascular structures associated with budding in the polystyelid ascidian *Metandrocarpa taylori*. *Ann. Soc. Roy. Zool. Belg.*, 95: 57-74.
- PÉRÈS, J. M. 1947. Note sur le genre *Trididemnum* dans la région de Dinard, accompagnée de remarques sur les organes latéraux des Didemnidae. *Bull. Inst. Oceanogr., Monaco*, 914: 1-15.
- 1948. Recherches sur la genèse et la régénération de la tunique chez *Clavelina lepadiformis* Müller. *Arch. Anat. Micr.*, 37: 230-260.
- SCOTT, F. M. 1946. The developmental history of *Amaroecium constellatum*. II. Organogenesis of the larval action system. *Biol. Bull.*, 91: 66-80.
- 1952. The developmental history of *Amaroecium constellatum* III. Metamorphosis. *Biol. Bull.*, 103: 226-241.
- TORRENCE, S. A. & CLONEY, R. A. 1981. Rhythmic contractions of the ampullar epidermis during metamorphosis of the ascidian *Molgula occidentalis*. *Cell Tissue Res.*, 216: 293-312.