
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

RENZO NOBILI

Il dimorfismo nucleare dei Ciliati: inerzia vegetativa del micronucleo

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 32 (1962), n.3, p.
392-396.*

Accademia Nazionale dei Lincei

http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1962_8_32_3_392_0

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

Zoologia. — *Il dimorfismo nucleare dei Ciliati: inerzia vegetativa del micronucleo* ^(*). Nota di RENZO NOBILI, presentata ^(**) dal Corrisp. M. BENAZZI.

Il dimorfismo nucleare è un carattere peculiare dei Ciliophora. In questo *subphilum* dei Protozoi si osservano infatti uno o più micronuclei ed uno o più macronuclei, diversi tra loro non solo per le dimensioni ma anche per il loro comportamento durante la riproduzione vegetativa e sessuale. Il micronucleo si divide mitoticamente ad ogni scissione e meioticamente durante la riproduzione sessuale, mentre il macronucleo si divide amitoticamente o non si divide affatto durante la scissione, e durante la riproduzione sessuale viene di solito eliminato formandosene uno nuovo a partire dal *sincarion* di origine micronucleare. Si è ammesso e viene tuttora riportato nei Testi che il micronucleo abbia funzioni generative, mentre il macronucleo avrebbe prevalentemente funzioni trofiche. Ma le ricerche più recenti hanno dimostrato che al macronucleo compete il controllo genetico delle caratteristiche fenotipiche.

Anzi tutto occorre ricordare che il macronucleo dei Ciliati viene considerato in genere poliploide ⁽¹⁾, fatto questo che differenzierebbe in maniera netta il macro- dal micronucleo; ciò è stato dedotto dalle sue dimensioni che, eccetto in *Dileptus*, sono sempre di gran lunga superiori a quelle del micronucleo. Tuttavia la presenza di cromosomi è ancora cosa congetturata più che accertata (Canella 1957), anche se recenti lavori (Schwartz 1958, Saito 1961, Kaneda 1961) sembrerebbero indicare una struttura cromosomica all'interno del macronucleo. Da ricerche istochimiche risulta comunque che il macronucleo è formato essenzialmente dagli stessi costituenti del micronucleo, e cioè DNA, RNA e proteine, presenti in quantità uguali per unità di volume nei due tipi di nuclei. Questi reperti si riferiscono a *Paramecium caudatum* (Moses 1950) e sono stati confermati anche per *P. aurelia* da Woodard e Swift (dati inediti). Da questo fatto si può presumere che anche il DNA macronucleare sia organizzato in cromosomi analogamente a quello del micronucleo.

(*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Zoologia e Anatomia comparata dell'Univ. di Pisa.

(**) Nella seduta del 10 Marzo 1962.

(1) Il dimorfismo nucleare presenta manifestazioni di complessità crescenti all'interno dei Ciliati. In *Stephanopogon mesnili* (Lwoff 1936) sono presenti 2 nuclei simili per cui è impossibile distinguere tale dualismo; nei *Loxodidae* e nel genere *Trachelocerca* il macronucleo non si divide mai e si forma dal micronucleo ad ogni divisione vegetativa (Fauré-Fremiet 1954, Raikov 1958, 1959). Secondo Raikov il macronucleo di queste specie sarebbe incapace di dividersi perché diploide, considerando l'autore lo stato poliploide come indispensabile alla divisione del macronucleo.

L'ipotesi di un macronucleo poliploide ha ricevuto conferma dalle ricerche genetiche compiute su varie specie di Ciliati, dopo che Sonneborn (1937) determinò l'esistenza di tipi di coniugazione all'interno di popolazioni di *P. aurelia*. Le ricerche genetiche anzitutto hanno precisato che il fenotipo è sotto il controllo genetico del macronucleo (Sonneborn 1947); in secondo luogo che in caso di frammentazione del macronucleo e successiva rigenerazione di un macronucleo da ciascun frammento, i macronuclei così rigenerati hanno lo stesso genotipo del macronucleo « parente » che si era frammentato per tutti i loci studiati. Data per certa questa differenza fra i 2 tipi di nuclei, basata sulla poliploidia del macronucleo, si discute ancora circa l'organizzazione ed il livello che questa poliploidia può raggiungere.

Nei casi di frammentazioni naturali il numero dei frammenti varia da 32 a 40, il che farebbe supporre che il macronucleo sia formato da altrettanti subnuclei diploidi o poliploidi (Sonneborn 1947). Al microscopio elettronico (Dippel, dati inediti) non si coglie una struttura subnucleare del macronucleo, né in Parameci né in *Tetrahymena*, però Allen e Nanney (1958) studiando il meccanismo di stabilizzazione dei tipi di coniugazione in autoconiuganti della varietà 1 di *T. pyriformis* ottennero reperti spiegabili essenzialmente sulla base di una struttura macronucleare a subunità. Infatti i dati ottenuti si adattano perfettamente ad un modello matematico formulato indipendentemente da Schensted (1958) sulla base di 45-50 subunità presenti in ogni macronucleo appena divisosi. Contro l'idea di subunità macronucleari sta l'ipotesi avanzata da Kimball (1943) che il macronucleo sia un « contenitore disordinato » (*grab-bag*) altamente poliploide di cromosomi. Quale sia il suo grado di poliploidia si può dedurre dal rapporto tra DNA micro- e DNA macronucleare; a tal proposito Woodard e Swift hanno trovato un rapporto di 1 : 500. Se ammettiamo una uguale concentrazione, come è stato dimostrato in *P. caudatum* (Moses loc. cit.), di DNA per unità di volume nel micro e nel macronucleo, allora il livello di ploidia dipende e varia con le dimensioni del volume macronucleare. In *P. aurelia* il livello di ploidia varierebbe tra 200 e 600 *n*. Nello *stock* da me usato oscillerebbe in media al momento della divisione tra 180 e 1200 *n*, cioè tra 90 e 600 *n* per cellule figlie se la scissione del macronucleo è regolare.

Si può dedurre il grado di ploidia anche per altra via, studiando cioè Parameci con macronucleo rigenerato. Partendo da un clone eterozigote, distinguibile da entrambi gli omozigoti per uno o più loci non associati, si può vedere se un allele della o delle coppie è andato perduto nella frammentazione macronucleare e successiva rigenerazione. Sonneborn e Tallan (dati non pubblicati) hanno esaminato 419 cloni di *P. aurelia* originatisi per rigenerazione da singoli frammenti di uno stesso macronucleo, senza osservare la perdita di alcun allele. Io ne ho esaminati un totale di 538 ed in tutti ho riscontrato la presenza dei 2 alleli originari. Nell'ipotesi di una distribuzione casuale dei cromosomi macronucleari ai frammenti in cui si spezza il macronucleo, si può calcolare, entro un intervallo di fiducia del 95 %, che il livello di ploidia deve variare fra 320 *n* e 400 *n* nel macronucleo originario,

dato che questo produce da 32 a 40 pezzi. È evidente che nel caso di segregazione di genomi intatti, secondo l'ipotesi di una struttura a subunità del macronucleo, una ploidia da $64n$ a $80n$ è sufficiente a spiegare i risultati.

Dai dati suesposti si rileva che il livello di ploidia del macronucleo di *P. aurelia* oscillerebbe almeno tra $80n$ e $400n$. Considerando questo alto livello, a cui si perviene attraverso varie vie, non si può per ora escludere nessuna delle 2 alternative avanzate circa la organizzazione del macronucleo, cioè a subunità ognuna con genomi completi, oppure con cromosomi in numero poliploide ma distribuiti casualmente.

Il macronucleo, come già accennato, controlla completamente o quasi il fenotipo (Sonneborn 1946), ma non si hanno prove sicure che il micronucleo sia completamente inerte. Moses (loc. cit.), basandosi sull'attività micronucleare durante la riproduzione vegetativa, altrettanto intensa quanto quella del macronucleo, avanza l'ipotesi che i geni micronucleari non raggiungano l'espressione fenotipica, nel caso in cui i due nuclei abbiano costituzione genotipica diversa, perché soverchiati da quelli macronucleari molto più numerosi. Da un punto di vista bio-istochimico non ci sarebbe infatti alcuna differenza tra i due nuclei, almeno in *P. caudatum* ed in *P. aurelia*. È ben noto tuttavia che forme amiconucleate di Ciliati possono vivere e riprodursi per scissione in maniera normale, mentre forme amacronucleate vengono prima o poi a morte. Si conoscono però casi in cui l'assenza del micronucleo ha una certa influenza nei fenomeni di rigenerazione e nel ritmo di scissione (Tartar 1940, Schwartz 1947, Miyake 1956). In vista anche di queste differenze qualitative nell'ambito del gruppo dei Ciliati, si potrebbe allora supporre che la morte delle forme amacronucleate dipenda dalla incapacità di portare avanti le sintesi necessarie per l'accrescimento e l'attivo metabolismo da parte del micronucleo, data la sua ridotta mole, più che da una sua inerzia o inattività totale nel periodo di riproduzione vegetativa. Secondo Polyanskiĭ e Raikov (1960) il dimorfismo nucleare dei Ciliati sarebbe infatti sorto ed evoluto verso una poliploidizzazione del macronucleo proprio come risposta all'aumento delle complicazioni strutturali e dell'attività metabolica degli stessi.

Per saggiare tali ipotesi, cioè se i geni micronucleari sono attivi ma non vengono espressi perché in netta minoranza, e se la morte degli amacronucleati è dovuta a difetto di dosaggio e non ad inerzia micronucleare, ho esaminato il comportamento di amacronucleati di *P. aurelia* con un numero variabile di micronuclei. Usando la tecnica della rigenerazione del macronucleo durante la riproduzione sessuale autogamica, ho ottenuto alcuni cloni eterozigoti in più loci per marcatori sierotipici semidominanti nel macronucleo e omozigoti invece nel micronucleo. Entrambi gli alleli dei vari loci erano espressi negli individui normali (Nobili 1961). Ho esaminato poi il comportamento di amacronucleati con micronuclei a varia distanza di tempo dalla loro origine e precisamente dopo 5, 10, 25 ore. In tutti i casi in cui la reazione antigene-anticorpo si è manifestata chiaramente, tutti gli ama-

cronucleati hanno sempre risposto ad entrambi i sieri per i 2 alleli dei vari loci esaminati. Per esempio la costituzione genotipica macronucleare era $\frac{a^{51} d^{51} e^{32}}{a^{29} d^{32} e^{51}}$, mentre quella micronucleare corrispondente risultava essere $\frac{a^{51} d^{32} e^{51}}{a^{51} d^{32} e^{51}}$; il fenotipo espresso dagli amacronucleati era congruente con la costituzione genotipica del macronucleo assente, cioè era ancora eterozigote. Per spiegare questi risultati si potrebbe pensare ad un effetto di omeostasi epigenetica (Nanney 1958) od anche ad un « lag » citoplasmatico, anziché ad una inattività di tali geni nel micronucleo. Tuttavia se si tien conto che il micronucleo è rimasto allo stato omozigote per decine di generazioni vegetative ed alcune sessuali prima del prelevamento degli amacronucleati, ci si aspetterebbe una prevalenza immediata o quasi dei geni micronucleari, non appena il macronucleo è stato rimosso, se tali geni nel micronucleo fossero veramente attivi. Non essendosi verificata tale azione se ne deduce quindi che in *P. aurelia*, nelle condizioni sperimentali usate e per i geni esaminati, il micronucleo è completamente *inerte* anche nelle forme amacronucleate.

Tale inerzia si deduce pure per altra via. Le forme amacronucleate vengono a morte in un tempo più o meno breve anche quando il numero dei micronuclei è tanto elevato da riportare il rapporto N/C entro limiti confacenti alla vitalità, qualora il micronucleo stesso fosse attivo. Ho esaminato infatti i rapporti N/C di amacronucleati appena formati, dopo 5 ore e dopo 20 ore. Su 25 individui per ciascuna delle 3 classi il rapporto N/C medio è risultato essere 0,00084; 0,00088; 0,0023 rispettivamente, con un campo di variabilità da 0,0006 a 0,0052. Venticinque individui che avevano ricevuto poco macronucleo al momento del loro formarsi presentano un rapporto N/C iniziale medio di 0,0071, con campo di variabilità da 0,0012 a 0,0099. Da questi dati sintetici si rileva che vi è parziale sovrapposizione nei valori dei rapporti N/C tra forme amacronucleate con molti micronuclei e forme con poco macronucleo. Tuttavia le prime vengono a morte, mentre le seconde sono capaci di sopravvivere e riportarsi in condizioni normali (Nobili 1961). Si deve pertanto concludere che anche quando non vi è differenza di dosaggio genico, come nel caso sopra descritto, le forme amacronucleate muoiono per la totale inerzia dei geni micronucleari. In questo caso infatti la quantità di DNA è la stessa, ma l'attività risulta diversa, per cui il DNA micronucleare deve considerarsi geneticamente inerte, almeno durante la vita vegetativa.

Probabilmente il ruolo preponderante del macronucleo è legato non solo alla poliploidizzazione, nelle forme che la presentano, ma anche al processo di differenziamento che ha luogo durante il suo sviluppo a partire dal sinca- rion; differenziamento che sembra essere sotto il controllo citoplasmatico. Nei Ciliophora si avrebbe pertanto un nucleo (macronucleo) che si differenzia durante lo sviluppo poliploidizzandosi e che è capace di rigenerare un nucleo simile a se stesso senza sdifferenziarsi, ed un nucleo (micronucleo) non differenziatosi e capace solo di generare un nuovo macronucleo attraverso un processo sessuale.

BIBLIOGRAFIA.

- ALLEN S. L., NANNEY D. L., *An analysis of nuclear differentiation in the selfers of Tetrahymena*, « Amer. Nat. », 92, 139–160 (1958).
- CANELLA M. F., *Studi e ricerche sui Tentaculiferi nel quadro della biologia generale*, « Ann. Univ. Ferrara », S. III, Biol. Anim., I, 259–716 (1957).
- FAURE-FREMIET E., *Réorganisation du type endomixique chez les Loxodidae et chez les Centrophorella*, « J. Protozool. », 1, 20–27 (1954).
- KANEDA M., *Fine structure of the macronucleus of the gymnostome ciliate Chlamydon pedarius*, « Jap. J. Genetics », 36, 223–234 (1961).
- KIMBALL R. F., *Mating types in the ciliate protozoa*, « Quart. Rev. Biol. », 18, 30–45 (1943).
- LWOFF A., *Le cycle nucléaire de Stephanopogon mesnili Lw. (Cilié homocaryote)*, « Arch. Zool. exp. gén. », 78, 117–132 (1936).
- MIYAKE A., *Artificially induced micronuclear variation in Paramecium caudatum*, « J. Inst. Polytechn. Osaka City Univ. », ser. D, 6, 43–57 (1956).
- MOSES M. J., *Nucleic acids and proteins of the nuclei of Paramecium*, « J. Morph. », 87, 493–536 (1950).
- NANNEY D., *Epigenetic factors affecting mating type expression in certain ciliates*, « Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol. », 23, 327–335 (1958).
- NOBILI R., *Effetti della rigenerazione del macronucleo sulla vitalità di Paramecium aurelia, syngen 4*, « Atti A. G. I. », 6, 75–86 (1960).
- NOBILI R., *Variazioni volumetriche del macronucleo e loro effetti nella riproduzione vegetativa in Paramecium aurelia*, « Atti Soc. Tosc. Sc. Nat. », 67, 217–232 (1961).
- POLYANSKII YU. I., RAIKOV I. B., *The role of polyploidy in the evolution of protozoa*, « Citologia » (Tsitologia, Russa) 2, 509–518 (1960).
- RAIKOV I. B., *Der Formwechsel des Kernapparates einiger niederer Ciliaten. – I. Die Gattung Trachelocerca*, « Arch. Protistenk. », 103, 129–194 (1958).
- RAIKOV I. B., *Der Formwechsel des Kernapparates einiger niederer Ciliaten. – II. Die Gattung Loxodes*, « Arch. Protistenk. », 104, 1–44 (1959).
- SAITO M., *A note on the duplication process of macronuclear chromosomes in a peritrichous ciliate Vorticella campanula*, « Jap. J. Genetics », 36, 184–186 (1961).
- SCHENSTED I. V., *Model of subnuclear segregation in the macronucleus of Cilates*, « Amer. Nat. », 92, 161–170 (1958).
- SCHWARTZ V., *Ueber die Physiologie des Kerndimorphismus bei Paramecium bursaria*, « Z. Naturforsch. », 26, 369–381 (1947).
- SCHWARTZ V., *Chromosomen in Makronucleus von Paramecium bursaria*, « Biol. Zbl. », 77, 347–364 (1958).
- SONNEBORN T. M., *Sex, sex inheritance and sex determination in P. aurelia*, « Proc. Natl. Acad. Sci., Wash. », 23, 378–395 (1937).
- SONNEBORN T. M., *Inert nuclei: inactivity of micronuclear genes in variety 4 of Paramecium aurelia*, « Genetics », 31, 231 (1946).
- SONNEBORN T. M., *Recent advances in the genetics of Paramecium and Euplotes*, « Adv. in Genetics », 1, 263–358 (1947).
- TARTAR V., *Nuclear reactions in Paramecium*, « Anat. Rec. », 78 (Suppl.), 109 (1940).