

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

# RENDICONTI

---

VITTORIO GREMIGNI

**Ricerche istochimiche e ultrastrutturali  
sull'ovogenesi dei Tricladi. I: Inclusi deutoplasmatici  
in Dugesia lugubris e Dugesia benazzii**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 47 (1969), n.1-2, p.  
101–108.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1969\\_8\\_47\\_1-2\\_101\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1969_8_47_1-2_101_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/>



### SEZIONE III

(Botanica, zoologia, fisiologia e patologia)

**Zoologia.** — *Ricerche istochimiche e ultrastrutturali sull'ovogenesi dei Tricladi. I: Inclusi deutoplasmatici in Dugesia lugubris e Dugesia benazzii* (\*). Nota (\*\*) di VITTORIO GREMIGNI, presentata dal Corrisp. M. BENAZZI.

SUMMARY. — Ovarian oocytes of the fresh-water Triclads *Dugesia lugubris* and *D. benazzii* have been studied by means of histochemical and electron microscopical techniques.

In the oogenesis, two periods have been distinguished which may be characterized as previtellogenetic and vitellogenetic. During the first period oocytes slightly increase in size and their cytoplasm shows a high RNA content. At the onset of vitellogenesis many small vesicles filled with electron dense granules of 270–280 Å begin to appear; later on these vesicles fuse together and form large yolk globules. The oocytes remarkably increase in size throughout this period and their stainability shows clear changes.

On the basis of reported findings the egg of these *Dugesia* species can be regarded as slightly lecithal.

#### INTRODUZIONE.

Le uova dei Tricladi sono comunemente definite alecitiche o ectolecitiche come risulta dalle più note monografie su questo gruppo di Platelmini: Bresslau [1], Hyman [2], De Beauchamp [3]. Il secondo termine deriva dal fatto che tali animali sono provvisti, oltre che di due ovari (germigeni), di estesi vitellogeni le cui cellule, ricchissime di materiali di riserva, migrano in gran numero nel bozzolo insieme alle uova e sono successivamente devolute alla nutrizione degli embrioni in sviluppo che le inglobano tramite il faringe primitivo. Tale caratteristica anatomica e la mancanza di recenti ricerche condotte con tecniche aggiornate hanno fatto sì che neppure nelle più ampie e particolareggiate monografie sulla ovogenesi Raven [4], Svrivastava [5], Norrevang [6], siano riportati i numerosi, anche se di solito fuggevoli e non sufficientemente documentati, reperti esistenti in letteratura sulla presenza di vitello nel citoplasma di ovociti di planarie.

Il primo dato sul vitello endoovocitario in un Triclade si trova in un lavoro di Metschnikoff [7] su *Planaria polychroa* (= *Dugesia lugubris*), ma Hallez [8] non confermò tale reperto definendo in generale alecitiche le uova delle planarie.

Curtis [9] descrisse nelle uova di *Planaria simplissima* (= *Curtisia foremanii*): « an increasing number of what seem to be vacuoles containing irregular masses, which may be in turn vacuolated, or globules, of different

(\*) Istituto di Zoologia e Anatomia Comparata dell'Università di Pisa.

(\*\*) Pervenuta il 2 agosto 1969.

degrees of refraction. These vacuoles occur in great number at the peripheral parts of the cytoplasm in every large ovum ». Mattiesen [10] affermò che nel citoplasma periferico degli ovociti ovarici di *Dendrocoelum lacteum* sono presenti dei « Dotterkörnchen ».

In seguito Stoppenbrink [11] e Schleip [12] in *Dugesia gonocephala* parlano in generale di vitello presente nel citoplasma degli ovociti, senza tuttavia dare ulteriori precisazioni.

Un dato interessante è quello di Böhmig [13], l'unico a me noto che riferisca sulla presenza di vitello in ovociti di Tricladi marini, ma anche in questo caso si tratta di un accenno molto generico e non documentato nei disegni.

Sembrat [14] ha ripreso alcune di queste prime frammentarie osservazioni ed in una memoria sulla gametogenesi di *Dugesia gonocephala* e di *Dendrocoelum lacteum* tratta più approfonditamente il problema della vitellogenesi, giungendo alla conclusione che negli ovociti della prima specie si può veramente parlare di vitello; egli lo ritiene « of an albuminous nature, though it is possible that some quantity of lipoids may also take a part in forming the yolk material ». Per *Dendrocoelum* invece afferma che: « there is a lack of yolk and the marginal granules appear ». Più recentemente Achtelick [15] ha confermato i risultati di Sembrat, ma pur potendo avvalersi di tecniche istochimiche più sicure e specifiche non ha chiarito la morfologia, la origine e la composizione del: « stored reserve material in the form of large yolk globules » degli ovociti di *D. gonocephala*; conclude che la presenza di vitello è anche testimoniata dal notevole decremento di RNA citoplasmatico durante la maturazione degli ovociti, dovuto ad intensa sintesi di proteine e tra queste probabilmente di « substances-yolk ». L'autore considera invece alecittiche le uova di *D. lacteum* [16].

Benazzi Lentati e Del Papa [17] hanno riproposto il problema per *D. lugubris*, in base ad osservazioni occasionalmente compiute su ovociti metafasici *in toto*, estratti dal bozzolo ed usufruiti per studi cariologici. Successivamente le ricerche sono state estese agli ovociti ovarici della stessa specie da Benazzi Lentati e Gremigni [18] applicando le più comuni tecniche istochimiche. È stato dimostrato che alla periferia degli ovociti diplotenici si vanno manifestando vacuoli contenenti formazioni discoidali interpretabili come vitello, che potrebbe essere utilizzato quale materiale di riserva dallo zigote durante le prime fasi dello sviluppo; è stato perciò ipotizzato che, almeno per la specie studiata, l'uovo non sia alecittico.

La discordanza di tutti questi dati e l'importanza del problema, anche ai fini di una più chiara interpretazione dei primi stadi di sviluppo dell'uovo dei Tricladi, mi hanno indotto ad approfondire l'indagine, ampliando l'esame istocitochimico ed avvalendomi della microscopia elettronica <sup>(1)</sup>.

(1) Le ricerche di microscopia elettronica sono state iniziate nell'Istituto di Anatomia Patologica dell'Università di Pisa, sotto la guida del prof. V. Marinuzzi e con l'aiuto della d.ssa N. Corvaja, e proseguite nell'Istituto di Zoologia dell'Università di Milano sotto la guida del prof. G. Lanzavecchia. A tutti esprimo la più viva gratitudine.

In questa Nota riporto per esteso i dati di microscopia ottica e riferisco i primi risultati ottenuti al microscopio elettronico. In prossimi lavori esporrò in dettaglio gli aspetti ultrastrutturali delle varie fasi maturative e discuterò i problemi inerenti alla composizione, genesi ed utilizzazione del vitello endoovocitario.

#### MATERIALE E TECNICA.

Ho usufruito di due specie del genere *Dugesia: lugubris e benazzii* <sup>(2)</sup> provenienti dagli allevamenti del nostro laboratorio; ho sempre utilizzato animali in fase di deposizione per avere la certezza che gli ovari fossero maturi.

Per l'esame al microscopio ottico ho fissato il tratto di planaria contenente gli ovari con diversi liquidi: i risultati migliori sono stati ottenuti con Bouin, Zenker e Stieve. Per la ricerca del glicogeno ho usato il liquido di Gendre e il Carnoy a 0°; per l'indagine delle sostanze lipidiche ho usufruito di sezioni fissate in formol-calcio seguito o no da cromizzazione. L'inclusione è stata effettuata in paraffina o in paraffina-celloidina. Ho quindi trattato le sezioni con: Azan, ematossilina Gomori, blu di toluidina, verde metil-pironina, gallocianina-cromallume, Feulgen, alcian blu, P.A.S., sudan nero, sudan III, solfato di blu Nilo (abbinate a prove di solubilità con benzolo, etere, ecc.) mercury-bromphenol blu, Millon, ninhydrin-Schiff, alkanin fast green, argentaftine, cromaffine. Per le indagini enzimatiche ho eseguito estrazioni con ribonucleasi, pepsina, tripsina, diastasi, saliva. Al test con ribonucleasi ho alternato quello con acido perclorico al 10%. Alcune di queste reazioni sono state effettuate anche su materiale fissato e incluso per la microscopia elettronica e sezionato a circa 1  $\mu$ ; le misure degli ovogoni e degli ovociti sono state prese su tali preparati <sup>(3)</sup>. Mi sono valso della microscopia elettronica essenzialmente allo scopo di chiarire la natura dei presunti globuli vitellini; per questa tecnica, dato che gli ovari non sono ovviamente isolabili dai circostanti tessuti, ho prelevato tutta la zona contenente i due germigeni, separandoli con un taglio longitudinale; la zona degli ovociti è stata individuata mediante sezioni orientative di 1-2  $\mu$ . La fissazione è stata eseguita a 0-4°C secondo il metodo Carnovsky [20] in glutaraldeide-paraformaldeide in tampone fosfato a pH 7,3 e molarità 0,05 e 0,1 (Millonig) [21] e postfissati in tetrossido di osmio 1% nello stesso tampone. L'inclusione è stata effettuata in Epon 812 (Luft) [22] e nella miscela Araldite-Epon (Mollenhauer) [23]. Le sezioni sono state ottenute con lame di vetro al microtomo Porter-Blum MT-I, e Ultratome I, contrastate con acetato di uranile e citrato di piombo (Reynolds) [24] e osservate ai microscopi: Siemens elmiscope I, e Hitachi HU 11 E S.

(2) Specie appartenente al «gruppo gonocephala» (cfr. Benazzi) [19].

(3) Preciso che per *D. lugubris* ho usufruito del biotipo diploide.

## OSSERVAZIONI.

Per maggiore chiarezza espongo separatamente i risultati ottenuti nelle due specie prima al microscopio ottico poi a quello elettronico.

*D. lugubris* - Gli ovogoni si trovano alla periferia del germigeno e sono molto simili ai neoblasti dai quali derivano; sono di solito ellittici coi due diametri rispettivamente di 8-9  $\mu$  e di 4-5  $\mu$ . Il nucleo generalmente sferico occupa quasi tutta la cellula, il nucleolo assai piccolo (1-1,2  $\mu$ ) è ben evidente e molto basofilo. Il citoplasma è pure molto basofilo come quello dei neoblasti; ciò è senza dubbio attribuibile alla grande quantità di RNA ribosomale, poiché tale reazione diventa debolissima dopo trattamento con ribonucleasi e con acido perclorico.

Prescindendo dagli stadi nucleari, l'accrescimento degli ovociti può essere generalmente distinto in due fasi principali: la prima previtellogenetica, la seconda vitellogenetica. Mi sembra opportuno introdurre tale distinzione anche per il genere *Dugesia* sebbene non sia mai stata applicata finora alle planarie, per motivi facilmente intuibili da quanto detto nell'introduzione.

Gli ovociti previtellogenetici, che sono adiacenti agli ovogoni, si accrescono limitatamente raggiungendo, prima della fase vitellogenetica, un diametro di 16-20  $\mu$ ; essi tendono ad acquistare forma sferica con nucleo centrale (10-12  $\mu$ ) la cui membrana comincia a lobbarsi tanto che in sezione si notano frequentemente isolette di materiale nucleare nel citoplasma. Il nucleolo si accresce e raggiunge un diametro di circa 2-2,2  $\mu$ . Nel citoplasma non si notano sostanziali differenze fra le varie zone e ancora intensamente positive risultano le reazioni al verde-metil-pironina, alla gallocianina-cromallume e al blu di toluidina a testimonianza di una persistente concentrazione di RNA. La PAS e le reazioni generali per le proteine sono diffusamente positive e pure diffuse ma deboli sono quelle per i grassi. In definitiva si può dire che negli stadi che precedono la sintesi e l'accumulo di vitello, il citoplasma degli ovociti appare molto ricco di RNA con distribuzione uniforme di sostanze glico-lipo-proteiche.

La fase vitellogenetica inizia in concomitanza col diplotene, durante il quale i cromosomi, fino a quel momento ben colorabili e distinti, diventano assai pallidi e despiralizzati e appaiono di aspetto simile ai bivalenti che caratterizzano in generale la fase « lampbrush ». Gli ovociti subiscono un accrescimento rapido e notevole, prevalentemente a carico del citoplasma, fino a raggiungere un diametro di 45-50  $\mu$ . Il nucleo non supera, pur negli ovociti di maggiori dimensioni, i 20-25  $\mu$ , mentre il nucleolo può raggiungere i 4  $\mu$ . (Tav. I, fig. 1). Con l'inizio della vitellogenesi si notano modificazioni nel citoplasma, ben evidenti anche usando tecniche di microscopia ottica: la basofilia decresce rapidamente a causa della diluizione dell'RNA, da mettersi in relazione sia col notevole incremento volumetrico sia col moltiplicarsi dei mitocondri, del complesso di Golgi e di altre strutture citoplasmatiche. La PAS rimane debolmente diffusa ma si nota, senza localizzazione costante, materiale

di colore più intenso che viene digerito dalla saliva ed è quindi interpretabile come glicogeno. Da notare che assai ricche di glicogeno appaiono le cellule stromali che si insinuano tra gli ovociti e sulla cui origine, morfologia e funzione ben poco si conosce. Le reazioni per i grassi rimangono deboli e diffuse; scarse sono le sferule lipidiche isolate.

L'inizio della vitellogenesi è dimostrato dalla comparsa nel citoplasma, con prevalenza nella regione periferica, di piccoli inclusi che aumentano di numero e di dimensioni coll'accrescersi dell'ovocita. Sono basofili; si colorano in blu con l'azan (Tav. I, fig. 3); sono debolmente positivi con il PAS; reagiscono con l'ematosilina Gomori e con l'argentaflina, dando con questa ultima solo un precipitato marrone, la cromaffina è invece negativa. Le reazioni per le proteine, seppur di difficile interpretazione, sono più o meno positive, quelle dei grassi negative. Interessanti le digestioni enzimatiche: negative la ribonucleasi e la saliva, positive le proteasi.

Da notare che successivamente alcuni di questi inclusi, in numero crescente con la progressiva maturazione dell'ovocita, non reagiscono più ai metodi suddetti, risultando di aspetto vitreo e rifrangente; ciò fa supporre che avvenga un cambiamento nel loro stato fisico-chimico.

Nelle sezioni semifini tali inclusi appaiono lobati, a contorni irregolari, diventano numerosi e possono occupare non solo la periferia del citoplasma, ma anche porzioni intermedie estendendosi talora fino alla zona perinucleare. (Tav. I, fig. 2, 4).

Le osservazioni al microscopio elettronico hanno permesso di chiarire la ultrastruttura degli inclusi. Essi derivano dalla confluenza e fusione di numerose piccole vescicole contenenti granuli: ne risultano grossi vacuoli con un globulo centrale denso di forma irregolare e con una sostanza disorganizzata nelle parti periferiche, che va rarefacendosi man mano che gli inclusi maturano (Tav. II, fig. 5); infine, assumono contorni regolari, dimensioni di 2-3  $\mu$  ed una struttura di tipo cristallino, costituita da granuli densi agli elettroni, il cui diametro medio è di 270-280 Å, intervallati da spazi chiari, così che ne risulta un periodo di circa 340 Å (Tav. II, fig. 6).

*D. benazzii* - Gli ovociti di questa specie non presentano, nella fase previtellogenetica, aspetti morfologici ed istochimici notevolmente diversi da quelli descritti in *D. lugubris*. Al termine di questa fase hanno un diametro di 16-18  $\mu$ , nucleo di forma regolare di 10-12  $\mu$  e nucleolo di 1,6-1,7  $\mu$ . Nella fase vitellogenetica subiscono un notevole accrescimento raggiungendo circa 40  $\mu$ , il nucleo si fa sempre più lobato e irregolare e misura 18-20  $\mu$ , i cromosomi assumono anche in questa specie un aspetto simile a quello della fase « lampbrush », il nucleolo oscilla tra i 3 e 4  $\mu$ . Nel citoplasma compaiono vescicole contenenti piccoli globuli che successivamente si fondono fino a ridursi a poche unità di dimensioni peraltro piuttosto rilevanti (il globulo può raggiungere 4-5  $\mu$ , il vacuolo 6-7  $\mu$ ). (Tav. III, figg. 7-8). Le varie tecniche istochimiche usate danno risultati assai simili a quelli ottenuti sugli inclusi di *D. lugubris*. Raramente invece ho notato cambiamenti nella reattività dei globuli

in rapporto alle fasi maturative, il che fa supporre che essi non subiscono (o subiscono solo negli stadi terminali della profase meiotica) modificazioni fisico-chimiche.

L'esame ultrastrutturale dimostra che anche negli stadi precoci di formazione i globuli di vitello hanno contorni regolari e sono contenuti in grossi vacuoli. (Tav. III, fig. 9). Essi consistono in granuli di aspetto uguale a quelli descritti in *D. lugubris* che tuttavia non sembrano organizzarsi in strutture di tipo cristallino.

#### CONCLUSIONI.

Lo studio comparativo dell'ovogenesi in *D. lugubris* e *D. benazzii* ha messo in evidenza che essa è caratterizzata da una fase previtellogenetica e da una fase vitellogenetica; di conseguenza queste uova debbono essere considerate debolmente lecitiche. Gli oogoni e gli ovociti previtellogenetici sono molto ricchi di RNA ribosomale, dimostrato da intensa basofilia che si mantiene molto elevata ed apparentemente costante durante il progressivo accrescimento, tanto che al microscopio ottico non si notano cambiamenti notevoli nella reattività del citoplasma.

Con l'inizio della vitellogenesi si manifestano modificazioni nel nucleo, i cui contorni, dapprima regolari, diventano sempre più lobati, e nel nucleolo che si accresce notevolmente. Contemporaneamente si riscontra un assai rapido incremento di volume interessante soprattutto il citoplasma, la cui basofilia decresce sensibilmente in conseguenza della diluizione dell'RNA, mentre le reazioni dei polisaccaridi, delle proteine e dei lipidi dimostrano la presenza di un substrato glicolipo-proteico, che potrà essere meglio chiarito nelle sue componenti ultrastrutturali da ricerche di microscopia elettronica.

Per quanto riguarda il problema del materiale di riserva, il glicogeno risulta diffusamente distribuito, mentre scarso, seppur con differenze fra ovociti ed ovociti, appare il contenuto in lipidi. Il reperto più importante è offerto dagli inclusi deutoplasmatici, la cui composizione e struttura paiono leggermente diversi nelle due specie. In *D. lugubris* sono rappresentati da globuli che si trovano entro vacuoli e che occupano prevalentemente le regioni periferiche dell'uovo, addensandosi con la progressiva maturazione a formare talvolta degli ammassi irregolari che possono estendersi fino alla zona perinucleare. Le ricerche istochimiche non hanno portato un contributo sicuro alla conoscenza della loro composizione, ma solo una indicazione generale, che fa supporre una complessa natura glicoproteica. Le prime osservazioni al microscopio elettronico hanno chiarito i processi di accrescimento e di maturazione che tali inclusi subiscono: sono inizialmente rappresentati da numerose piccole vescicole contenenti granuli di circa 270-280 Å di diametro le quali successivamente si fondono, dando origine ad un grosso vacuolo entro cui si viene a trovare il globulo di forma regolare, costituito dall'agglomerato dei granuli densi agli elettroni, organizzati in un sistema di tipo cristallino. Molto rarefatta appare invece la sostanza che circonda il globulo. Non sono state ancora compiute al loro livello ricerche di istochimica ultrastrutturale.

In *D. benazzii* al termine della profase meiotica gli inclusi deutoplasmatici sono rappresentati da pochi grossi globuli contenuti in grandi vacuoli e sono assai più localizzati. Le reazioni istochimiche hanno dato presso a poco gli stessi risultati ottenuti per *D. lugubris*. L'indagine ultrastrutturale ha dimostrato che anche in questo caso i globuli sono formati da granuli densi agli elettroni di circa 270–280  $\mu$ .

## BIBLIOGRAFIA.

- [1] E. BRESSLAU, in «Kükenthal, Handbuch der Zoologie», 2, 52 (1928).  
 [2] I. H. HYMAN, «The invertebrates: Platyhelminthes and Rhynchocoela», 2, (1951).  
 [3] P. DE BEAUCHAMP, «Traité de Zoologie», Masson et C. Editeurs. Paris, 4, 35 (1961).  
 [4] C. P. RAVEN, «Oogenesis: the Storage of Developmental Information. Oxford, Pergamon Press, London, New York and Paris 1961.  
 [5] M. D. L. SRIVASTAVA, «Intern. Rev. Cytol.», 18, 73 (1965).  
 [6] A. NORREVANG, «Intern. Rev. Cytol.», 23, 113 (1968).  
 [7] E. METSCHNIKOFF, «Zeit. wiss. Zool.», 38, 331 (1883).  
 [8] P. HALLEZ, «Memoires Soc. Sc. Lille», 16, 7 (1887).  
 [9] W. C. CURTIS, «Proc. Boston Soc. Natur. Hist.», 30, 515 (1902).  
 [10] E. MATTIESEN, «Zeit. wiss. Zool.», 77, 274 (1904).  
 [11] F. STOPPENBRINK, «Zeit. wiss. Zool.», 79, 496 (1905).  
 [12] W. SCHLEIP, «Dug. Zool. Jahrb., Abt. Anat. Ontog.», 23 (1907).  
 [13] L. BÖHMIG, «Zeit. wiss. Zool.», 81, 334 (1906).  
 [14] K. SEMBRAT, «Bull. Acad. Pol. Sci. et Lettr., Cl. Math. Nat.», Ser. B, 691 (1930).  
 [15] W. ACHTELIK, «Zool. Poloniae», 12, 357 (1963).  
 [16] W. ACHTELIK, «Zool. Poloniae», 12, 345 (1963).  
 [17] G. BENAZZI LENTATI e R. DEL PAPA, «Acc. Naz. Lincei», Ser. 8, 38, 945 (1965).  
 [18] G. BENAZZI LENTATI e V. GREMIGNI, «Atti Soc. Tosc. Sci. Nat.» Ser. B, 73, 101 (1966).  
 [19] M. BENAZZI, «Acc. Naz. Lincei Quaderno N. 47», 273 (1960).  
 [20] M. J. CARNOVSKY, «J. Cell Biol.», 27, 137 A (1965).  
 [21] G. MILLONIG, «Fifth int. Congr. electr. Micr. Philadelphia», 2, 28 (1962).  
 [22] J. H. LUFT, «J. Bioph. Bioch. Cyt.», 9, 409 (1961).  
 [23] H. H. MOLLENHAUER, «Stain Technol.», 39, 111 (1964).  
 [24] E. S. REYNOLDS, «J. Cell Biol.», 17, 208 (1963).

## SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I–III.

TAVOLA I (*D. lugubris*).

- Fig. 1. – Sezione di ovario: alla periferia ovogoni e giovani ovociti con grosso nucleo; al centro alcuni ovociti diplotenici nei quali sono evidenti gli inclusi vitellini (→) prevalentemente distribuiti alla periferia del citoplasma ( $\times 400$ ).  
 Bouin, paraffina, Azan.
- Fig. 2. – Sono evidenti gli inclusi deutoplasmatici negli ovociti di maggiori dimensioni. Un ovocita in degenerazione (→) ( $\times 380$ ).  
 Carnovsky, epon 812, blu di metilene – blu di Toluidina.
- Fig. 3. – Particolare della fig. 1. Ovociti in periodo vitellogenetico con abbondante materiale di riserva (→) ( $\times 800$ ).  
 Bouin, paraffina, Azan.
- Fig. 4. – Ovocita con inclusi deutoplasmatici di forma irregolare ( $\times 1.500$ ).  
 Carnovsky, epon 812, blu di metilene – blu di Toluidina.

TAVOLA II (*D. lugubris*).

Fig. 5. - Numerosi globuli di vitello a contorno irregolare contenuti in vacuoli. Nel globulo in basso a sinistra (y) una piccola porzione non si è ancora fusa con la massa di vitello. Nel citoplasma sono evidenti numerose vescicole isolate contenenti lo stesso materiale dei globuli vitellini ( $\rightarrow$ ) ( $\times 30.000$ ).

Carnovsky, epon - Araldite, Reynolds.

Fig. 6. - Particolare di un globulo maturo con struttura di tipo cristallino. I granuli di circa  $270 \text{ \AA}$  sono intervallati da spazi chiari e ne risulta un periodo di  $340 \text{ \AA}$ . In basso a destra si notano alcune vescicole contenenti granuli destinate a fondersi con il grosso globulo ( $\times 45.000$ ).

Carnovsky, epon-araldite, Reynolds

TAVOLA III (*D. benazzii*).

Fig. 7. - Gruppo di ovociti diplotenici con inclusi deutoplasmatici di rilevanti dimensioni ( $\rightarrow$ ) ( $\times 1.000$ ).

Zenker, paraffina, ematossilina Gomori.

Fig. 8. - Particolare di ovocita con grossi globuli di vitello ( $\times 2.000$ ).

Zenker, paraffina, ematossilina Gomori.

Fig. 9. - Zona periferica di un ovocita all'inizio del periodo vitellogentico. Sono presenti alcuni globuli di piccole dimensioni a contorno regolare ( $\times 32.000$ ).

Carnovsky, epon-araldite, Reynolds.





