
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

VITTORIO GREMIGNI

**Ricerche istochimiche e ultrastrutturali sull'ovogenesi
dei tricladi. II: inclusi citoplasmatici in Planaria
torva, Dendrocoelum lacteum e Polycelis nigra**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 47 (1969), n.5, p. 397-404.*
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1969_8_47_5_397_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. — *Ricerche istochimiche e ultrastrutturali sull'ovogenesi dei tricladi. II: inclusi citoplasmatici in Planaria torva, Dendrocoelum lacteum e Polycelis nigra* (*). Nota di VITTORIO GREMIGNI, presentata (**) dal Corrisp. M. BENAZZI.

SUMMARY. — Ovarian oocytes of the three fresh-water Triclad: *Planaria torva*, *Dendrocoelum lacteum* and *Polycelis nigra* have been studied by means of histochemical and electron microscopical techniques. Prediplotenic oocytes seem alike in all species and their cytoplasm is characterized by a high content of RNA. During diplotene, small bodies (less than 1 μ in diameter) begin to appear mainly at the periphery of the cytoplasm. They look the same in *P. torva* and in *D. lacteum*, whereas they are of a different kind in *P. nigra*. Nature and function of these bodies have been discussed in relation to the problem of yolk and cortical granule presence.

INTRODUZIONE.

In una precedente Nota [1] ho esposto i risultati ottenuti studiando con tecniche di microscopia ottica ed elettronica alcuni aspetti dell'ovogenesi di due specie di planarie di acqua dolce appartenenti al genere *Dugesia*, con particolare riferimento alla presenza ed alla struttura del vitello. I reperti ottenuti mi hanno permesso di confermare l'ipotesi, espressa in un precedente lavoro da Benazzi-Lentati e Gremigni [2], che le uova di queste Planarie sono debolmente lecitiche e non alecitiche come vengono definite nelle più note monografie su questo gruppo di Platelminiti: Bresslau [3], Hyman [4], De Beauchamp [5], ed in tutti i trattati di zoologia. Ho voluto perciò estendere le ricerche ad altri generi di Tricladi, onde chiarire, se la presenza di deutoplasma negli ovociti ovarici sia caratteristica del solo genere *Dugesia*, o se di vitellogenesi (seppur di proporzioni non così vaste come in altri gruppi animali) si può parlare in generale per i Tricladi di acqua dolce; a questo proposito ho scelto *Planaria torva*, *Dendrocoelum lacteum* e *Polycelis nigra*. In letteratura si trova solo per la seconda specie qualche riferimento circa la presenza di inclusi citoplasmatici negli ovociti ovarici. Mattiesen [6] li interpreta come «Dotterkörnchen»; Arnold [7] conferma tale reperto scrivendo che: «in the cytoplasm . . . yolk globules appear, till at last in the late prophase, the whole nucleus is surrounded by numerous yolk globules of various sizes.»; Gelei [8] invece li descrive come «Randkörnchen» e circa il loro significato dà varie interpretazioni; in particolare scrive che: «Weil manche im Ovarium zurückbleiben, ist es möglich, dass sie nur Excretkörnchen sind, welche von der Eizellenausgeworfen worden sein müssen; oder

(*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Zoologia e Anatomia Comparata di Pisa.

(**) Nella seduta del 15 novembre 1969.

es sind gewisse Stoffe, durch deren Abgabe die Eizellen im Ei ihre Anwesenheit und Wirkung auf die Dotterzellen äussern.» Fulinski [9] invece nega l'esistenza in questa specie, così come in *Planaria polichroa*, di materiale deutoplasmatico e non parla neppure di « Randkörnchen ». Successivamente Sembrat [10] ha descritto nella stessa specie gruppi di « marginal granules » che ritiene possano originarsi dai mitocondri, ma di cui peraltro non accerta né la natura né la funzione. Recentemente Achtelik [11] conferma negli ovociti di *D. lacteum* la presenza di strutture che egli definisce « cortical granules » e di cui dice: « they form a few accumulation in the perinuclear region and are clearly distinguishable from the mitochondria by their different size and different staining affinities. They subsequently migrate towards the surface of the cell. When a mature egg-cell, they are found in the cortical layer of the cytoplasm ». Questi granuli, secondo l'autore, a differenza di quelli descritti in molti altri animali, non contengono mucopolisaccaridi, ma: « they were found to be structures containing at least some compound protein, ribonucleic acid and lipids. They can therefore be described as lipo-ribonucleic-proteid symplexes ». Da questi dati Achtelik conclude che: « It can be presumed that also the physiological role of the cortical granules of *Dendrocoelum lacteum* is of a different kind than that of the cortical granules of other species ».

Ho iniziato lo studio dell'ovogenesi delle tre specie citate con le più comuni tecniche istologiche ed istochimiche, ed ho approfondito l'indagine morfologica con tecniche di microscopia elettronica, di cui riferisco i primi dati. In prossimi lavori esporrò per esteso l'aspetto ultrastrutturale della genesi, composizione e funzione degli inclusi citoplasmatici ovocitari.

MATERIALE E TECNICHE.

Come già detto ho usufruito delle specie: *Planaria torva*, *Dendrocoelum lacteum*, *Polycelis nigra*. Tutti gli animali sono stati raccolti nei dintorni di Pisa e scelti in periodo di deposizione per avere la certezza che gli ovari esaminati fossero maturi. Le osservazioni al microscopio ottico sono state eseguite su materiale incluso in paraffina, o in resine epossidiche e sottoposto alle stesse reazioni indicate nella mia Nota precedente [1], alla quale rimando anche per le tecniche di microscopia elettronica (1).

OSSERVAZIONI.

Planaria torva. - I due ovari, situati nella porzione anteriore del corpo in posizione ventrale, misurano nell'animale maturo circa 100-150 μ di diametro; presentano alla periferia gli elementi germinali più giovani e, a mano

(1) Le ricerche di microscopia elettronica sono state iniziate nell'Istituto di Anatomia Patologica dell'Università di Pisa, sotto la guida del prof. V. Marinozzi 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.

a mano che ci si sposta verso la zona centrale, gli ovociti più maturi (Tav. I, fig. 1). Sovente ho osservato nelle vicinanze dell'ovario gruppi più o meno cospicui di ovogoni e di giovani ovociti, per la cui esatta interpretazione sarebbero necessari studi più approfonditi (2). Gli ovogoni, di forma generalmente ellittica, hanno un diametro massimo di $7\ \mu$, nucleo con contorni regolari di quasi $4\ \mu$ e nucleolo piccolo di circa $1\ \mu$, assai basofilo. Il citoplasma è scarso e risulta molto ricco di RNA ribosomale come dimostrano le reazioni con blu di toluidina e pironina abbinate a trattamento con ribonucleasi o con acido perclorico.

Successivamente gli ovociti subiscono un graduale accrescimento fino a raggiungere, all'inizio del diplotene, dimensioni di $14-15\ \mu$; il nucleo diventa sempre più irregolare e lobato e raggiunge $8-9\ \mu$ di diametro, il nucleolo circa $1,5-1,7\ \mu$. Scarse sono negli stadi prediplotenici le modificazioni nella reattività del citoplasma; molto intense risultano le reazioni per l'acido ribonucleico, diffusamente positive quelle generali per le proteine, la P.A.S. e l'alcian blu. Durante il diplotene si notano evidenti modificazioni morfologiche ed istochimiche; l'accrescimento degli ovociti è certamente più vistoso che nel periodo prediplotenico e purtuttavia meno cospicuo che nel genere *Dugesia* descritto nella precedente Nota. Gli ovociti acquistano forma tondeggiante e raggiungono alla fine della profase meiotica, prima di imboccare l'ostio dell'ovidutto, $30-35\ \mu$ con nucleo di $18-20\ \mu$ e nucleolo di circa $3\ \mu$. Interessanti sono le reazioni al blu di toluidina e alla pironina abbinate a trattamenti enzimatici, che dimostrano la permanenza di elevata concentrazione di RNA anche in stadi avanzati della maturazione. Le reazioni generali per le proteine si mantengono diffuse al pari della P.A.S. con la quale si evidenziano anche modesti addensamenti variamente distribuiti nel citoplasma, che scompaiono dopo trattamento con diastasi e sono quindi interpretabili come glicogeno. Molto deboli risultano le reazioni al sudan nero e al sudan III, rare le sferule lipidiche isolate.

Le modificazioni strutturali più importanti riguardano in questo periodo dell'accrescimento la comparsa, prevalentemente nella zona periferica dell'ovocita, di piccoli inclusi sferici che con la progressiva maturazione aumentano considerevolmente di numero distribuendosi talvolta anche in regioni più centrali (Tav. I, figg. 2, 3). Questi inclusi misurano circa $0,75-0,85\ \mu$, si colorano intensamente con blu di toluidina (nel materiale fissato in osmio, mentre nei preparati fissati solo in aldeidi o con i liquidi più comunemente usati per la istologia, risultano negativi) e con ematosilina Gomori. Tra le reazioni istochimiche solamente la argentaffine può considerarsi positiva anche se gli inclusi appaiono colorati in marrone; negativa risulta invece la

(2) Ricordo che in passato alcuni autori hanno descritto simili formazioni che si troverebbero accidentalmente in varie specie di planarie; così Ijima [12] in *Polycelis tenuis* le considera come un secondo paio di ovari rudimentali; Woodworth [13] in *Phagocata gracilis* come « provaria ».

romaffine; molto incerte e di difficile interpretazione sono le reazioni per le proteine, per i polisaccaridi, ed i trattamenti enzimatici.

L'esame al microscopio elettronico dimostra che tali inclusi sono provvisti di membrana e sono formati da una sostanza densa, non granulare, nella quale si trovano costantemente degli anelli chiari di forma più o meno regolare, il cui significato verrà chiarito in una successiva Nota relativa al meccanismo di formazioni di tali inclusi. Il loro aspetto è abbastanza simile a quello degli « op-art bodies » descritti nelle cellule epidermiche di *Astacus fluviatilis* da Steinbrecht [14] (Tav. II, fig. 6).

Dendrocoelum lacteum. - Le differenze che risultano, usando le tecniche di microscopia ottica, tra gli ovociti di questa specie e quelli di *P. torva* sono in linea generale poco rilevanti per cui non mi dilungherò in una descrizione particolareggiata dei successivi stadi dell'ovogenesi. Gli ovogoni e gli ovociti all'inizio della profase meiotica hanno forma ellittica con diametro maggiore di 7-8 μ , nucleo di 5-6 μ , nucleolo di circa 1 μ e scarso citoplasma assai ricco di RNA. Essi occupano generalmente la porzione periferica dell'ovario, inoltre, come in *P. torva*, costituiscono piccoli ammassi in posizione prossima al germigeno. Successivamente gli ovociti subiscono un accrescimento regolare e, all'inizio del diplotene, raggiungono dimensioni di 18-20 μ ; il nucleo acquista un diametro di 12-13 μ , il nucleolo di circa 2 μ . Negli stadi che precedono il diplotene non si notano modificazioni citoplasmatiche importanti e la basofilia permane assai elevata; positive e diffuse risultano la PAS e le reazioni generali per le proteine, molto debole il sudan nero.

Durante il diplotene gli ovociti subiscono un evidente aumento volumetrico, assumono forma tondeggiante, diametro di 45-50 μ e sono distribuiti al centro dell'ovario; il nucleo è di circa 22-25 μ , il nucleolo può raggiungere 4 μ . Interessanti anche in questa specie sono le reazioni con blu di toluidina e pironina abbinate a digestioni enzimatiche, che dimostrano come la concentrazione dell'RNA permanga elevata anche negli stadi terminali della maturazione. La P.A.S. dà una reazione diffusa e mette inoltre in evidenza numerose masse sparse di glicogeno. Pure diffuse sono le reazioni generali per le proteine, deboli quelle per i grassi, scarse le sferule lipidiche isolate.

Durante questo stadio si ha la comparsa nel citoplasma di inclusi simili a quelli descritti in *P. torva*, ma di dimensioni inferiori (0,6-0,7 μ) che pur formando talora dei piccoli ammassi risultano, anche negli ovociti di maggiori dimensioni, assai meno numerosi e localizzati più alla periferia (Tav. I, fig. 4). Scarse sono le indicazioni ottenute dalle reazioni istochimiche che in ogni caso appaiono simili a quelle degli inclusi di *P. torva*, ad eccezione della argentaffine risultata negativa.

Le osservazioni al microscopio elettronico hanno messo in evidenza che gli inclusi presenti in questa specie sono morfologicamente simili a quelli descritti nella specie precedente, ma di dimensioni inferiori (Tav. II, fig. 7).

Polycelis nigra. — Anche in questa specie gli stadi precoci dell'ovogenesi, almeno fino al diplotene, hanno caratteristiche morfologiche e istochimiche simili a quelle delle due specie precedentemente descritte. Gli ovogoni ed i giovani ovociti, distribuiti alla periferia dell'ovario, hanno dimensioni di 6–7 μ e appaiono simili a quelli di *P. torva* e *D. lacteum*. Non ho notato la presenza di ammassi di ovogoni e giovani ovociti in prossimità dei germigeni, come visto saltuariamente nelle due specie precedenti. All'inizio del diplotene gli ovociti raggiungono un diametro di 15–17 μ , con nucleo di circa 10 μ e nucleolo di circa 2 μ . Nel citoplasma la caratteristica principale è la elevata concentrazione di acido ribonucleico. Durante la fase diplotenica gli ovociti più grossi e più maturi occupano il centro dell'ovario e raggiungono circa 40 μ di diametro, hanno un nucleo di circa 20 μ e nucleolo di quasi 4 μ . In questa fase subiscono interessanti modificazioni, prevalentemente a carico del citoplasma che risulta peraltro ancora intensamente basofilo, ma appare anche assai ricco di glicogeno e di sferule lipidiche. Nel citoplasma compaiono piccoli inclusi di circa 0,6–0,7 μ che anche con il procedere della maturazione rimangono prevalentemente localizzati alla periferia (Tav. I, fig. 5).

L'esame ultrastrutturale dimostra che tali inclusi sono diversi da quelli delle due specie precedentemente descritte, cosa che non si era potuta mettere in evidenza con la microscopia ottica. Essi infatti risultano formati al centro da un materiale non granulare denso agli elettroni circondato da un anello di sostanza poco elettrone-densa e da una singola membrana che ha un andamento finemente ondulato; non si notano in questa specie gli anelli chiari presenti negli inclusi di *P. torva* e *D. lacteum* (Tav. III, figg. 8–9).

CONCLUSIONI.

Lo studio comparativo degli ovociti ovarici di *Planaria torva*, *Dendrocoelum lacteum* e *Polycelis nigra* ha messo in evidenza una certa omogeneità nei processi maturativi delle tre specie, ed al tempo stesso alcune differenze nella istochimica e ultrastruttura del citoplasma negli stadi che precedono la prometafase. Gli stadi iniziali della ovogenesi sono caratterizzati nelle tre specie dalla forma ellittica degli ovociti, il cui nucleo sferico occupa quasi tutta la cellula, dal moderato accrescimento volumetrico e dall'elevato contenuto di RNA citoplasmatico. Questi reperti sono assai simili a quelli descritti in una precedente nota negli ovociti di due specie del genere *Dugesia*.

Durante il diplotene gli ovociti subiscono il maggiore accrescimento e si notano nel citoplasma importanti modificazioni morfologiche ed istochimiche. L'aspetto più interessante è costituito dalla comparsa di piccoli inclusi citoplasmatici di cui è stata studiata anche l'ultrastruttura. Essi si corrispondono in *P. torva* e *D. lacteum*, mentre sono morfologicamente diversi in *P. nigra*. Nelle prime due specie hanno dimensioni rispettivamente di circa 0,75–0,85 μ e 0,6–0,7 μ e sono costituiti da un globulo di materiale denso non granulare contenente degli anelli chiari, circondato da una singola

membrana. In *P. nigra* misurano 0,6-0,7 μ , sono costituiti pure da un materiale denso, non granulare, esternamente al quale c'è un alone di sostanza poco elettrone densa circondata da una membrana che ha un andamento finemente ondulato; non vi si notano gli anelli chiari descritti nelle altre due specie.

Le reazioni istochimiche hanno dato solo una indicazione generale sulla loro composizione; essi sono probabilmente formati da complessi proteici o glicoproteici. Incerto rimane il problema della vera natura e funzione di questi tipi di inclusi. Come risulta dall'introduzione, scopo principale di questa ricerca era di chiarire se in ovociti appartenenti a generi diversi di Tricladi fosse presente del materiale deutoplasmatico, e se potessero essere messi in evidenza (per *D. lacteum* confermati) i granuli corticali. Per quanto riguarda *P. torva* e *D. lacteum* è molto probabile che gli inclusi, data la loro quasi perfetta identità morfologica, abbiano anche eguale funzione. I risultati ottenuti circa la loro struttura e composizione chimica non mi sembrano sufficienti per stabilire con sicurezza il loro significato, in quanto anche dagli autori più recenti, inclusi di forma, dimensioni e composizione molto diverse, sono interpretati talvolta come materiale di riserva, talvolta come granuli corticali. La loro distribuzione durante gli stadi terminali della profase meiotica, soprattutto in *P. torva*, farebbe ritenere meno probabile la seconda ipotesi in quanto essi al loro insorgere sono disposti prevalentemente alla periferia del citoplasma, mentre durante la maturazione, in conseguenza del notevole aumento numerico, si portano anche in zone più interne e spesso, in ovociti prossimi alla prometafase (3), costituiscono degli ammassi cospicui che si estendono talvolta perfino in prossimità del nucleo, risultando invece assenti in vaste zone della regione corticale.

Ancora più incerta appare la interpretazione degli inclusi di *P. nigra*, in quanto morfologicamente diversi da quelli delle specie precedenti e più regolarmente distribuiti nella zona corticale.

Ulteriori ricerche (già avviate) di morfologia e di istochimica ultrastrutturale, condotte sulle uova fecondate, potranno fornire un più sicuro contributo per la interpretazione della esatta natura degli inclusi descritti negli ovociti di queste specie.

È infine interessante ricordare una ipotesi cui Sembrat [10] giunge comparando gli inclusi dell'uovo di *D. lacteum* e di *Planaria gonocephala* (= *Dugesia gonocephala*): « the fact that there is yolk found in the oocytes of *Planaria*, and no marginal granules are present, while in *Dendrocoelum* there is a lack of yolk, and the marginal granules appear, may suggest that these two inclusions are, to a certain point, vicarious ones ».

(3) Fase in cui avviene la fecondazione.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] V. GREMIGNI, « Acc. Naz. Lincei » (in corso di stampa).
 [2] G. BENAZZI LENTATI e V. GREMIGNI, « Atti Soc. Tosc. Sci. Nat. », Ser. B, 73, 101 (1966).
 [3] E. BRESSLAU, in « Kükenthal, Handbuch der Zoologie », 2, 52 (1928).
 [4] L. H. HYMAN, « The Invertebrates: Platyhelminthes and Rhynchocoela », 2 (1951).
 [5] P. DE BEAUCHAMP, « Traité de Zoologie », Masson et C. Editeurs. Paris, 4, 35 (1961).
 [6] E. MATTIENSEN, « Zeit. f. wiss. Zool. », 77, 274 (1904).
 [7] G. ARNOLD, « Arch. f. Zellforsch. », 3, 431 (1909).
 [8] J. GELEI, « Arch. f. Zellforsch. », 11, 51 (1913).
 [9] B. FULINSKI, « Bull. Acad. Pol. Sci. et Lettr. Cracovie », Ser. B, 147, (1914).
 [10] K. SEMBRAT, « Bull. Acad. Pol. Sci. et Lettr., Cracovie », Ser. B, 691, (1930).
 [11] W. ACHELNIK, « Zool. Poloniae », 12, 345 (1963).
 [12] I. IJIMA, « Zeit. f. wiss. Zool. », 40, 359 (1884).
 [13] M. WOODWORTH, citato da G. Chichkoff, « Arch. de Biologic », 12, 1 (1892).
 [14] A. STEINBRECHT, in « Electron Microscopy, pre-Congress abstracts fourth Eur. Reg. Conf. », D. Stieve Bocciarelli ed. Roma, 2, 221 (1968).

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-III

TAVOLA I.

- Fig. 1. — *Planaria torva*: sezione frontale della porzione anteriore. Sono visibili i due ovari: la periferia degli ovociti di maggiori dimensioni ha reagito positivamente alla argentaffina (→). (×230). Stieve, paraffina, Masson-Hamperl.
- Fig. 2. — *Planaria torva*: gli inclusi citoplasmatici sono individualmente riconoscibili e costituiscono in alcuni casi degli ammassi che si estendono anche in zone interne dell'ovocita. (→). (×800). Carnovsky, Epon-Araldite, blu di metilene-blu di toluidina.
- Fig. 3. — *Planaria torva*: sezione di un ovocita che presenta un cospicuo ammasso di inclusi granulari. (×1300). Carnovsky, Epon-Araldite, blu di metilene-blu di toluidina.
- Fig. 4. — *Dendrocoelum lacteum*: ovario con giovani ovociti alla periferia (→) e ovociti diplotenici al centro; nel citoplasma periferico di questi si notano piccoli e scarsi inclusi sferici. (×650). Carnovsky, Epon-Araldite, cristal violetto-fucsina basica.
- Fig. 5. — *Polycelis nigra*: sezione di un grosso ovocita diplotenico che mostra alla periferia numerosi inclusi il cui aspetto è simile a quello delle specie precedenti. (×1300). Carnovsky, Epon-Araldite, Blu di metilene-blu di toluidina.

TAVOLA II.

- Fig. 6. — *Planaria torva*: porzione di citoplasma di un ovocita diplotenico con numerosi inclusi sferoidali localizzati anche in zone non periferiche dell'ovocita. Notare la elevata concentrazione di ribosomi. (×21.000). Carnovsky, Epon-Araldite, Reynolds.
- Fig. 7. — *Dendrocoelum lacteum*: porzione di citoplasma di un ovocita diplotenico con numerosi inclusi sferoidali, morfologicamente simili a quelli di *P. torva*, ma di dimensioni inferiori; si noti pure la abbondanza di granuli di glicogeno. (×21.000). Nell'insero la struttura di un incluso a più forte ingrandimento. (×44.000). Carnovsky, Epon-Araldite, Reynolds.

TAVOLA III.

- Fig. 8. – *Polycelis nigra*: sezioni di due ovociti diplotenici nei quali sono evidenti alla periferia inclusi sferici morfologicamente diversi da quelli delle due specie precedenti; sono presenti anche alcune sferule di lipidi, parzialmente estratti, e numerosi granuli di glicogeno. ($\times 9.500$). Carnovsky, Epon-Araldite, Reynolds.
- Fig. 9. – *Polycelis nigra*: Particolare a più forte ingrandimento da cui appare in dettaglio la struttura degli inclusi citoplasmatici. ($\times 42.000$). Carnovsky, Epon-Araldite, Reynolds.





