
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

FULVIO ZAFFAGNINI, MARIA LUISA LUCCHI

**Osservazioni ultrastrutturali sul determinante
germinale dei Dafnidi**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 49 (1970), n.1-2, p.
141-146.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1970_8_49_1-2_141_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. — *Osservazioni ultrastrutturali sul determinante germinale dei Dafnidi* (*). Nota (**) di FULVIO ZAFFAGNINI e MARIA LUISA LUCCHI, presentata dal Corrisp. P. PASQUINI.

SUMMARY. — Origin and fine structure of the germ-cell determinant in summer and winter eggs of *Daphnia pulex* and *D. magna* were studied. The germ-cell determinant appears in the perinuclear cytoplasmic region of the oocyte still undifferentiated from its nurse cells, and then it will migrate to the cortical ooplasm. The completely developed germ-cell determinant consists of a coarse network of fine granular and fibrillar material, which is extruded from the nucleus through the pores of the nuclear envelope. Vesicles of different size, some dense bodies and glycogen particles are enclosed in the meshes of this network.

INTRODUZIONE

La presenza di un determinante germinale nei Cladoceri è stata messa chiaramente in evidenza per la prima volta da Kühn [1] nelle uova subitaneamente di *Polyphemus pediculus*. In tali uova l'Autore ha descritto un corpo speciale, il quale, nel corso della segmentazione, si segrega in una sola cellula. Questa, allo stadio di 16 blastomeri, diviene una cellula germinale pura, nel cui citoplasma il corpo speciale si disgrega. Kühn quindi ha saputo delucidare il meccanismo di segregazione della linea germinale in *Polyphemus* attraverso lo studio del comportamento del determinante germinale, tuttavia non ci ha fornito delle indicazioni valide circa l'origine di quest'ultimo, poiché, secondo l'Autore, il determinante germinale proverrebbe da una cellula nutrice inglobata dall'uovo.

In seguito solo von Dehn [2] ha descritto il determinante germinale in un Cladocero, e precisamente nelle uova durature di *Moina rectirostris*, osservando un comportamento simile a quello messo in luce da Kühn, ma ritenendo che esso derivi dall'ovario senza fornire maggiori precisazioni.

Pertanto ci è sembrato utile riprendere in esame il problema, studiando in particolare gli argomenti lasciati in sospeso dagli altri Autori e cioè l'origine e la struttura del determinante germinale.

(*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Zoologia dell'Università di Bologna, diretto dal prof. Enrico Vannini, con un contributo del C.N.R.

(**) Pervenuta all'Accademia il 9 luglio 1970.

MATERIALE E METODO

Il presente studio è stato effettuato su uova subitane e durature di tre specie di *Daphnia*: *D. magna*, allevata in laboratorio a temperatura ambiente; *D. pulex*, raccolta in una vasca dell'Istituto di Zoologia; *D. middendorffiana*, raccolta nel lago di Campo 4° (alta Val Bognanco) e poi allevata in stanza termostata a 6°-12° C.

Microscopia ottica. Per individuare il determinante germinale, le femmine, sia con uova nell'ovario sia con uova deposte nella camera incubatrice, sono state fissate in Carnoy e incluse in paraffina; le sezioni microtomiche sono state poi colorate con il verde di metile-pironina a pH tamponato.

Per seguire il comportamento del determinante germinale durante la segmentazione delle uova è stata usata la tecnica dell'osservazione in toto, previa colorazione con orceina acetica.

Microscopia elettronica. Per analizzare l'origine e l'ultrastruttura del determinante germinale, le femmine, in stadi ovogenetici corrispondenti a quelli utilizzati per la microscopia ottica, sono state fissate in toto in OsO₄ all'1 % in tampone veronal acetato a pH 7,4 o in tampone di Millonig, disidratate negli alcoli ascendenti e incluse in metacrilati di metile e butile nella proporzione di 9:1 o in Araldite. Per aumentare il contrasto delle sezioni si è fatta una impregnazione durante la disidratazione con acetato di uranile e una colorazione con sali di piombo secondo le tecniche di Millonig e di Karnowsky. Le sezioni ottenute con ultramicrotomo LKB sono state osservate coi microscopi elettronici Siemens Elmiskop I e Hitachi HS-7S⁽¹⁾.

Allo scopo di localizzare l'ovario e di scegliere la porzione da osservare col microscopio elettronico, dalle femmine incluse in toto venivano tagliate delle sezioni semifini di 1 μ di spessore, che, colorate con il bleu di toluidina, erano osservate col microscopio ottico. Analogamente si è proceduto per la ricerca del determinante germinale nelle uova deposte nella camera incubatrice, alcune sezioni delle quali sono state colorate anche con il PAS per la messa in evidenza del glicogeno.

OSSERVAZIONI

a) *Osservazioni citologiche.*

Nell'ovocita in accrescimento il determinante germinale è difficilmente visibile con le tecniche impiegate. Esso invece si evidenzia bene nell'uovo deposto e particolarmente nell'uovo duraturo (fig. 1).

(1) Le preparazioni del materiale e le osservazioni sono state eseguite presso il Centro di Microscopia Elettronica dell'Università di Bologna. Per questa indagine sono state utilizzate solo *Daphnia pulex* e *D. magna*.

L'aspetto e la posizione dell'organite ci permettono di poter concludere che esso corrisponde alla «Copulationszelle» descritta da Weismann e Ischikawa [3] nelle uova durature di varie specie di Cladoceri e al corpo sconosciuto osservato da Allen e Banta [4] nelle uova durature di *Moina macrocopa*. Esso passa indiviso e apparentemente senza modificazioni nel citoplasma di uno dei primi 16 blastomeri (fig. 2), nel quale evidentemente si disgrega, poiché allo stadio di 32 blastomeri non è più visibile. Il blastomero che ha ricevuto tale organite darà origine alle cellule germinali primordiali [1, 2].

La colorazione col verde di metile-pironina a pH tamponato mostra che il determinante germinale è costituito da un trabecolato di materiale discretamente pironinofilo (fig. 3). Questa pironinofilia scompare dopo trattamento con ribonucleasi e pertanto essa è ascrivibile alla presenza di RNA. La colorazione con il PAS di sezioni semifini di materiale incluso in Araldite mostra che il d.g. possiede una debole PAS-positività.

b) *Osservazioni ultrastrutturali.*

L'ovogenesi di *Daphnia* è caratterizzata dalla formazione di quattro cellule germinali unite da ponti intercellulari. Questo fatto, dapprima osservato nella formazione delle uova subitanee [5], è stato riscontrato anche nella formazione delle uova durature [6]. Delle quattro cellule del gruppo, una sola diventa l'ovocita definitivo, mentre le altre tre, indicate generalmente come cellule nutrici, non giungono alla formazione del tuorlo e vengono alla fine riassorbite.

Nel citoplasma di una delle quattro cellule del gruppo, quella che diventerà l'ovocita definitivo, compare molto precocemente in vicinanza del nucleo una sorta di reticolato formato da materiale denso in cui si trovano immerse microvescicole a contenuto variamente opaco agli elettroni e talvolta corpi multilamellari (fig. 4). Questa formazione, che spesso è attornata da mitocondri ed è facilmente distinguibile dal restante citoplasma a morfologia ribosomale, presenta una evoluzione nel corso dell'accrescimento ovocitario dimostrandosi essere il precursore del determinante germinale (figg. 5, 6).

Una caratteristica di tale determinante, comune anche a quello di altri animali [7, 8], è quella di essere privo di membrana limitante. Nell'uovo alla fine dell'accrescimento il determinante germinale appare ovoidale (fig. 7) e si presenta in posizione subperiferica, così da far pensare che esso si sia spostato attraverso l'ooplasma. In tale organite si trovano ora, oltre alle piccole vescicole a contenuto variamente denso, dei grossi vacuoli chiari, rari corpi densi e numerosi granuli di glicogeno. Inoltre questi elementi sono contenuti in aree attorniate dal materiale denso, che forma un sistema di lamelle ramificate e anastomizzate fra di loro attraverso tutto il determinante germinale (figg. 7, 8). A forte ingrandimento il materiale denso appare costituito da fini granuli e sottili filamenti (fig. 9).

L'organite qui descritto si trova, con una ultrastruttura molto simile, sia nelle uova subitanee che in quelle durature. Nelle uova durature, però, è meglio visibile, perché più nettamente delimitato dal restante citoplasma. Esso a completo sviluppo raggiunge notevoli dimensioni: circa $11 \times 9 \mu$ nelle uova durature di *Daphnia pulex* e $25 \times 18 \mu$ in quelle di *D. middendorffiana*.

DISCUSSIONE

Nelle uova di un Chetognato, *Spadella cephaloptera*, è stato osservato un determinante germinale, la cui ultrastruttura si avvicina molto a quella riscontrata in *Daphnia* [8].

Anche in *Artemia salina* è stato osservato una sorta di determinante germinale che passa indiviso in una delle iniziali germinali [9], ma esso si presenta un po' diverso poiché è costituito da un ammasso di corpi multivescicolari, corpi densi, microvescicole e ribosomi. Inoltre esso, contrariamente a quanto accade in *Daphnia*, esplica un ruolo importante nella formazione del tuorlo, comportandosi quindi da nucleo vitellino [7]. Circa l'origine di tale organite, gli Autori lasciano pensare che esso sia una struttura persistente, la quale, pur nelle modificazioni ultrastrutturali connesse con la sua attività e con le caratteristiche della cellula in cui si trova, si trasmette direttamente dall'uovo di un individuo agli ovociti della generazione successiva.

La colorazione col verde di metile-pironina ha dimostrato che nell'uovo maturo di *Daphnia* il determinante germinale contiene RNA: tuttavia le immagini al microscopio elettronico sottolineano in esso la mancanza di ribosomi. Si deve quindi ritenere che responsabile della sua pironinofilia sia il materiale denso frammisto alla componente membranosa. In effetti il materiale pironinofilo ha una disposizione a trabecole riconducibile a quella del materiale denso, osservato al microscopio elettronico (figg. 3, 7). Questo materiale, che a forte ingrandimento appare granulo-filamentoso, presenta una morfologia simile a quella del materiale descritto a livello dei pori dell'involucro nucleare in ovociti di altre specie animali [10, 11] e a quella del materiale che si trova nel citoplasma aggregato a formare delle masse perinucleari basofile descritte col nome di « nuages » negli ovociti di *Tegenaria domestica* [12] e poi osservate in numerosi altri ovociti [10, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19]. Esse sono ritenute l'espressione di un trasferimento dal nucleo al citoplasma, attraverso i pori della membrana nucleare, di materiale contenente RNA in forma non ribosomale.

Anche nei giovani ovociti di *Daphnia* sono osservabili un passaggio di materiale dal nucleo al citoplasma e la presenza di aggregati citoplasmatici perinucleari (figg. 4, 5). Pertanto in base alla stretta relazione topografica che la comparsa del determinante germinale ha con il nucleo e alle analogie ultrastrutturali e istochimiche che la sua componente densa ha con il materiale di origine nucleare riunito in aggregati citoplasmatici o « nuages », si

può ritenere che in *Daphnia* il determinante germinale si formi per interazione di materiale nucleare e citoplasmatico. Ora, siccome tale organite si trova solo nell'ovocita e manca nelle cellule nutrici dove pure avviene un passaggio di materiale dal nucleo al citoplasma [20], si potrebbe dedurre che in queste ultime non si attui il meccanismo di interazione nucleo-citoplasmatica.

Circa il significato funzionale del materiale granulo-filamentoso che passa attraverso i pori della membrana nucleare e si aggrega nel citoplasma a formare le « nuages », si è pensato che esso possa rappresentare un materiale di informazione per le successive sintesi dell'ovocita [10, 16, 17]. Pertanto, per quel che riguarda gli ovociti di *Daphnia* è interessante notare che la presenza nel determinante germinale di questa forma di materiale ribonucleico apre il problema del controllo nucleare sulla determinazione delle cellule germinali.

BIBLIOGRAFIA

- [1] A. KÜHN, « Zool. Jahrb., Abt. Anat. », 35, 243 (1913).
- [2] M. VON DEHN, « Chromosoma », 3, 167 (1948).
- [3] A. WEISMANN e C. ISCHIKAWA, « Zool. Jahrb., Abt. Anat. », 4, 155 (1891).
- [4] E. ALLEN e A. M. BANTA, « J. Morph. », 48, 123 (1929).
- [5] F. ZAFFAGNINI e M. L. LUCCHI, « Arch. Zool. Ital. », 50, 49 (1965).
- [6] F. ZAFFAGNINI e M. L. LUCCHI (non pubblicato).
- [7] A. ANTEUNIS, N. FAUTREZ-FIRLEFYN, J. FAUTREZ e A. LAGASSE, « Exper. Cell Research », 35, 239 (1964).
- [8] E. GHIRARDELLI, « Arch. Zool. Ital. », 51, 841 (1966).
- [9] J. FAUTREZ e N. FAUTREZ-FIRLEFYN, « Develop. Biol. », 9, 81 (1964).
- [10] R. G. KESSEL e H. W. BEAMS, « J. Cell Biol. », 39, 735 (1968).
- [11] R. G. KESSEL, « Z. Zellforsch. », 94, 441 (1969).
- [12] J. ANDRÉ e C. ROUILER, « Proc. Stockholm Conf. Electron Microscopy », F. Sjöstrand e J. Rhodin Ed., Academic Press Inc. New York, 162 (1957).
- [13] J.-P. ZAHND e A. PORTE, « C. R. Acad. Sci. Paris », 262, 1977 (1966).
- [14] R. G. KESSEL, « J. Ultrastructure Research », 15, 181 (1966).
- [15] W. H. MASSOVER, « J. Ultrastructure Research », 22, 159 (1968).
- [16] R. G. KESSEL e H. W. BEAMS, « J. Cell Biol. », 42, 185 (1969).
- [17] R. G. KESSEL, « J. Ultrastructure Research », 28, 61 (1969).
- [18] B. SCHARRER e S. WURZELMANN, « Z. Zellforsch. », 96, 325 (1969).
- [19] A. DHAINAUT, « J. Microscopie », 9, 99 (1970).
- [20] F. ZAFFAGNINI e M. L. LUCCHI (in preparazione).

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-IV

TAVOLA I.

- Fig. 1. - Uovo duraturo di *Daphnia middendorffiana* all'inizio della segmentazione: in alto a sinistra è visibile il primo fuso di segmentazione e in basso a destra il determinante germinale. Colorazione in toto con orceina-acetica. 120×.
- Fig. 2. - Uovo duraturo di *Daphnia middendorffiana* allo stadio di 16 blastomeri, uno dei quali contiene il determinante germinale. Colorazione in toto con orceina-acetica. 300×.

- Fig. 3. - Sezione di uovo duraturo di *Daphnia middendorffiana* a livello del determinante germinale: a destra è visibile il margine ovocitario. Verde di metile-pironina a pH 7. 1.200×.
- Fig. 4. - Inizio della formazione del determinante germinale in prossimità del nucleo di un giovanissimo ovocita subitaneo di *Daphnia pulex*, sotto forma di travate di materiale denso frammisto a microvescicole (*mv*). In alcuni punti della membrana nucleare è possibile osservare un passaggio di materiale dal nucleo al citoplasma (frecce). *ag*, aggregati di materiale granulo-filamentoso (nuages) di origine nucleare; *cm*, corpi multilamellari; *m*, mitocondri; *N*, nucleo; *pn*, pori della membrana nucleare. OsO₄-Araldite. 30.000×.

TAVOLA II.

- Fig. 5. - Determinante germinale in un giovane ovocita subitaneo di *Daphnia magna*: nella fitta rete di materiale denso si notano numerose microvescicole (*mv*) e corpi multilamellari (*cm*). *ag*, aggregati citoplasmatici (nuages), alcuni dei quali appaiono in rapporto con la membrana nucleare (freccia); *m*, mitocondri; *N*, nucleo. OsO₄-Metacrilati. 16.000×.

TAVOLA III.

- Fig. 6. - Determinante germinale in ovocita subitaneo di *Daphnia magna* prima della vitellogenesi. Il d.g., ancora in prossimità del nucleo, è ora nettamente distinguibile dal citoplasma circostante. *N*, nucleo; *Nu*, nucleolo. OsO₄-Metacrilati. 12.000×.
- Fig. 7. - Determinante germinale in un ovocita duraturo di *Daphnia pulex* appena depresso: è chiaramente visibile la disposizione a trabecole del materiale denso. OsO₄-Araldite. 12.750×.

TAVOLA IV.

- Fig. 8. - Particolare di determinante germinale nell'uovo duraturo di *Daphnia pulex*. *cd*, corpi densi; *mv*, microvescicole; *v*, vacuoli. OsO₄-Araldite. 18.150×.
- Fig. 9. - Particolare della fig. 8: notare l'aspetto granulo-filamentoso del materiale denso. *g*, glicogeno; *v*, vacuolo. OsO₄-Araldite. 49.125×.







