
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

ABELE SAITA, MARIANGELA COMAZZI, ENRICO
PERROTTA

**Ulteriori osservazioni al M.E. sulla spermiogenesi di
un serpente: *Coluber viridiflavus* (Lacèpède) in
riferimento ad elementi comparativi nella
spermiogenesi dei rettili**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 82 (1988), n.1, p. 137–143.*
Accademia Nazionale dei Lincei

http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1988_8_82_1_137_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/>

Istologia. — *Ulteriori osservazioni al M.E. sulla spermiogenesi di un serpente: Coluber viridiflavus (Lacépède) in riferimento ad elementi comparativi nella spermiogenesi dei rettili (*)*. Nota (**) di ABELE SAITA, MARIANGELA COMAZZI e ENRICO PERROTTA, presentata dal Socio S. RANZI.

ABSTRACT. — *Further observation at the E.M. on the spermiogenesis of a snake: Coluber viridiflavus (Lacépède) related to comparative reptilian spermatology.* To extend the knowledge on reptilian spermatozoa and their development some aspects of the spermiogenesis in *Coluber viridiflavus* have been studied by Electron Microscopy; aspects not reported in other Snakes, were recently observed in our works on Iguanidae end in a crocodile. The various stages of the formation of the perforatorium are described. It is evident that the "actomere", present in the young spermatid, represents the origin of the perforatorium. During the nuclear elongation and chromatin condensation two "manchettes" of microtubules were observed. They can be considered as the "circular" and "longitudinal manchette" already observed in the spermiogenesis of Birds. Some attention has been devoted to explain the peculiar relationship between the developing spermatid and the Sertoli cell, because it may be a general feature of the reptilian spermiogenesis.

KEY WORDS: Reptile; Spermiogenesis; Sertoli cell.

RIASSUNTO. — Nell'ambito degli studi che permettano una revisione della spermatologia dei Rettili, riferiamo alcuni aspetti ultrastrutturali della spermiogenesi di *Coluber viridiflavus*, non descritti in precedenti ricerche sui Serpenti, ma da noi già osservati in un iguana ed in un cocodrillo. Tra le varie strutture che compongono il complesso acrosomale è stata messa in evidenza, nel giovane spermatide, la presenza dell'actomero, che durante l'ulteriore differenziamento da origine ad un vero e proprio perforatorio bastoncellare. Durante l'allungamento del nucleo e la condensazione della cromatina sono state descritte due « manchette » di microtubuli una simile alla « manchette circolare » e successivamente un'altra « manchette longitudinale » come quelle osservate durante la spermiogenesi di altri animali (Uccelli, ecc.). In questo lavoro riferiamo anche la particolare disposizione della cellula del Sertoli attorno all'apice dello spermatide.

(*) Lavoro eseguito nel Dipartimento di Fisiologia e Biochimica Generali Sezione di Istologia ed Anatomia Umana dell'Università degli Studi di Milano e nel Laboratorio di Zoologia dell'Università della Calabria, con i contributi (quota 60%) del Ministero della Pubblica Istruzione.

(**) Pervenuta all'Accademia il 30 settembre 1987.

MATERIALE E METODI

Piccoli pezzi di testicoli di *Coluber viridiflavus* (Lacépède) sono stati fissati con gluteraldeide 3% in tampone fosfato 0,1 M a pH 7,2 e postfissati con tetrossido di osmio all'1% in tampone fosfato. Dopo disidratazione e precolazione in acetato di uranile, i campioni sono stati inclusi in Epon-Araldite. Sezioni sottili sono state ottenute con gli ultramicrotomi L.K.B. Ultratom III e Reichert Om U3; dopo colorazione con citrato di piombo, sono state osservate ai M.E. Hitachi HU-12A e Jeol T8.

INTRODUZIONE

Nel nostro laboratorio stiamo riesaminando al Microscopio Elettronico la spermiogenesi in alcuni Rettili in quanto i dati ottenuti alcuni anni fa risultano ancora insufficienti per un'analisi comparativa nei diversi gruppi.

In particolare in recenti studi da noi condotti sulla spermiogenesi di *Caiman crocodylus* L. e di *Iguana delicatissima* Laurent si sono osservati alcuni elementi ultrastrutturali che non venivano esaminati o descritti nelle ricerche condotte precedentemente. Ad esempio, i vari elementi strutturali posti tra acrosoma e nucleo (spazio sub-acrosomale, perforatorio, materiale subacrosomale, etc.) non sempre erano descritti, anche la presenza o assenza di gruppi di microtubuli perinucleari durante le trasformazioni del nucleo nella spermiogenesi veniva talvolta trascurata o segnalata senza attento esame del loro assetto.

A nostro parere tali elementi sono invece interessanti per un esame comparativo della spermiogenesi non solo tra i vari Ordini di Rettili ma per un confronto degli stessi particolari ultrastrutturali che si osservano nella spermiogenesi degli Uccelli.

In questo lavoro riferiamo anche la particolare disposizione della cellula del Sertoli attorno all'apice dello spermatide. Non ci soffermiamo invece sulla ultrastruttura del collo e della coda dello spermio perché i dati ottenuti corrispondono a quanto già noto dalla bibliografia sulla spermiogenesi di altri serpenti.

OSSERVAZIONI

Nel giovane spermatide (Tav. I, fig. 1 e 2) gli aspetti dello stadio iniziale del differenziamento sono generalmente identici a quanto si osserva in tutti i casi di spermiogenesi di «spermi modificati» finora osservati.

La Tav. I, fig. 1 mostra un giovane spermatide, ancora con nucleo tondo, dove è iniziata la formazione della coda e dalla parte diametralmente opposta si è collocata la vescicola acrosomale: l'una e l'altra aderenti ad una zona dove

la membrana nucleare si introflette. Già a questo stadio si può vedere, tra vescicola acrosomale e nucleo (Tav. I, fig. 2), la struttura che dà origine al perforatorio. Viene detta « actomero » (Tilney L.G., 1978) ed è visibile solo in sezioni poste esattamente su un piano sagittale passante per il centro. Probabilmente per questo motivo non è stata rilevata in altre ricerche.

Subito dopo ha inizio la condensazione della cromatina che si accompagna al primo allungamento del nucleo (Tav. I, figg. 3 e 4). La cromatina si presenta in lunghi filamenti opachi agli elettroni di circa 200 Å di diametro (Tav. I, fig. 3). Attorno al nucleo, nel citoplasma si notano dei gruppi di microtubuli. Essi corrispondono alla « manchette » di tipo elicoidale, già osservata in altri spermatici, perché compaiono in sezione quasi trasversale quando il piano della sezione colpisce il nucleo lungo il suo asse maggiore (Tav. I, fig. 4). Indichiamo questi microtubuli come elementi di una « manchette primaria » (mI) poiché, successivamente, compaiono altri fasci di microtubuli orientati longitudinalmente a formare una « manchette longitudinale » (m II), secondaria.

La « manchette elicoidale » o primaria persiste fino a quando la cromatina è sotto forma di filamenti, quando invece il nucleoplasma va scomparendo ed i filamenti cromatinici si addensano, si può osservare che attorno al nucleo c'è solo la « manchette longitudinale » (Tav. II, figg. 5 e 6). Questa manchette è costituita da numerosi microtubuli che, in sezione trasversale (Tav. II, fig. 6), appaiono in file concentriche attorno al nucleo. Questi gruppi o fasci di microtubuli li vedremo in seguito estendersi nei lembi citoplasmatici che anteriormente sopravanzano la zona dell'apparato acrosomale (Tav. III, figg. 10 e 11) e posteriormente sopravanzano la zona del collo (Tav. IV, fig. 13).

Con l'allungamento del nucleo avviene anche l'emergenza dell'apparato acrosomale cioè dell'acrosoma e delle strutture sottostanti. Nella Tav. III, figg. 9, 10 e 11, si possono vedere i vari elementi dell'apparato acrosomale verso lo stadio finale della spermiogenesi, sia in sezione longitudinale che trasversale. La parte apicale del nucleo forma un cono appuntito circondato dal materiale subacrosomale che è finemente granuloso, a questo segue il cosiddetto spazio subacrosomale. Sopra l'apice del nucleo, sempre circondato dallo stesso materiale granuloso, si trova uno stretto canale nel quale si inserisce la base del perforatorio. Questo ha l'aspetto di un sottile bastoncino che si prolunga fin sotto l'acrosoma al centro della sua membrana posteriore. L'acrosoma ha la consueta forma a cappuccio. È lungo ca. 4 μ . Il diametro della vescicola acrosomale è di ca. 0,4 μ e comincia ad assottigliarsi a livello del materiale granuloso.

Mentre il complesso acrosomale, ora descritto, si sviluppa emergendo dallo spermatiche anteriormente, esso forma un contatto particolare con la cellula del Sertoli che circonda gli spermatici in allungamento. Questo contatto prende il nome di cappuccio sertoliano o cappuccio accessorio nell'unico lavoro in cui è stato ben descritto precedentemente (Del Conte, 1976). In questa ricerca si è cercato di analizzare, con una certa attenzione, lo sviluppo di questa struttura. Nelle sezioni di spermatiche in allungamento, al termine della condensazione della cromatina, è già presente uno strato di citoplasma del Sertoli che av-

volge il complesso acrosomale dello spermatide e costituisce un cappuccio sertoliano aderente al complesso acrosomale (Tav. II, figg. 5, 7 e 8). Se si osserva attentamente, si vede che si tratta di un piccolo lembo citoplasmatico che va ad inserirsi tra il complesso acrosomale delle porzioni di citoplasma dello spermatide che si prolungano anteriormente, oltre il livello dell'acrosoma (Tav. II, figg. 7 e 8). Il citoplasma dello spermatide è riconoscibile dalla presenza dei microtubuli della «manchette longitudinale». Quando si ottengono delle sezioni trasversali del complesso acrosomale si distinguono attorno all'acrosoma: un avvolgimento di citoplasma sertoliano (il cappuccio accessorio), poi un avvolgimento di citoplasma che corrisponde alla proiezione anteriore dello spermatide (riconoscibile dai microtubuli della «manchette longitudinale», quelli che più in basso si trovano intorno al nucleo) ed infine il citoplasma della cellula del Sertoli (Tav. III, figg. 10 e 11). Solo all'ultimo stadio dell'allungamento e differenziamento, la «manchette longitudinale» scompare, le proiezioni anteriori del citoplasma si riducono ed attorno al nucleo si allineano numerosi corpi grassi.

L'altro aspetto osservato riguarda la proiezione di citoplasma dello spermatide che si prolunga oltre la zona basale del nucleo. A livello della base del nucleo le strutture riconoscibili, centriolo prossimale, centriolo distale, cilindro del collo, etc. corrispondono a quanto è già noto dalla letteratura. Va piuttosto osservato che nello stadio di allungamento la «manchette longitudinale» si allunga nei lembi citoplasmatici attorno al tunnel flagellare. In questo tunnel si trova il flagello, che ha l'aspetto tipico della parte principale della coda (Tav. IV, fig. 13). L'addensamento di materiale sulla membrana dove inizia il tunnel flagellare, sembra corrispondere all'annulus. Solo successivamente questi lembi si riducono, scompare la manchette, ed arrivano i mitocondri piccoli ed allungati, che entrano nella coda, come già descritto in altri serpenti. Nella Tav. IV, fig. 15 si vede che l'annulus risulta spostato in basso nella coda a segnare il limite tra pezzo intermedio e pezzo principale.

CONCLUSIONI

Questo studio ha permesso di meglio chiarire le tappe differenziate dello spermio in collegamento ai vari elementi strutturali. La prima tappa del giovane spermatide non presenta novità rispetto a quanto già risaputo, ma si è posta in evidenza la formazione e la posizione dell'actomero (Tilney, 1978), non precedentemente indicato in altri serpenti. L'actomero era segnalato solo nei Teeidi (Del Conte, 1976). Con l'actomero si è quindi messo in evidenza che esiste nei serpenti un vero e proprio perforatorio, la cui posizione e struttura definitivamente appare al termine della maturazione.

Neila seconda tappa si è visto che avviene la condensazione della cromatina in filamenti. Contemporaneamente il nucleo si allunga ed i filamenti cromatinici si dispongono lungo l'asse maggiore del nucleo. In questa tappa è presente

una « manchette » di microtubuli del tipo circolare o primaria. La presenza di questo tipo di « manchette » nei rettili sinora era stata descritta solo negli Iguanidi (Furieri, 1974). Solo recentemente, è stata da noi messa in evidenza anche nei coccodrilli (Saita *et al.*, in press) ed ora nei Serpentes.

Questa seconda tappa si distingue dalla tappa successiva caratterizzata dal nucleo completamente condensato, circondato dalla « manchette longitudinale » dei microtubuli. In questa tappa emerge cranialmente il complesso delle strutture acrosomali e dalla parte opposta emerge il flagello con guaina fibrosa. Il nostro studio ha preso in esame anche i rapporti che si stabiliscono cranialmente con la cellula del Sertoli, chiarendo che avviene esattamente un inserimento a doppio incastro tra l'apice dello spermatozoo e la Sertoli. In questo modo la Sertoli avvolge con un particolare cappuccio la zona del complesso acrosomiale, questo cappuccio è avvolto dai lembi o protrusioni dello spermatozoo che a loro volta risultano inseriti ed avvolti dal resto della Sertoli. Situazione questa già descritta con lievi inesattezze nelle Tartarughe (Yasuzumi *et al.*, 1971) con maggior esattezza nei Teeidi (Del Conte, 1976) e da noi in questo serpente ed in una iguana (Saita *et al.*, in preparazione).

L'ultima tappa di maturazione presenta la posizione e la struttura definitiva del perforatorio. Purtroppo i vecchi lavori non ne avevano trattato con esattezza, ora invece risulta bene da queste osservazioni, come anche dai lavori sui coccodrilli (Saita *et al.*, in press), su Teeidi (Del Conte, 1976) ed Iguanidi (Saita *et al.*, in preparazione).

Poiché alla scomparsa della « manchette longitudinale » inizia l'ultima o quarta tappa del differenziamento, con i corpi grassi attorno al nucleo e la discesa dei mitocondri intorno alla guaina fibrosa, abbiamo potuto osservare lo spostamento dell'annulus nella coda e quindi possiamo pensare che nei Lacerilia sia correlata a questo fenomeno la maggiore o minore inserzione della guaina fibrosa nel pezzo intermedio della coda.

LAVORI CITATI

- DEL CONTE E. (1976) - « Cell. Tiss. Res. », 171, 483-498.
FURIERI P. (1974) - « Riv. Biol. », 67, 233-300.
SAITA A., COMAZZI M. e PERROTTA E. (1987) - « Bool. Zool. », in press.
TILNEY L.G. (1978) - « J. Cell Biol. », 77, 551-564.
YASUZUMI G., YASUDA M. e SHIRAI T. (1971) - « Monitore Zool. Ital. », 5, 117-132.

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-IV

TAVOLA I

Fig. 1. - Fasi iniziali della formazione dell'acrosoma e del flagello in un giovane spermatide.

vp = vescicola proacrosomale;

cd = centriolo distale;

↗ = granulo proacrosomale

(× 9.600).

Fig. 2. - Sezione sagittale centrale della vescicola acrosomale contenente il granulo proacrosomale (gp). Al centro dello spazio subacrosomale è presente l'actomero (↗).

(× 24.000).

Fig. 3. - Sezione longitudinale di uno spermatide all'inizio dell'allungamento. La cromatina condensa in filamenti paralleli all'asse maggiore del nucleo.

(× 27.000).

Fig. 4. - Particolare della figura precedente a maggiore ingrandimento, per mostrare nel citoplasma perinucleare i microtubuli (↗) della «manchette elicoidale» (mI).

(× 35.000).

TAVOLA II

Figg. 5 e 6. - Sezioni longitudinale e trasversale, a livello del nucleo, di spermatidi in avanzata fase di condensazione della cromatina. Nel citoplasma perinucleare sono presenti i microtubuli (↗) della «manchette longitudinale» (m II).

(× 12.000; × 45.000; × 9.000).

Figg. 7 e 8. - Sezioni longitudinale e trasversale a livello della testa dello spermatide in allungamento, per mostrare i rapporti con la cellula del Sertoli. Si noti il lembo citoplasmatico che va ad inserirsi tra il complesso acrosomale e le porzioni di citoplasma dello spermatide che si prolungano anteriormente oltre il livello dell'acrosoma.

a = acrosoma;

sp = spermatide;

cs = cappuccio sertoliano;

(× 9.000; × 36.000).

TAVOLA III

Fig. 9. - Sezione longitudinale, comprendente il complesso acrosomale, in uno spermio in avanzata fase di maturazione. Al disopra dell'apice del nucleo, circondato dal materiale subacrosomale (ms), si nota uno stretto canale nel quale si inserisce la base del perforatorio (↗).

a = acrosoma;

* = spazio subacrosomale;

(× 42.000).

Fig. 10, 11, 12. - Sezioni trasversali a vari livelli della testa dello spermio: Fig. 10 appena al disopra dell'apice del nucleo; fig. 11 a livello dell'apice del nucleo; fig. 12 a livello del nucleo.

a = acrosoma;

N = Nucleo;

cs = cappuccio sertoliano;

sp = spermatide;

↗ = microtubuli della manchette longitudinale;

cg = corpi grassi;

(× 45.000; × 45.000; × 14.000).

TAVOLA IV

Fig. 13 e 14. - Sezioni longitudinali che comprendono la zona basale del nucleo ed il pezzo intermedio della coda in formazione. La «manchette longitudinale» (m II), in un primo tempo (fig. 13) si dispone anche nei lembi citoplasmatici attorno al tunnel flagellare (*), successivamente scompare (fig. 14); i lembi citoplasmatici si riducono ed i mitocondri, piccoli ed allungati, scendono a disporsi attorno alla guaina fibrosa (gf) che è presente anche a livello del pezzo intermedio della coda.

↗ = annulus;

(× 22.500; × 12.000).

Fig. 15. - Sezioni longitudinali e trasversali a livello del pezzo intermedio e del pezzo principale della coda.

↗ = annulus;

(× 16.800).







