

ULTRASTRUCTURA DE LA COBERTA DELS OÒCITS DE TEREBRATULA VITREA (BRACHIOPODA: TESTICARDINA) *

M. G. Bozzo, ** R. Bargalló, *** M. Durfort, ** R. Fontarnau ***
i J. López-Camps ***

Rebut: juliol 1981

SUMMARY

Ultrastructure of the oocyte covering of *Terebratula vitrea* (Brachiopoda: Testicardina)

The ovarian oocytes of *T. vitrea* are characterized by the presence of conspicuous follicular cells on their surface, arranged like lunes. Under these cells a layer showing numerous microvilli, corresponding to the vitelline membrane, can be seen. This membrane is not uniform but presents regular depressions resembling a buttoned pattern. In the more mature gametes these depressions give rise to pores allowing the cell to come into contact with the external environment through a covering which thickens considerably during the last ovogenetic transformations.

INTRODUCCIÓ

En aquest treball es presenten noves dades sobre l'organització dels gàmetes femenins de *Terebratula vitrea* Gmelin (braquiòpode testicardí). Si bé s'està fent un estudi complet de la gametogènesi considerant cadascun dels òrgans cel·lulars, aquí ens referim exclusivament a la morfologia que mostra la coberta de l'òcit mitjançant la microscòpia electrònica, tant la de transmissió com la d'escombratge (*scanning*). En efecte, la seva característica organització mereix que s'hi dediqui un treball específic.

Els estudis sobre el tema han estat escadussers des de l'any 1802, en què Cuvier va establir el terme Braquiòpodes. SCHAEFER (1927) descriu l'organització dels oòcits del gènere *Lingula* (ordre Ecardins); l'any següent, PRENANT (1928) va portar a terme un estudi histològic de l'espècie *Terebratulina caput-serpentis*, on fa referència a les inclusions presents en el citoplasma de les cèl·lules en qüestió. PERCIVAL (1944) descriu les cèl·lules fol·liculars que envolten els oòcits de *Terebratella inconspicua*, i també dóna dades de grandària i forma dels oòcits en els diferents estadis de maduració. DE HARO (1962, 1963) féu un es-

* Treball patrocinat per la «Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica» de la Secretaría de Estado de Universidades e Investigación.

** Departament de Morfologia Microscòpica. Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona, Avda. Diagonal, 645. Barcelona, 28.

*** Centre de Microscòpia Electrònica. Universitat de Barcelona. Gran Via de les Corts Catalanes, 585. Barcelona, 7.

tudi general sobre l'anatomia de diversos braquiòpodes en el qual consten dades de l'aparell reproductor i dels gàmetes.

Quant a la descripció de les cèl·lules femenines dels Braquiòpodes emprant el microscopi electrònic, tenim coneixement tan sols del treball de SAWADA (1973); en una nota breu, aquest autor descriu detalls ultraestructurals en el procés d'oogènesi de *Lingula unguis* (Ecardins). No ens consta, doncs, l'existència de cap treball sobre oòcits de Testicardins on s'utilitzi aquesta tècnica.

MATERIAL I MÈTODES

Els exemplars estudiats de *Terebratula vitrea* foren capturats a les proximitats de l'illa de Cabrera, a profunditats compreses entre 100 i 150 braces.

Per microscòpia electrònica de transmissió, les mostres s'han fixat amb paraformaldèhid-glutaraldèhid al 2-2,5 % en cacodilat sòdic 0,2 M a pH 7,3, amb indicis de Cl_2Ca . A continuació es postfixà en OsO_4 a l'1 % en el mateix tampó. El mètode es prosseguí amb la deshidratació amb acetona i inclusió amb la mescla Araldita-Epon. Els talls ultrafins foren contrastats amb acetat d'uranil i citrat de plom segons REYNOLDS (1963).

Per a l'observació en microscòpia electrònica d'escombratge s'ha seguit el mateix procés encara que després de la deshidratació s'han assecat les mostres pel mètode del punt crític emprant CO_2 . Finalment, es recobriren les mostres amb or mitjançant un dispositiu de *sputtering*.

Les observacions es varen efectuar amb els microscopis electrònics Philips models EM200 i EM301 i el microscopi de *scanning* fou el Cambridge S4 del Centre de Microscòpia Electrònica de la Universitat de Barcelona.

RESULTATS

Els oòcits de la majoria d'organismes, excepte els dels Espongiaris i Hidrozous, presenten una coberta o embolcall format per un sistema de capes que es diferencien progressivament al llarg de l'oogènesi. Pel damunt de l'oolemma o membrana plasmàtica de la cèl·lula germinal es distingeix la membrana primària (membrana vitel·lina). És una fina condensació de la super-

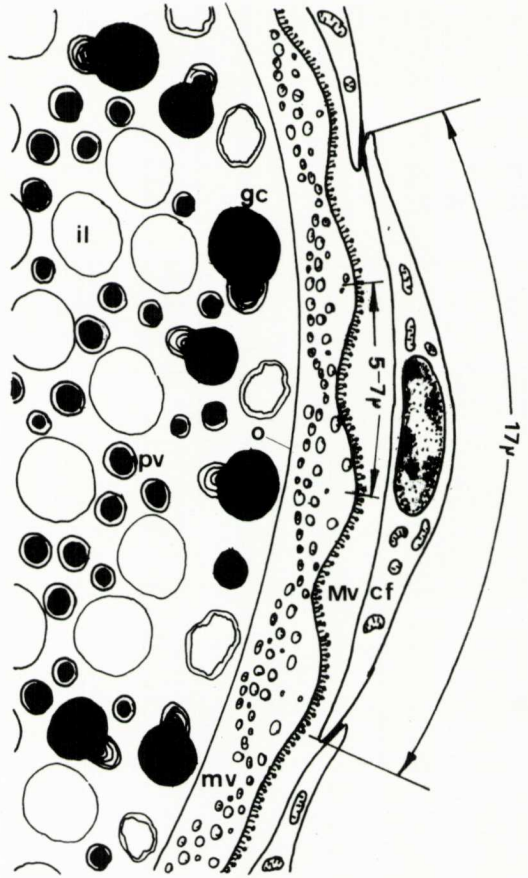


FIG. 1. Esquema de la coberta de l'oòcit ovàric de *Terebratula vitrea*, segons la descripció del text. cf, cèl·lula fol·licular; oc, oòcit; mv, membrana vitel·lina; o, oolemma; gc, gra cortical; pv, plaqueta vitel·lina; il, inclusions lipídiques; Mv, microvilli.

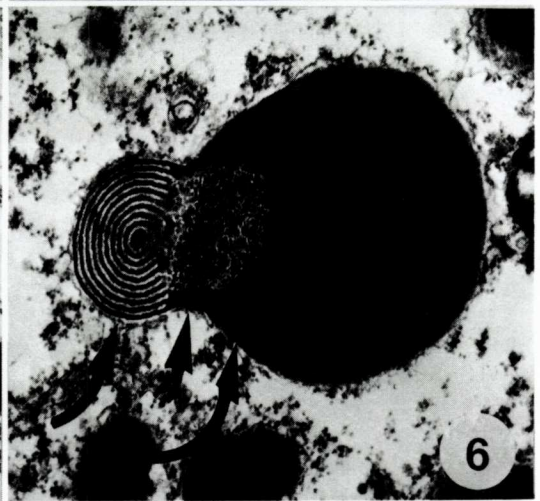
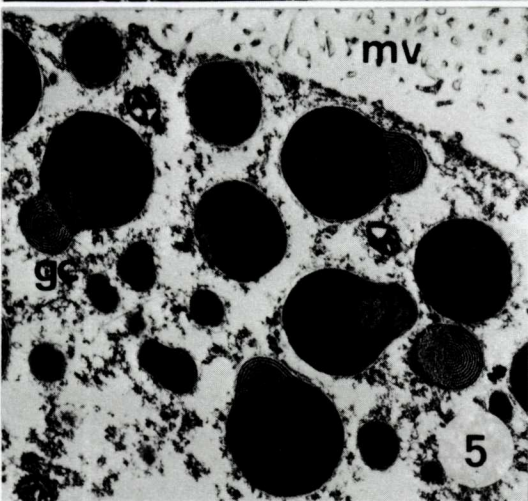
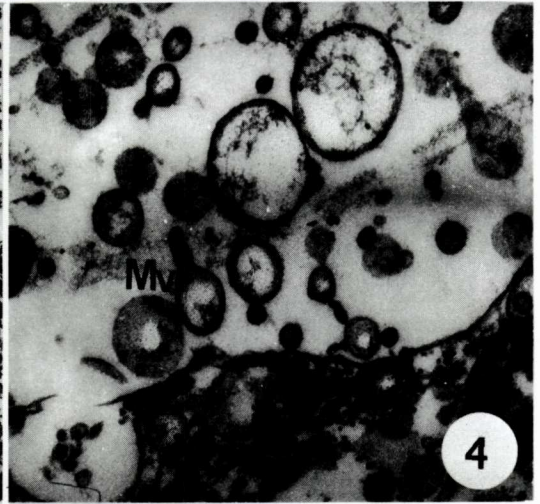
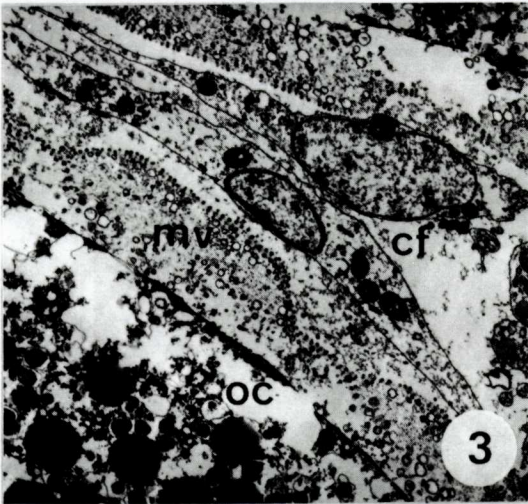
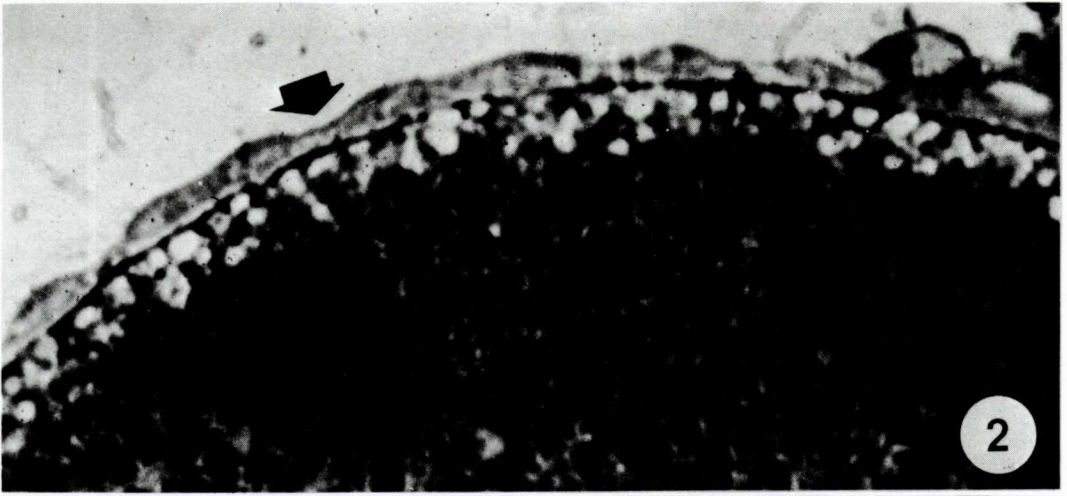
FIG. 2. Oòcit observat en microscòpia ordinària. Fletxa: detall de la membrana vitel·lina (4.200X).

FIG. 3. Ultraestructura de la membrana vitel·lina (mv) i de les cèl·lules fol·liculars (fc) de dos oòcits (oc) (5.000).

FIG. 4. Detall de la membrana vitel·lina. S'observa la morfologia variable dels microvilli (Mv) tallats transversalment (48.300X).

FIG. 5. Grans corticals en la zona més externa del citoplasma (gc) de l'oòcit. Per damunt es veu la membrana vitel·lina (mv) (12.480X).

FIG. 6. Detalls de l'estructura d'un gra cortical. S'hi distingeixen tots tres components (fletxes) (35.800X).



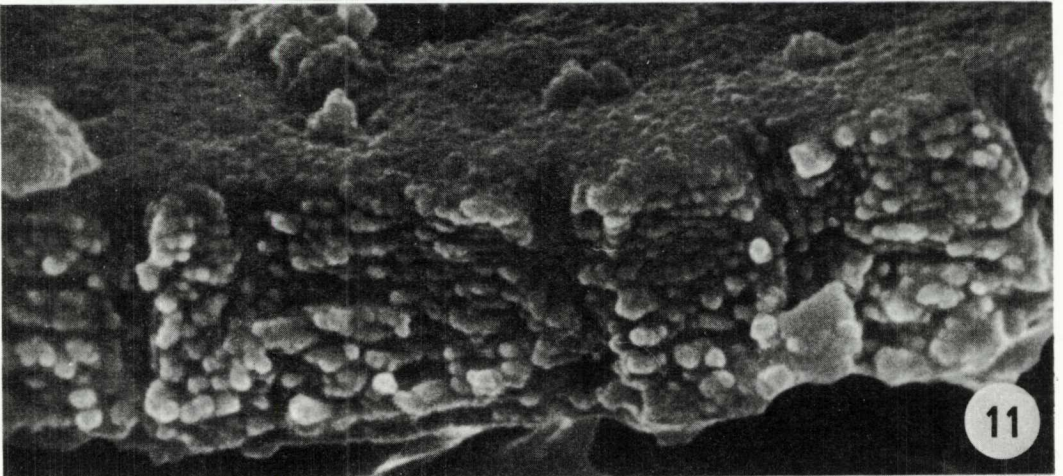
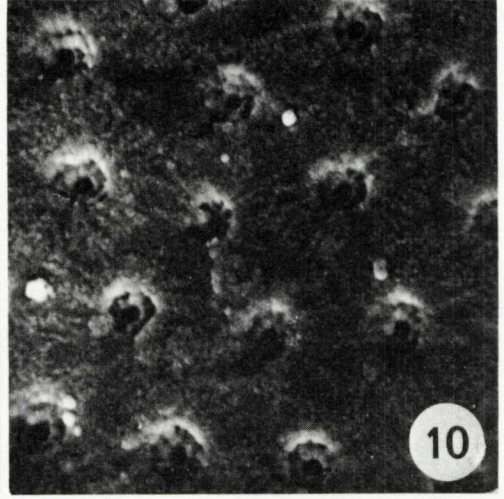
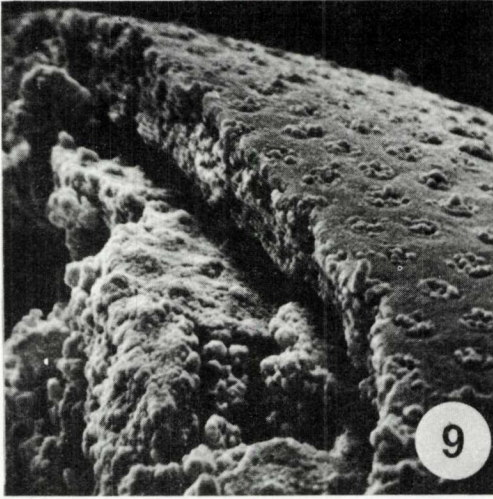
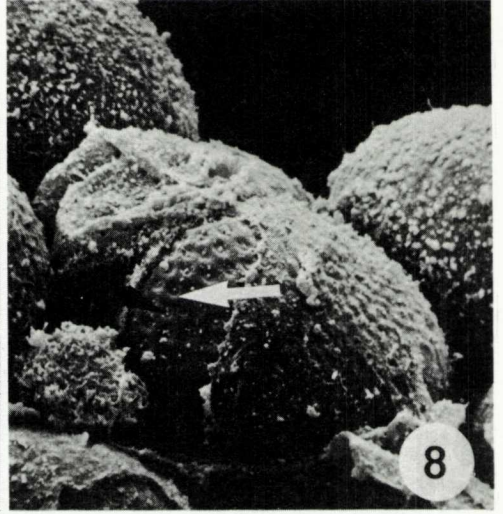
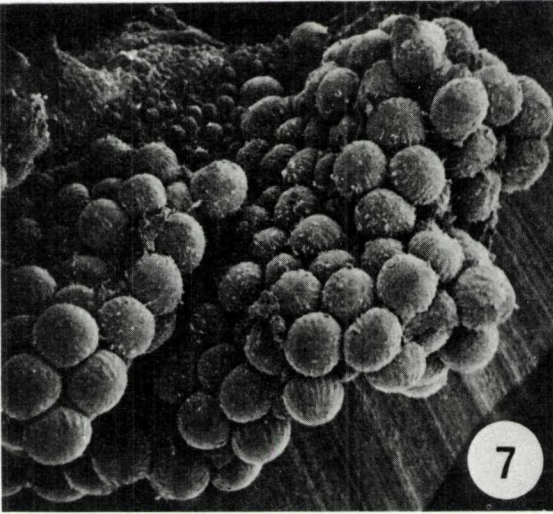


FIG. 7. Imatge de l'ovari de *T. vitrea* en microscòpia electrònica d'escombratge (60X).

FIG. 8. Detall d'un oòcit en el qual es veuen les depressions de la membrana vitel·lina (fletxes), que li donen l'aspecte característic. S'observen algunes cèl·lules fol·liculars (360X).

FIG. 9. Coberta (membrana secundària) de l'oòcit lliure (2.500).

FIG. 10. Detall de la coberta de l'oòcit lliure on es veuen molt clars els porus i llur distribució (4.000X).

FIG. 11. Canalicle que formen els porus a través de la membrana secundària de l'oòcit (10.000X).



fície del citoplasma de l'oòcit que presenta força *microvilli* de forma i volum neta-ment desiguals. Durant l'oogènesi els *microvilli* es revesteixen d'un material fibrillar que serveix per a canalitzar les substàncies que s'incorporen al citoplasma.

Sobre la membrana vitel·lina es diposita la secundària elaborada per les cèl·lules fol·liculars. Es tracta d'una formació relativament espessa, a nivell de la qual es poden observar porus que hom suposa que permeten la respiració de l'oòcit i la penetració de l'espermatozoide.

En el cas de *T. vitrea* es donen unes determinades particularitats. En efecte, els oòcits ovàrics estan envoltats per nombroses cèl·lules fol·liculars de tipus endotelial (fig. 3) que es disposen segons meridians d'una cèl·lula, l'oòcit, notablement esfèrica (fig. 7). La cèl·lula fol·licular és molt prima amb nucli prominent, membrana sense *microvilli* i exhibeix unions de tipus íntim amb les cèl·lules veïnes. Són típicament secretores amb reticle endoplasmàtic i aparell de Golgi conspicu, i presenten mitocondris de matriu densa.

Per sota les cèl·lules fol·liculars es troba la membrana vitel·lina formada per gran nombre de *microvilli* que varien entre 500 i 1.800 àngstrom de diàmetre. Aquests *microvilli* presenten una morfologia diversa, en la base s'observa una dilatació, segueix un tram cilíndric i acaba en un àpex esfèric que ostenta un glucocàlix de tipus filamentós. Aquesta configuració determina capes diferenciades en la membrana vitel·lina (fig. 4).

El gruix d'aquesta membrana no és uniforme, ja que presenta depressions o botons distribuïts regularment per tota la

superfície de l'oòcit que poden fer-se visibles mitjançant la microscòpia ordinària dels talls semifins (fig. 2). La disposició d'aquestes depressions es fa, gairebé sempre, segons un hexàgon regular de 4 micres de costat.

Quan l'oòcit és madur, donada la presència de grans corticals en la zona més externa del citoplasma, s'inicia la formació de la membrana secundària tot mantenint-se la disposició de la vitel·lina. Els grans corticals presenten tres regions clarament diferenciades (figs. 5, 6), i són tan característics que solament ens consta una morfologia comparable en el cas d'*Arbacia punctulata* descrita per ANDERSON (1968).

En els oòcits lliures (no ovàrics) notem l'absència de cèl·lules fol·liculars i, per tant, dels meridians que formaven. En aquest darrer estadi la membrana secundària té un gruix de 3 a 4 micres i ostenta gran quantitat de porus que el travessen (figs. 9, 11), la disposició dels quals és hexagonal i coincideix amb l'organització descrita més amunt de la membrana vitel·lina dels oòcits més joves.

DISCUSSIÓ

Els *microvilli* que configuren la membrana vitel·lina procedeixen exclusivament de les cèl·lules germinals, no obstant el seu contingut fibrós potser elaborat per les cèl·lules fol·liculars que l'envolten. Trobem una organització així en els oòcits de *Mytilus* (mollusc lamel·libranqui; DURFORT, 1973), però en aquest cas com que no existeixen cèl·lules fol·liculars, tot el contingut de la membrana vitel·lina és elaborat pel gàmeta.

La disposició segons meridians de les cèl·lules fol·liculars fou descrita per PERCIVAL (1944) a *Terebratulina caput-serpentis*, però el microscopi electrònic d'escombratge ens revela una regularitat que no ens consta que es presenti en cap altre grup zoològic. La presència de diferents capes o regions (vesiculosa i fibrosa) en la membrana vitel·lina ha estat també descrita per TAKASHIMA (1960) en alguns molluscs.

L'organització de la membrana vitel·lina en depressions distribuïdes, més o menys regularment, en hexàgons sobre la superfície de l'oòcit té semblança amb la indicada per HOLLAND (1977) en els oòcits de *Comanthus japonica* (equinoderm crinoï-

deu). Al microscopi electrònic d'escombratge les imatges obtingudes per aquest darrer autor en els oòcits d'aquest crinoideu són semblants a les que es presenten aquí; Holland, però, no descriu la possible derivació en porus en madurar l'oòcit, tal com sembla que s'esdevé en els gàmetes de *T. vitrea*.

SAWADA (1973), a *Lingula unguis*, presenta imatges de la membrana vitel·lina en què s'observa un relleu desigual damunt la superfície del gàmeta. Aquest cas tampoc no és comparable amb el nostre, ni en la forma ni en la distribució.

La coincidència en l'estructura regular (gairebé sempre hexagonal) que presenten les depressions de la membrana vitel·lina dels oòcits ovàrics (fig. 8) amb els porus de la membrana secundària que tenen els oòcits lliures (figs. 9, 10) fa pensar que es formen a partir d'aquells. En efecte, les cèl·lules fol·liculars que, com ja s'ha dit, són típicament secretores, elaboren materials que es dipositen damunt de la membrana vitel·lina donant lloc a l'embolcall secundari; una vegada assolit aquest, l'oòcit perd les cèl·lules fol·liculars i esdevé completament esfèric.

AGRAÏMENT

Els autors regraden la col·laboració del doctor Guillem Mateu de l'Institut Oceanogràfic de Ciutat de Mallorca per la recollecció dels exemplars estudiats. Així mateix, agraeixen l'important ajut de la senyoreta M. A. Garcia i del senyor L. Reynaldo en les tècniques d'ultramicrotòmia i electrografia, respectivament.

BIBLIOGRAFIA

- AFZELIUS, B. A. 1956. The ultrastructure of the cortical granules and their products in the sea urchin egg as studied with Electron Microscope. *Exp. Cell Res.*, 10: 257-285.
- ALEXANDER, R. 1979. *The Invertebrates*. Cambridge University Press.
- ANDERSON, E. 1966. The origin of Cortical Granules and their Participation in the Fertilization Phenomenon in Echinoderms (*Arbacia punctulata*). *J. Cell Biol.*, 31: 5-6.
- BEAUCHAMP, P. 1960. Classe Brachiopodes. In: *Traité de Zoologie*, 5 (P. P. Grassé, ed.): 1380-1430. Masson. Paris.
- CHUANG, S. E. 1959. The breeding season of the brachiopod. *Lingula unguis* (L.). *Biol. Bull.*, 117: 202-207.
- DURFORT, M. 1973. *Ultraestructura de la gónada femenina de algunos moluscos*. Tesi doctoral. Universitat de Barcelona.
- DURFORT, M. 1974. Ultraestructura de las expansiones de los ovocitos de *Trachydermon cinereus* (Mollusca: Polyplacophora). *Bol. R. Soc. Española Hist. Nat.*, 72: 281-288.
- HARO, A. DE. 1962. *Estructura y anatomía comparadas del manto, papilas, pedúnculo, musculatura aductora y concha de los Braquiópodos Testicardinos*. Tesi doctoral. Universitat de Barcelona.
- HARO, A. DE. 1963. Estructura y anatomía comparadas de las gónadas y pedúnculo de los Braquiópodos Testicardinos. *Publ. Inst. Biol. Apl.*, 35: 97-117.
- HINTON, H. E. 1981. Respiratory Efficiency of Egg Plastrons. *Biol. Insect Eggs*, 1: 95-148.
- HOLLAND, N. D. 1977. The Shaping of the ornamented fertilization membrane of *Comanthus japonica* (Echinodermata: Crinoidea). *Biolog. Bull.*, 153: 299-311.
- HOWARD, C., BRUNTON, C. & CURRY, G. B. 1979. *British Brachiopods*. Academic Press. London.
- HYMAN, L. H. 1959. The Lophophorate Celomates. Phylum Brachiopoda. In: *The Invertebrates*, 5: 516-609. Mc Graw-Hill. New York.
- LOZANO CABO, F. 1970. *Oceanografía, biología Marina y Pesca*, 2: 50-53. Paraninfo. Madrid.
- MEGLITSCH, P. A. 1972. *Invertebrate Zoology*. Oxford University Press. London.
- NARDON, P. 1971. Contribution à l'étude de la constitution et de l'évolution cytochimique du globe vitellin et discussion sur le rôle des cellules folliculeuses. *Ann. Zool. Ecol. Anim.*, 3: 401-409.
- PERCIVAL, E. 1944. A contribution to the life-history of the Brachiopod *Terebratella inconspicua* Sow. *Trans. R. New Zealand Soc.*, 74: 1-23.
- PRENANT, M. 1928. Notes histologiques sur *Terebratulina caput-serpentis* L. *Bull. Soc. Zool. France*, 59: 113-125.
- REYNOLDS, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 17: 208-212.
- RUDWICK, M. J. S. 1970. *Living and fossil Brachiopods*. Hutchinson University Library. London.
- SAWADA, N. 1973. Electron microscope studies of gametogenesis in *Lingula unguis*. *Zool Mag. Tokyo*, 82: 178-188.
- ZERBIB, Ch. 1975. Première observation de granules corticaux dans l'oocyte d'un Crustacé, l'Amphipode *Orchestia gammarellus* (Pallas). *C. R. Acad. Sc. Paris*, 281: 1345-1347.