

Estudio a nivel ultraestructural de la formación de la envoltura  
externa del huevo de Chirocephalus diaphanus (Crustacea. Branchiopoda)

E. RIBES

Dpt. Morfologia Microscòpica. Fac. Biologia. Universitat de Barcelona.

Abstract

Ultrastructural study of the formation of the outer envelope of the  
egg of Chirocephalus diaphanus (Crustacea. Branchiopoda).

The egg of *Chirocephalus diaphanus* is protected by two envelopes during the course of the first stages of embryonic development: an outer one or "shell" and an inner one or "cuticle". The outer envelope is of tertiary origin, as it is formed from the secretions emitted by some glandular formations leaning against the uterine cavity: the shell glands, whilst the inner envelope is a formation of blastodermic origin which appears between the inner area of the shell and the blastomeres' surface.

After fertilisation, the cell-coat separates from the plasmatic membrane of the egg and forms the fertilisation membrane that delimitates a perivitelline space. At a more advanced stage, the fertilisation membrane splits into two layers, creating a compartment where the secretions emitted by the shell glands accumulate progressively, once they have crossed the outer layer of the fertilisation membrane, giving rise to the formation of the "shell".

The outer envelope or shell consists of three zones: an inner, homogeneous zone, a middle, alveolar zone, and an outer zone which is a prolongation of the former, where the aeropyles are located.

Introducción

Los estudios más detallados de las cubiertas de los huevos de los crustáceos y de las formaciones glandulares que las originan se han realizado principalmente en los branchiopodos anostráceos.

Los huevos de *Chirocephalus diaphanus*, así como los de otros anostráceos, en el momento de la puesta, están protegidos por una envoltura externa o "cáscara" y por una envoltura interna o "cutícula". La cáscara es de origen terciario ya que se forma a partir de las secreciones emitidas por las glándulas de la cáscara; formaciones glandulares adosadas a la cámara uterina (MAWSON y YONGE, 1938; RIBES, 1983). Mientras que la cutícula es una formación de origen blastodérmico, que aparece entre la cáscara y la superficie de los blastómeros.



La cubierta de los huevos de los anostráceos ha sido estudiada desde un punto de vista morfológico e histoquímico a nivel de microscopía óptica en diferentes especies: Chirocephalus diaphanus (MAWSON y YONGE, 1938), Branchipus schäferi (KUPKA, 1940), Chirocephalopsis bundyi (LINDER, 1959), Chirocephalus stagnalis (NOURISSON, 1962), Artemia salina (LOCHHEAD, 1941; DUTRIEU, 1960; FAUTREZ y FAUTREZ-FIRLEFYN, 1971), y a nivel de microscopía electrónica en Artemia salina (MORRIS y AFZELIUS, 1967; ANDERSON et al., 1970) y en Tanymastix lacunae (GARREAU de LOUBRESSE, 1974, 1978 y 1980).

En la presente nota nos hemos centrado básicamente en la formación de la envoltura externa del huevo de Chirocephalus diaphanus.

#### Material y Métodos

Los ejemplares de Chirocephalus diaphanus estudiados, proceden de unas lagunas efímeras de sustrato turboso cercanas a la población de Campmany (Girona). Aislados los huevos del útero, se procesan para ser estudiados con los microscopios electrónicos de transmisión y de barrido. Así, se fijan con la mezcla paraformaldehído al 2% - glutaraldehído al 2,5% tamponado con Sörensen 0,2 M a pH 7,4 por espacio de 4 h. a 4°C., seguido de una postfijación con tetraóxido de osmio al 2% en el mismo tampón, durante 2 h., a temperatura ambiente.

Tras una deshidratación con etanol se procede a la inclusión en araldita o en spurr, utilizando el óxido de propileno como líquido intermediario. Los cortes ultrafinos se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo.

Otros huevos fueron tratados, después de una apurada deshidratación, por el acetato de amilo y se les aplicó el método del punto crítico de desecación. Seguidamente las muestras se recubrieron con una capa de oro de 200 Å., mediante la técnica de "sputtering".

Las observaciones se realizaron con los microscopios electrónicos Philips EM-200 y Cambridge Stereoscan SS-4, del Servei de Microscòpia Electrònica de la Universitat de Barcelona.



### Observaciones y Discusión

Una vez el oocito ha entrado en la cámara uterina y ha sido fecundado, tiene lugar la reacción cortical; la envoltura celular -"cell-coat"- se separa de la membrana plasmática dando origen a la membrana de fecundación. Esta membrana presenta una estructura estratificada constituida por dos capas: una capa interna densa y una capa externa de aspecto granuloso-fibrilar (Figs. 2 y 3).

La membrana de fecundación continua separándose de la membrana plasmática originando un espacio perivitelino, cuyo espesor varía a lo largo de la periferia del huevo. Este espacio contiene un material de aspecto granuloso (Fig. 3).

En este estadio, la zona cortical del citoplasma del huevo se caracteriza por presentar, además de mitocondrias y vesículas de retículo endoplasmático rugoso, una gran cantidad de partículas de glucógeno. También es notoria la presencia de sustancias de reserva de naturaleza lipídica y proteica (Figs. 1 y 2).

En una fase posterior las dos capas que constituyen la membrana de fecundación se separan y forman un espacio donde se acumulan las partículas de secreción que darán origen a la envoltura externa o cáscara (Fig. 4).

Los productos elaborados por las glándulas de la cáscara se vierten en la cámara uterina, a las seis o siete horas de producirse el apareamiento. Una vez en el útero, las finas partículas de secreción atraviesan la capa externa de la membrana de fecundación y se depositan sobre la capa interna, originando una zona densa llena de alveolos. Esta zona alveolar va desarrollándose de forma progresiva dado al aporte constante de partículas de secreción (Fig. 4). Los alveolos tienen un tamaño muy desigual, sus diámetros oscilan entre los 0,8 y 1,2  $\mu\text{m}$ .; su interior está ocupado por un material fibrilar (Fig. 5) En corte tangencial, las paredes de los alveolos aparecen formadas por un gran número de pequeños poros hexagonales unidos entre sí, de unos 280 A, que establecen un sistema de comunicación interalveolar (Fig. 6).



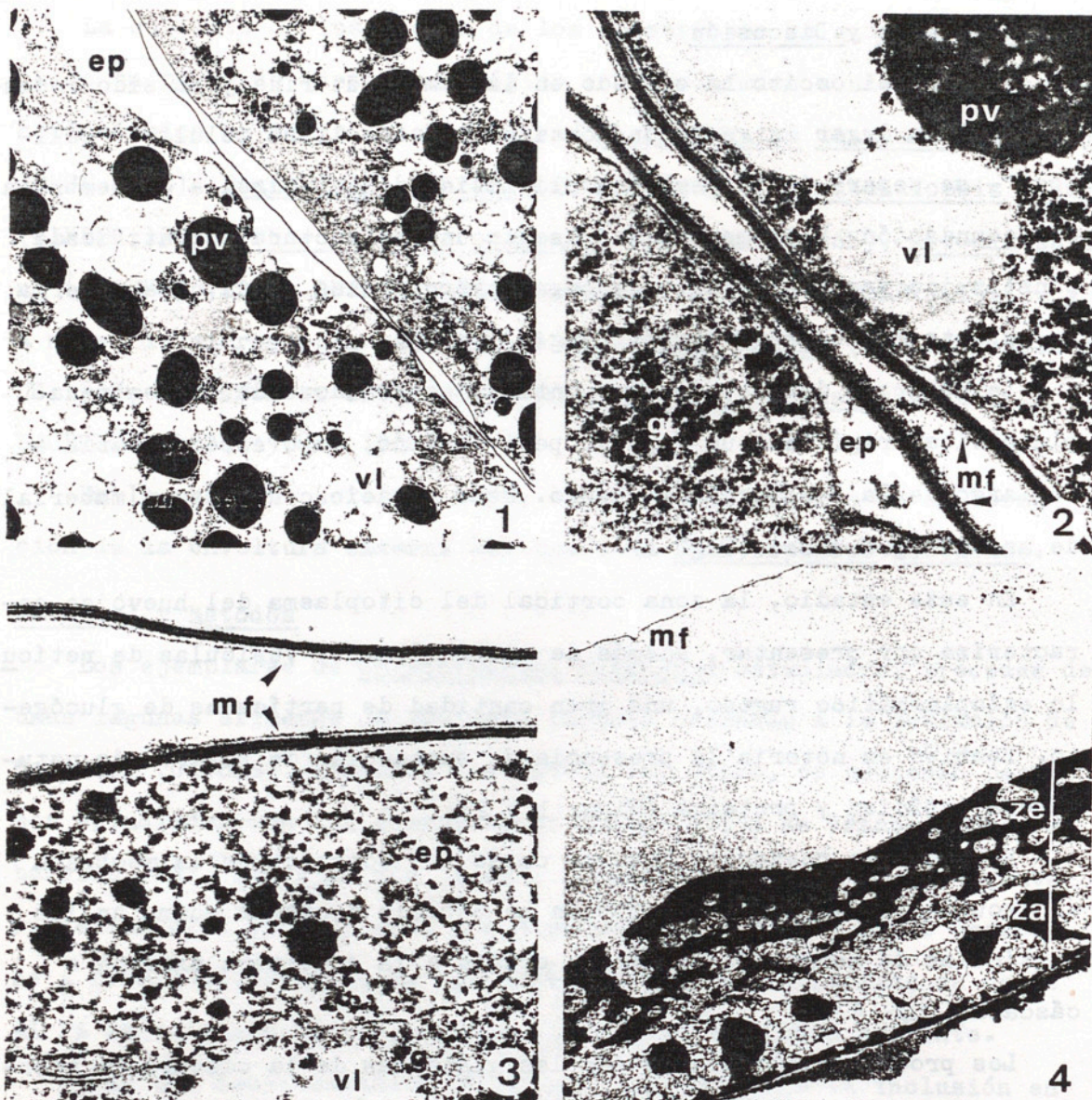


Fig.1. Oocitos fecundados. La "cell-coat" se separa de la membrana plasmática y da lugar a la membrana de fecundación. (2.600 x).

Fig.2. Detalle de la zona cortical del citoplasma. Membrana de fecundación. (38.220 x).

Fig.3. Detalle del espacio perivitelino. (38.220 x).

Fig.4. Visión general de la envoltura externa del huevo. (3.640 x).

Clave de símbolos de las figuras

CA, envoltura externa o cáscara (ze, zona externa; za, zona alveolar; zi, zona interna); CU, envoltura interna o cutícula (cue, zona externa; cuf, zona fibrilar); ep, espacio perivitelino; g, glucógeno; mf, membrana de fecundación; pv, plaquetas vitelinas; vl, vesículas lipídicas.



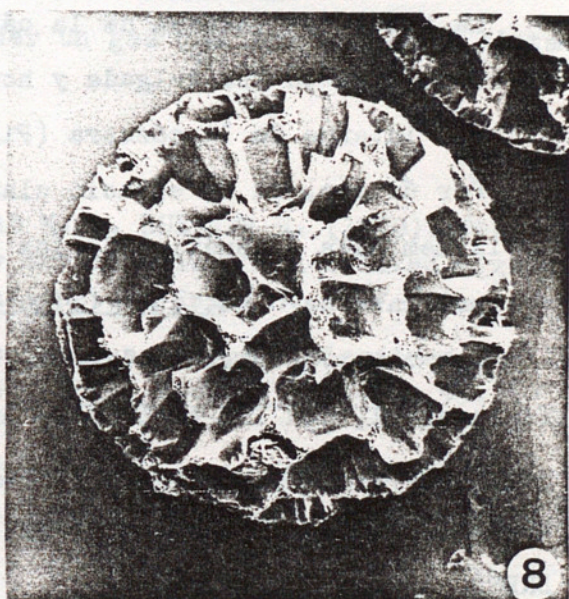
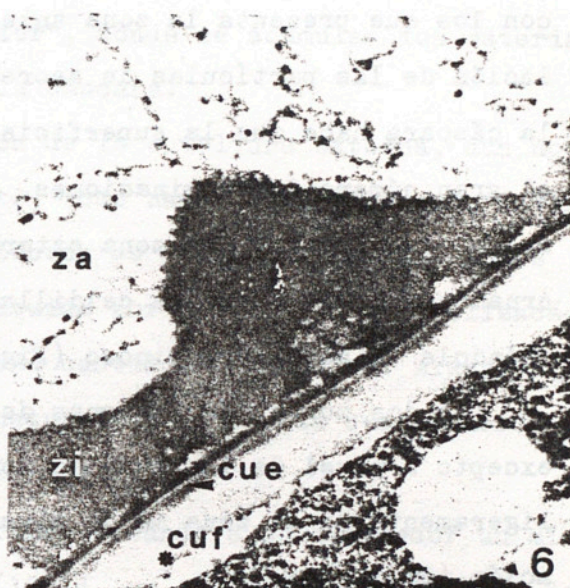


Fig.5. Sección de la envoltura externa. (4.680 x).

Fig.6. Detalle de la zona interna de la cáscara y de la cutícula. (50.440 x).

Fig.7. Sección de la envoltura externa o cáscara observada con un microscopio de barrido. (140 x).

Fig.8. Morfología externa del huevo de Ch. diaphanus. (140 x).



A continuación, por encima de la zona alveolar aparece una nueva capa densa que contiene un menor número de alveolos en comparación con los que presenta la zona anterior (Fig. 5 ). La desigual acumulación de las partículas de secreción a nivel de la zona externa de la cáscara hace que la superficie del huevo no sea lisa. Así, debido al gran número de evaginaciones, muy altas, a modo de pliegues anticlinales, que presenta la zona externa, la superficie del huevo aparece ornamentada de numerosas celdillas exagonales unidas entre sí; confiéndole un aspecto espinoso (Fig. 8).

Las dos zonas más externas de la cáscara están íntimamente unidas, excepto a nivel de las evaginaciones donde la más externa se separa ligeramente de la zona media alveolar y forma unos conductos de aireación (Figs. 5 y 7).

La parte más interna de la cáscara pierde su aspecto alveolar y se transforma en una delgada y homogénea capa densa a los electrones: la zona interna de la cáscara (Fig. 6).

Por último, en el espacio claro que separa la envoltura externa de la membrana plasmática de los blastómeros se va originando la envoltura interna o cutícula (Fig. 6).

Las observaciones realizadas en Chirocephalus concuerdan, en lo fundamental, con las efectuadas en otros anostráceos: Chirocephalopsis (LINDER, 1960), Artemia (MORRIS y AFZELIUS, 1967; ANDERSON et al., 1970; FAUTREZ y FAUTREZ-FIRLEFYN, 1971), Tanymastix (GARREAU de LOUBRESSE, 1974).

El aspecto estratificado que presenta la membrana de fecundación del huevo de Chirocephalus se corresponde con la estructura estratificada que describe ANDERSON et al., (1970), en Artemia, a nivel de lo que él denomina membrana vitelina. También concuerda con las observaciones efectuadas por GARREAU de LOUBRESSE (1974) en Tanymastix. Según este autor, las dos capas que constituyen la membrana de fecundación no solo difieren por su aspecto morfológico, sino también por su naturaleza química.



Asimismo, en Tanymastix, GARREAU de LOUBRESSE (1974) observa la escisión de la membrana de fecundación y la formación de un espacio, que él lo denomina "espace Coquillier", donde se acumulan los materiales amitidos por las glándulas de la cáscara.

Respecto a la naturaleza química de la envoltura externa, aun no se conoce con exactitud. No obstante, todo hace pensar que esta envoltura, por analogía con las de los huevos de los otros branchiópodos anostráceos estudiados, está constituida por proteínas, mucopolisacáridos neutros y ácidos, y una pequeña cantidad de lípidos. Mientras, la envoltura interna presenta una naturaleza quitinosa que recuerda al exoesqueleto de los artrópodos.

Las envolturas protegen al embrión, creando a su alrededor un microclima. Segun MORRIS y AFZELIUS (1967), en Artemia, los alveolos de la envoltura externa podrian contener un gas que ayudaria a la flotación del huevo en el agua.

#### Bibliografía

ANDERSON E., LOCHHEAD J.H., LOCHHEAD M.S., HUEBNER E. (1970). The origin and structure of the tertiary envelope in thick-shelled eggs of the brine shrimp, Artemia. J. Ultrastructure Res., 32, 497-525.

DUTRIEU J. (1960). Observations biochimiques et physiologiques sur le développement d'Artemia salina Leach. Arch. Zool. exp. gen., 99, 1-134.

FAUTREZ J., FAUTREZ-FIRLEFYN N. (1971). Contribution à l'étude des glandes coquillières et des coques de l'oeuf d'Artemia salina. Arch. Biol. (Liège), 82, 41-83.

GARREAU de LOUBRESSE N. (1974). Etude chronologique de la mise en place des enveloppes de l'oeuf d'un Crustacé Phyllopoide: Tanymastix lacunae. J. Microscopie, 20, 697-714.

GARREAU de LOUBRESSE N. (1978). Etude ultrastructurale et radioautographique de l'activité cyclique des glandes coquillières d'un Crustacé Phyllopoide. Biol. Cell., 31, 59-78.

GARREAU de LOUBRESSE N. (1980). Overloading, crinophagy and autophagy in secretory cell of the shell glands in a crustacean. Biol. Cell., 39, 63-90.

KUPKA E. (1940). Untersuchungen über die Schalenbildung and Schalensbildung and Schalenstruktur bei den Eiern von Branchipus schäfferi (fischer). Zool. Anz., 132, 130-139.



- LINDER H.J. (1959). Studies on the fresh water fairy shrimp Chirocephalus bundyi (Forbes). I. Structure and histochemistry of the ovary and accessory reproductive tissues. J. Morph., 104, 1-60.
- LINDER H.J. (1960). Studies on the fresh water fairy shrimp Chirocephalus bundyi (Forbes). II. Histochemistry of egg-shell formation. J. Morph., 107, 259-284.
- LOCHHEAD J.H. (1941). Artemia, the brine shrimp. Turtlox News, 19, 84-87.
- MAWSON M.L., YONGE C.M. (1938). The origin and nature of the egg membranes in Chirocephalus diaphanus. Quart. J. Micr. Sci., 80, 553-565.
- MORRIS J.E., AFZELIUS B.A. (1967). The structure of the shell and outer membranes in encysted Artemia salina embryos during cryptobiosis and development. J. Ultrastructure Res., 20, 244-259.
- NOURISSON M. (1962). Maturation, fécondation et segmentation de l'oeuf de Chirocephalus stagnalis, Shaw (Crustacé. Phyllopode). C.R. Acad. Sci., Paris, 254, 3567-3569.
- RIBES E. (1983). Dades ultraestructurals de les glàndules de la closca de Chirocephalus diaphanus (Crustacea: Phyllopoda). Butll. Inst. Cat. Hist. Nat., 49 (Sec. Zool., 5), 31-40.