

Aspectos ultraestructurales de la espermatogénesis de Hemidiaptomus
roubauai (Copepoda, Calanoida).

E. Ribes

Dpt. Morfologia Microscòpica. Fac. Biologia. Universitat de Barcelona.
Avda. Diagonal, 637-647. 08028 Barcelona. Spain.

Abstract

Ultrastructural aspects of spermatogenesis in Hemidiaptomus roubauai
(Copepoda, Calanoida).

On the apical zone of the testis of Hemidiaptomus roubauai, we find spermatogonia and young spermatocytes in leptotene stage proper to the prophase of the first meiotic division. Both cellular types are undistinguishable and show a big nucleus 6-7 μm in diameter. Within it we can observe large pellucid zones and, next to them, chromatine masses and one or two nucleoli 1.5 μm in diameter are readily distinguished. The cytoplasm shows a great deal of ribosomes and a set of granular endoplasmic reticulum saccules. Mitochondria are placed around the nucleus. Since now we have no evidence of the existence of centrioles in this stage.

On the intermediate zone we find spermatocytes in zygotene, pachytene and diplotene stages. These cells show a big spheroidal nucleus measuring between 7 and 9 μm . In these stages chromosomes appear more brightly due to their being in a higher degree of spiralization. Synaptonemal complexes figures are also observed. In the cytoplasm, electron-dense cisternae association with the "nuage" can be explained as a transitory differentiation of an acrosome. Germ cells show syncytial unions during these stages due to the existence of intercellular bridges.

Spermatids fill the testis anterior zone and they are surrounded by the vegetative cells cytoplasm. They show a big nucleus in a very irregular shape, full of condensed chromatine granules. Large mitochondria with tubular cristae are placed in the perinuclear cytoplasm. Endoplasmic reticulum saccules lean against the cellular membrane and they become a plurimembranous cover. We can observe two evolution models in spermatids: the ones which give rise to functional spermatozoa and the abortive ones, which degenerated and are phagocytized by vegetative cells.

In the deferent duct spermatids give rise to discoidal aflagellated spermatozoa.

Introducción

La morfología del aparato genital masculino y del proceso de la espermatogénesis de los copépodos calanoides ha sido estudiada en varias especies, la mayoría pertenecientes a géneros marinos. A nivel de microscopía óptica los estudios datan de principios de siglo: Paracalanus parva (RETZIUS, 1909), Eurytemosa velox (RETZIUS, 1909), Diaptomus castor (HEBERER, 1924), Sapphirina ovalolanceolata (HEBERER, 1932), Calanus finmarchicus (HEBERER, 1932 y 1937; LOWE, 1935; MARSHALL, 1952 y MARSHALL y ORR, 1955) y Epilabidocera amphitrites (PARK, 1966); sin embargo, los estudios realizados con el microscopio electrónico son escasos: Calanus hiperboreus (BROWN, 1970), Calanus finmarchicus (RAYMONT et al., 1974) y Labidocera aestiva (BLADES y YOUNGBLUTH, 1981 y 1982). Todos ellos coinciden en describir a los espermatozoides como unas células redondas, ovoides o discoidales, carentes de centriolos, de acrosoma y de flagelo, por tanto inmóviles. Este tipo de gameto masculino puede considerarse el arquetipo común del de todos los copépodos.

Los espermatozoides son transferidos a las hembras mediante espermatóforos que se unen al segmento genital junto al gonoporo, llegando por vía subcuticular a las espermatecas donde se almacenan dando lugar a una fertilización interna.

Material y Métodos

Hemidiaptomus roubau es un copépodo calanoide planctónico de agua dulce, que vive en aguas temporales. Los ejemplares utilizados para este estudio proceden de unas lagunas efímeras de sustrato turboso cercanas a la población de Campmany (Girona).

Dada la dificultad de extraer el aparato reproductor, se procede a una fijación "in toto" del animal, por inmersión en una mezcla de paraformaldehído-glutaraldehído (KARNOVSKY, 1965) tamponada con fosfato 0,2 M (pH 7,4) a temperatura ambiente durante 3 h. Después de un lavado exhaustivo con tampón fosfato 0,2 M se procede a una post-fijación de 1 h. con tetraóxido de osmio al 2 % en el mismo tampón y a temperatura ambiente. Tras una deshidratación progresiva con etanol

y utilizando el óxido de propileno como líquido intermediario, se procede a una inclusión en resina spurr (1969). Los cortes ultrafinos se contrastan con acetato de uranilo y citrato de plomo (REYNOLDS, 1963), siendo observados en un microscopio electrónico PHILIPS EM-200 del Servei de Microscopia Electrònica de la Universitat de Barcelona.

Observaciones

El aparato genital masculino de H. roubaui consta de un único testículo y de un largo conducto genital que se extiende desde el extremo anterior del testículo y se dirige hacia atrás por el lado izquierdo de la cavidad perivisceral, terminando en una amplia hendidura ventrolateral a nivel del primer segmento urosomal.

El conducto genital, atendiendo a las particularidades morfológicas propias de su epitelio de revestimiento, se divide en cuatro zonas anatómicas: el conducto deferente, la vesícula seminal, el receptáculo del espermátforo y el conducto eyaculatorio.

El testículo se sitúa dorsalmente en la región media del cefalotórax, está limitado por una delgada membrana basal a su vez unida al tejido conectivo que rodea al conducto digestivo. La diferenciación celular se efectúa unidireccionalmente desde el extremo distal al proximal, donde se inserta el conducto deferente.

En la zona posterior o distal del testículo se encuentran las espermátgonias y los espermátocitos en fase de leptoteno propia de la primera división meiótica. Ambos tipos celulares, morfológicamente indistinguibles entre sí, se caracterizan por tener un gran núcleo de 6-7 μ m de diámetro. En su interior, junto a amplias zonas claras, destacan los acúmulos de cromatina y uno o dos nucléolos de 1,5 μ m (figs. 1 y 2). El citoplasma presenta un fondo rico en material granular, presumiblemente de naturaleza ribosomal, y una serie de sáculos de retículo endoplasmático rugoso en disposición paralela a la envoltura nuclear. (fig. 2). Las mitocondrias son pequeñas, alargadas y con pocas crestas. Hasta el momento no se han evidenciado en esta fase centriolos.

A nivel de la zona media del testículo se localizan los espermatozoides en las fases de zigoteno, paquiteno i diploteno. Estas células presentan un gran núcleo esférico de 7-9 μ m que ocupa casi toda la célula (figs. 3 y 4). En estas fases los cromosomas aparecen con mayor nitidez, dado el aumento de espiralización que han sufrido y se observan figuras que corresponden a complejos sinaptonémicos (fig. 3). En el citoplasma existen acúmulos de "nuage" asociados a cisternas electrodensas y elementos membranosos, que se podrían interpretar como una diferenciación temporal de un acrosoma (fig. 5), se observan también mitocondrias, un aparato de Golgi constituido por unos cuantos sáculos, algunas vesículas y láminas anulares (fig. 6). Las fases siguientes a la profase I se suceden muy rápidamente sin un claro período interfásico que permita diferenciarlas con exactitud.

Durante la espermatogénesis es frecuente observar entre las células germinales uniones sincitiales debido a la presencia de puentes intercelulares resultado de citodiéresis incompletas. Se distinguen dos modalidades de puentes intercelulares: los abiertos y los obturados (fig. 7 y 8). En ellos se aprecia la transformación que sufre la membrana plasmática a este nivel, al expansionarse y originar una estructura en forma de "maza" (fig. 7). En los puentes obturados, entre las dos formaciones "en maza" que constituyen los límites del puente, se sitúan varios sáculos membranosos derivados del retículo endoplasmático que se van arqueando a medida que se alejan de la zona media de la luz (fig. 8).

En la zona anterior del testículo se encuentran las espermátidas que provienen de la división reduccional, rodeadas de las células vegetativas o accesorias. Las espermátidas jóvenes son células ligeramente ovaladas con un núcleo en posición central que se caracteriza por la organización laxa de la cromatina. Los primeros signos de inicio de la espermiogénesis se manifiestan por la aparición de varias masas granulares, compactas y densas de cromatina que se sitúan cerca de la membrana interna del núcleo (fig. 9). Estos acúmulos de cromatina, parecen estar originados por la unión de múltiples fibrillas

situadas en la zona más central del núcleo. Las espermatidas maduras son células subsféricas de contorno ondulado debido al gran número de cortas expansiones que presenta la membrana plasmática. Se caracterizan por su gran núcleo lobulado, lleno de gránulos de cromatina condensada (figs. 10, 11 y 12). Adosadas a la cara externa de la envoltura nuclear se observa un elevado número de mitocondrias, de gran talla y con pocas crestas en disposición paralela (fig. 11); el resto del citoplasma está lleno de ribosomas. Cuando las espermatidas entran en contacto con el citoplasma de las células vegetativas, se forma una membrana electrodensa a lo largo de la cara interna de la membrana plasmática de las espermatidas, originándose una envoltura pluri-membranosa en la cual se alternan capas paralelas de baja y alta densidad electrónica que confieren un aspecto pentalaminar (fig. 12).

Las células vegetativas que rodean a las espermatidas tienen uno o dos núcleos con acúmulos de heterocromatina adosados a su envoltura nuclear y un nucléolo. En el citoplasma aparecen sáculos de retículo endoplasmático rugoso, dictiosomas del aparato de Golgi y grandes vesículas de fagocitosis conteniendo espermatidas en proceso de digestión (fig. 10).

Las espermatidas son liberadas a la luz del conducto deferente (fig. 13) donde continúan madurando y dan lugar a unos espermatozoides de forma discoidal y carentes de flagelo, cuya morfología interna recuerda a la de las espermatidas. La cara externa de la membrana pentalaminar está recubierta por un grueso glycocálix (fig. 14).

Discusión

El estudio ultraestructural de la espermatogénesis de Hemidiaptomus roubau es semejante al descrito en las otras especies de calanoides estudiadas: Calanus hiperboreus (BROWN, 1970), Calanus finmarchicus (RAYMONT et al., 1974) y Labidocera aestiva (BLADES y YOUNGLUTH, 1982).

Durante la gametogénesis de H.roubau, los primeros estadios celulares adoptan una disposición sincicial al igual que ocurre en otras especies, tanto de invertebrados como de vertebrados, ésto es debido

a la presencia de puentes intercelulares que contribuyen a la creación de un tipo de sincronismo en la diferenciación celular durante el proceso de la espermatogénesis (FAWCETT et al., 1959). En H. roubaui se distinguen dos modalidades de puentes intercelulares: los abiertos y los obturados; éstos últimos presentan una morfología parecida a los descritos en varias especies de mamíferos (NAGANO, 1961; DYM y FAWCETT, 1971) y en el copépodo parásito del mejillón, Mytilicola intestinalis, (DURFORT et al., 1980).

En el testículo de H. roubaui, se observa dos tipos de evolución de las células germinales: las espermatidas que darán lugar a los espermatozoides y las espermatidas abortivas que degeneran, siendo fagocitadas por las células vegetativas, localizadas en la zona anterior del testículo. Según BLADES y YOUNGBLUTH (1982), en Labidocera aestiva, la fagocitosis de las espermatidas por parte de las células vegetativas, junto con el control hormonal, constituye un mecanismo de regulación en la producción de espermatozoides.

En los crustáceos decápodos (MOSES, 1961; HINSCH, 1980) y en los arácnidos (JUBERTHIE y MANIER, 1976; REGER, 1969), la membrana plasmática y la envoltura nuclear de los espermatozoides se fusionan originando una estructura pentalaminar, dentro de la cual se mezclan la cromatina con los orgánulos citoplasmáticos. En H. roubaui, al igual que en Labidocera aestiva (BLADES y YOUNGBLUTH, 1982) la formación de la membrana celular pentalaminar tiene lugar cuando las espermatidas aún están rodeadas por las células vegetativas y mucho antes de tener lugar la fragmentación de la envoltura nuclear. No se han observado " complejos membranosos " asociados con las mitocondrias, tal como ocurre en otras especies de crustáceos (LANGRETH, 1969; REGER y FITZGERALD, 1979; BLADES y YOUNGBLUTH, 1982). Las mitocondrias se encuentran repartidas entre los numerosos gránulos de cromatina condensada que ocupa la totalidad del espermatozoide.

Bibliografia

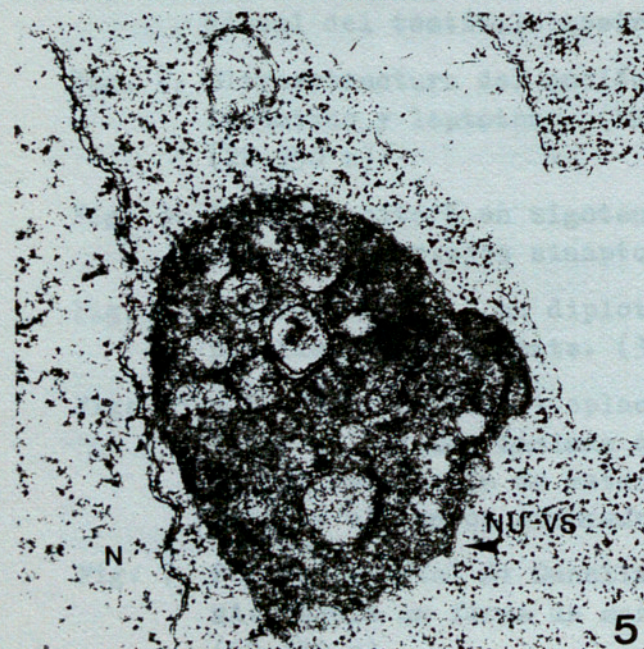
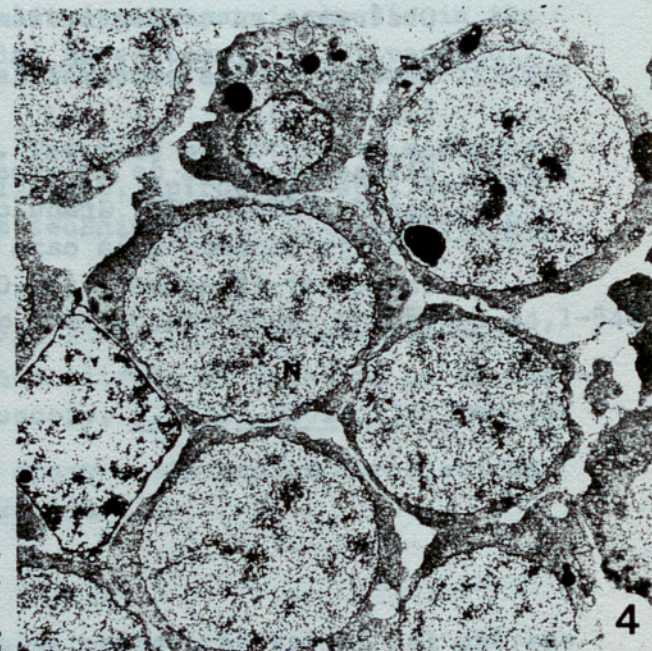
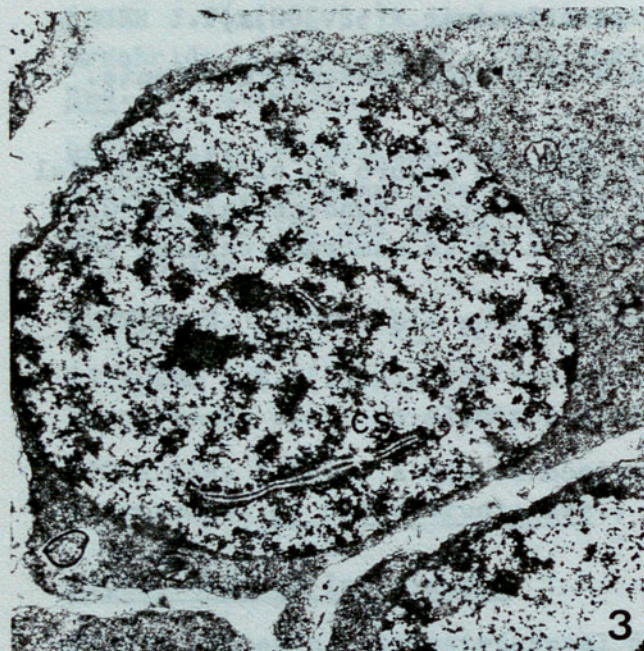
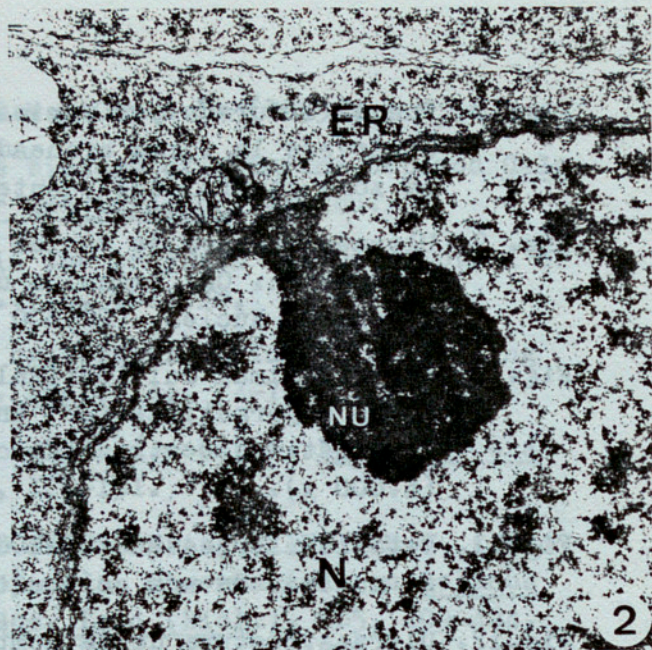
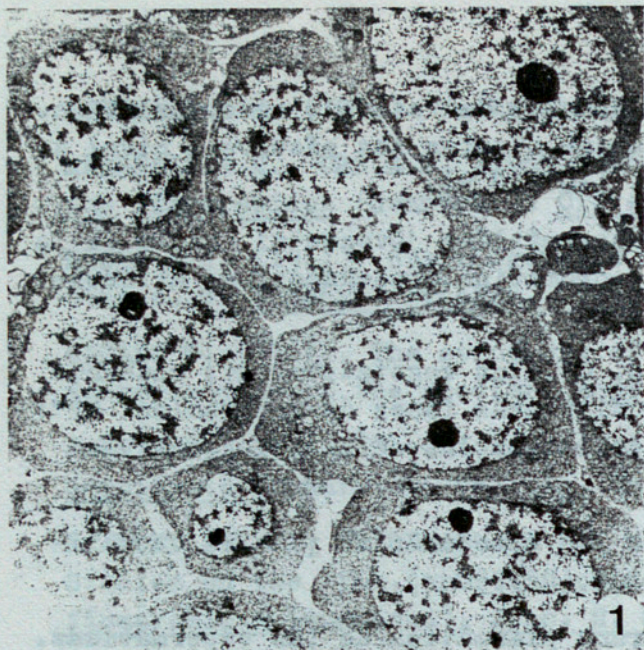
- BLADES P.I., YOUNGBLUTH M.J. (1981). Ultrastructure of the male reproductive system and spermatophore formation in Labidocera aestiva (Crustacea: Copepoda). Zoomorphology, 99, 1-21.
- BLADES P.I., YOUNGBLUTH M.J. (1982). The ultrastructure of spermatogenesis in Labidocera aestiva (Copepoda: Calanoida). Journal of Morphology, 174, 1-15.
- BROWN G.G. (1970). Some comparative aspects of selected crustacean spermatozoa and crustacean phylogeny. In Baccetti Comparative spermatology, Acad. Press, N.Y., 183-205.
- DURFORT M., LOPEZ-CAMPS J., BARGALLÓ R., BOZZO M.G., FONTARNAU R. (1980) Présence de ponts intercellulaires entre les cellules germinales de Mytilicola intestinalis Steur (Crustacea, Copepoda). La Cellule, 73, 207-213
- DYM M., FAWCETT D.W. (1971). Further observations on the numbers of spermatogonia, spermatocytes, and spermatids connected by intercellular bridges in the mammalian testis. Biol. Reprod. 4, 195-215.
- FAWCETT D.W. ITO S. SLAUTTERBACK D. (1959). The occurrence of intercellular bridges in groups of cells exhibiting synchronous differentiation. J. Biophys. Biochem. Cytol. 5, 453-460
- HEBERER G. (1924). Die Spermatogenese der Copepoden. I: Die Spermatogenese der Centropagiden nebst Anhang über die Oogenese der Diaptomus castor. Z. Wiss. Zool., 123, 555-646.
- HEBERER G. (1932) Die spermatogenese der Copepoden. II: Das Conjugations und Reduktionsproblem in der Spermatogenese der calanoiden Copepoden, mit einem Anhang über die Spermatogenese von Sapphirina ovalanceolata (Dana). Z. Wiss. Zool., 142, 191-253.
- HEBERER G. (1937) Weitere Ergebnisse über Bildung und Bau der Spermatophoren und Spermatophoren Koppelapparate bei calanoiden Copepoden. Verh. Deutsch. Zool. Ges., 39, 86-93.
- HINSCH G.W. (1980). Spermiogenesis in Coenobita clypeatus, I. Sperm structure. Int. J. Invert. Reprod., 2, 189-198.
- JUBERTHIE C., MANIER J.F. (1976). Etude ultrastructurale de la spermiogenèse de l'opilion Troglophile Ischyropsalis luteipes Simon (Ischyropsalidae), Ann. Spéléol., 31, 193-201.
- KARNOVSKY M. J. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. J. Cell Biol. 27, 137A
- LANGRETH S. G. (1969). Spermiogenesis in Cancer crabs. J. Cell Biol. 43, 575-603.
- LOWE E. (1935). On the anatomy of a marine Copepod, Galanus finmarchicus (Gunnerus). Trans. Roy. Soc. Edin., 58, 23, 561-603.

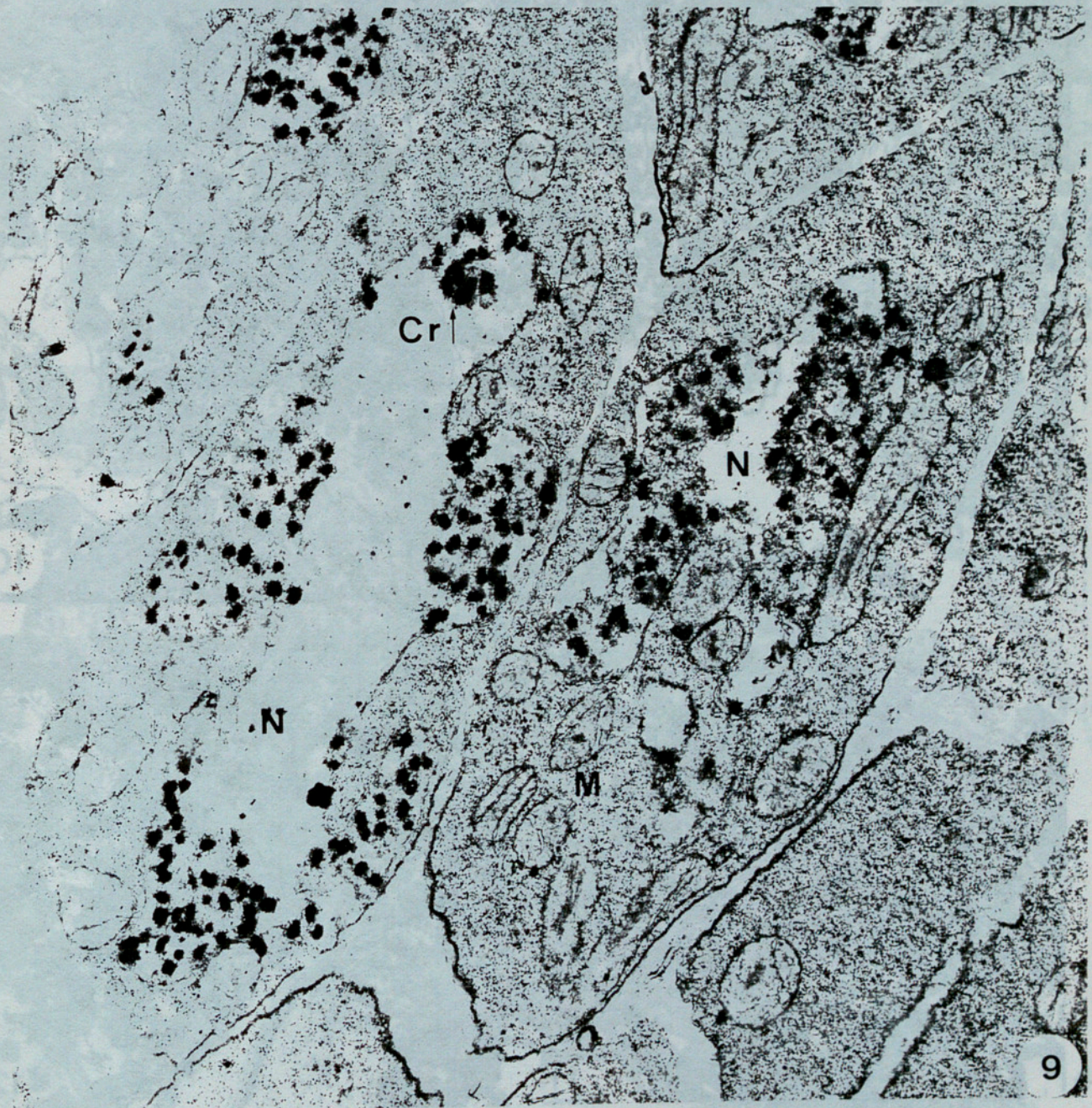
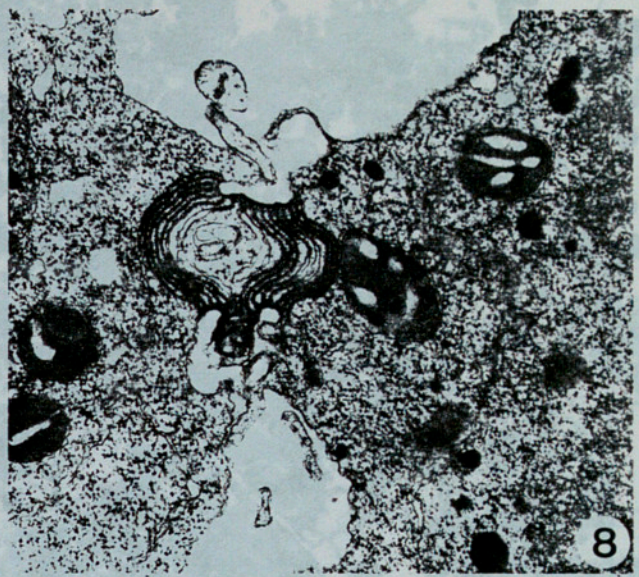
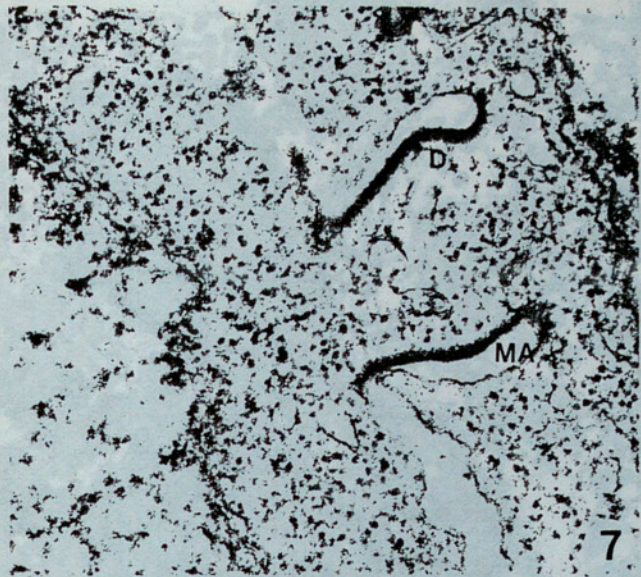
- MARSHALL S.M. (1952). In Marshall S.M., Orr A.P. (1955).
- MARSHALL S.M., ORR A.P. (1955). The biology of a marine Copepod Calanus finmarchicus (Gunnerus). Oliver and Boyd Eds, London.
- MOSES M.J. (1961). Spermiogenesis in the crayfish II. Description of stages. J. Biophys. Biochem. Cytol., 10, 301-330.
- NAGANO T. (1961). The structure of cytoplasmic bridges in dividing spermatocytes of the rooster. Anat. Rec., 141, 73-79.
- PARK T.S. (1966). The biology of a calanoid copepod, Epilabidocera amphitrites McMurrich. Cellule, 66, 129-151.
- RAYMONT J.E.G., KRISHNASWAMY S., WOODHOUSE M.A., GRIFFIN R.L. (1974). Studies on the fine structure of Copepoda. Observations on Calanus finmarchicus (Gunnerus). Proc. R. Soc. Lond (Biol.). 185, 409-424.
- REGER J.F. (1969). A fine structure study on spermiogenesis in the arachnida, Leiobunum sp. (Phalangida; Harvestmen). J. Ultrastruct. Res. 28, 422-434.
- REGER J.F., FITZGERALD M.E. (1979). The fine structure of membrane complexes in spermatozoa of the millipede, Spirobolus sp., as seen by thin-section and freeze-fracture techniques. J. Ultrastruct. Res., 67, 95-108.
- RETZIUS G. (1909). Die spermien der Crustacean. Biol. Untersuch. 14, 1-54.
- REYNOLDS E.S. (1963). The use of lead citrate at light pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol. 17, 208-212.
- SPURR A.R. (1969). A low viscosity epoxy resin medium for electron microscope. J. Ultrastruct. Res., 26, 31-43.

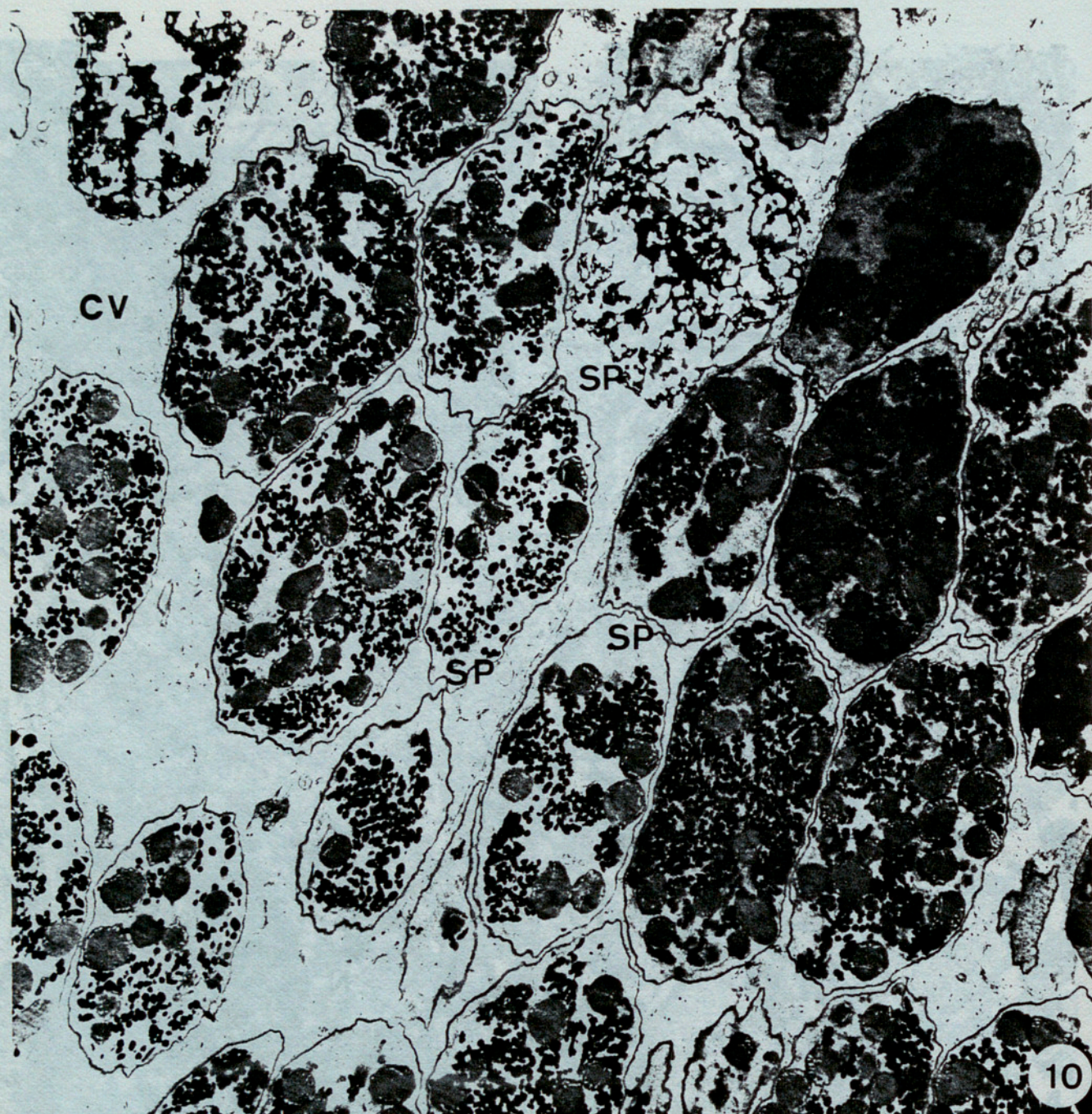
Explicación de las figuras

- Fig. 1. Aspecto ultraestructural de un corte transversal del extremo distal del testículo mostrando espermatocitos jóvenes. (3.780x).
- Fig. 2. Ultraestructura del nucléolo (N) de los espermatocitos en pre-leptoteno y leptoteno. (ER) Reticulo endoplasmático rugoso. (22.950 x).
- Fig. 3. Espermatocito I en zigoteno/paquiteno. Dentro del núcleo se observan complejos sinaptonémicos (CS). (10.260 x).
- Fig. 4. Espermatocitos I en diploteno. (N) Núcleo con la cromatina repartida homogéneamente. (3.780 x).
- Figs. 5 y 6. Detalles del citoplasma de un espermatocito I. AG: Aparato de Golgi; LA: Láminas anulares; M: mitocondria; N: Núcleo; Nu-Vs: Asociación de material electrodensito "nuage" con vesículas y elementos membranosos. (39.690 x).
- Fig. 7. Puente abierto. D: Densificación de los extremos del puente; MA: Figura en forma de maza que limita la luz del puente. (52.380 x).

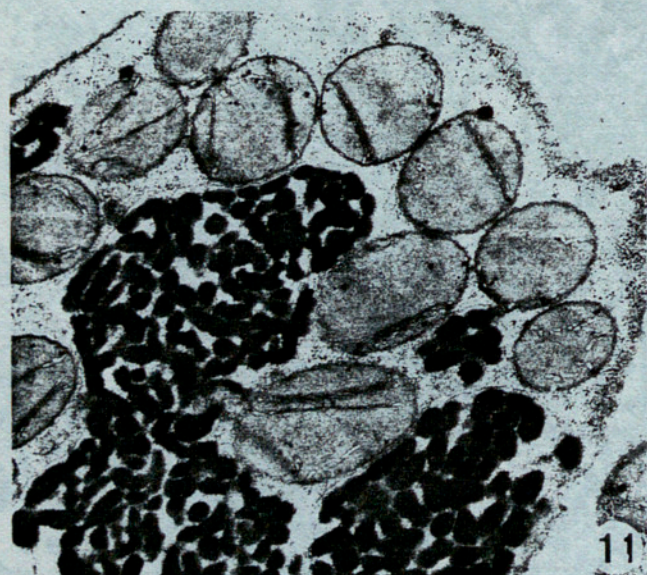
- Fig. 8. Puente obturado por varios sáculos de retículo endoplasmático. Obsérvese la forma arqueada que adoptan los sáculos a nivel de la zona central del puente. (30.240 x).
- Fig. 9. Ultraestructura de varias espermatidas jóvenes al inicio de la maduración. CR: Gránulos de cromatina condensada; M: Mitocondrias; N: Núcleo. (22.800 x).
- Fig.10. Zona proximal del testículo. Células vegetativas (Cv) rodeando a las espermatidas (SP) en distintas fases de maduración. SP": Espermatida abortiva fagocitada por las células vegetativas. (6.000 x).
- Fig.11. Detalle ultraestructural de las mitocondrias y de la cromatina nuclear de una espermatida (22.950 x).
- Fig.12. Ultraestructura de la membrana plasmática de las espermatidas. Obsérvese su configuración pentalaminar. (52.380 x).
- Fig.13. Aspecto de las espermatidas a nivel del conducto deferente. (10.800 x).
- Fig.14. Ultraestructura de un espermatozoide maduro en el interior del espermatóforo. CR: Gránulos de cromatina condensada; GL: Glycocalyx adosado a la cara externa de la membrana celular pentalaminar (flechas). (32.000 x).



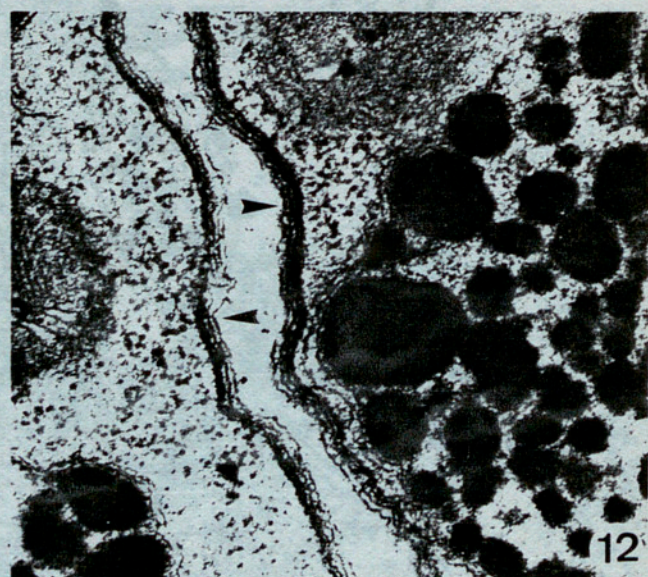




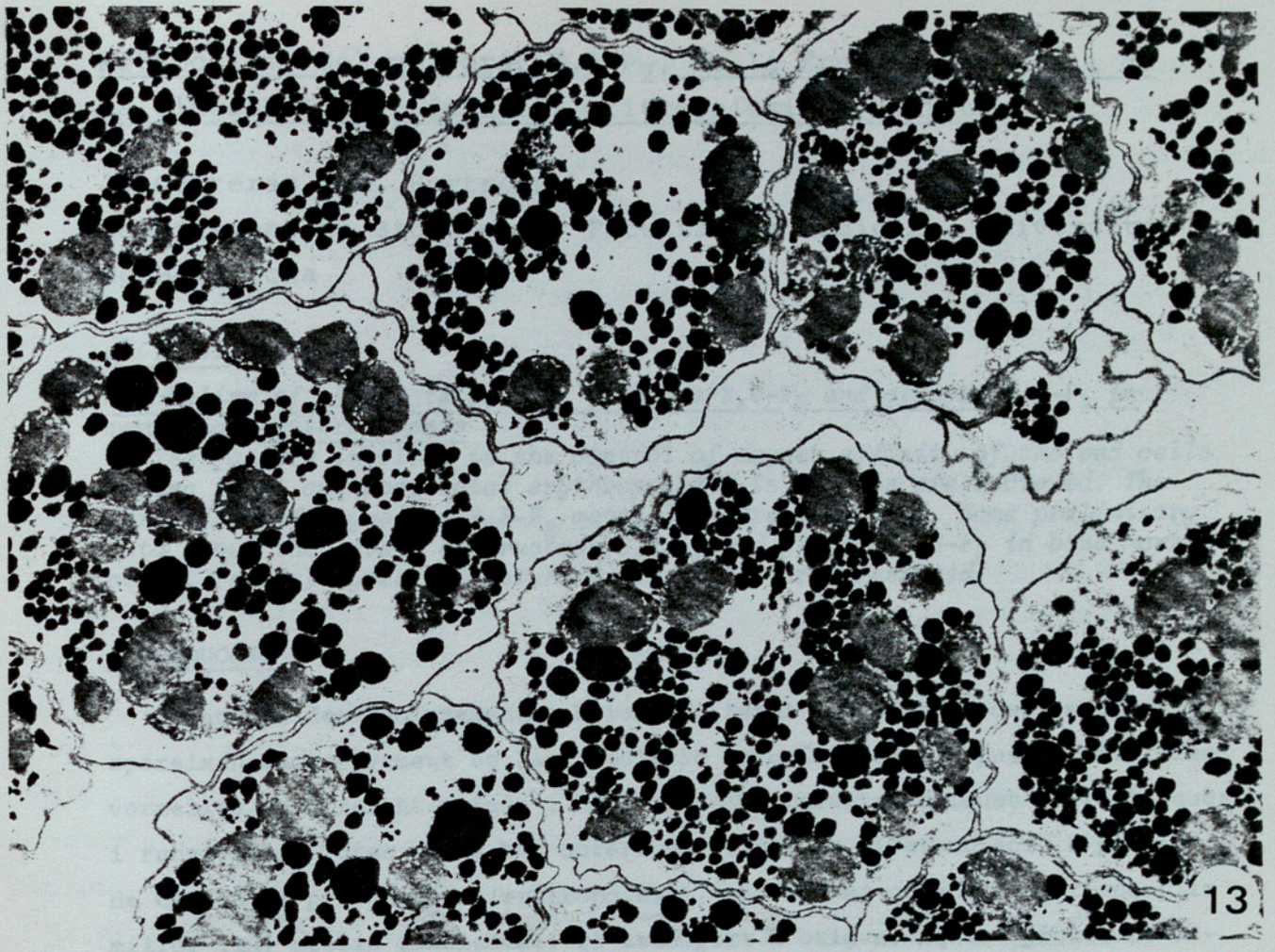
10



11



12



13



14