

L'ESPERMIOGÈNESI DE *TYPHLOPLANA VIRIDATA* (TURBELLARIA, NEORHABDOCOELA) A NIVELL ULTRASTRUCTURAL *

Comunicació presentada el dia 18 de maig de 1978

per

**ROBERT BARGALLÓ, JORDI LÓPEZ-CAMPS,
RAMON FONTARNAU, MERCÈ DURFORT I MARIA GRÀCIA BOZZO**

Servei de Microscòpia Electrònica, Universitat de Barcelona

SUMMARY

The spermiogenesis of Typhloplana viridata shows several peculiar features. The germinal cell, which is almost round, extends until it forms a long slender mature sperm ($0,5 \times 120 \mu$). At 10μ from the caudal end, two flagella are orthogonally inserted. The chromatin evolves from a granular-alveolar phase (for the young spermatids) to very compact chromosomic ribbons (for spermatozoa). The chondriome modifies very little giving an axial rosary of small mitochondria. A large dictyosome forms a great number of dense vesicles which spray through the whole of the sperm's body around the nucleus. Notwithstanding our speculations, the function of these vesicles is not known. The caudal appendage is a singular postflagellar organ formed by evagination into which the prolongation of a bundle of cortical microtubules lining the cell enter. In this paper, relationships with ultrastructural data of flatworm gamma meta are made and philogenetic considerations are reported.

INTRODUCCIÓ

Les formes espermàtiques dels Platihelminths són notablement modificades, no sols pel fet d'ésser cèl·lules biflagel·lades i per mancar-les-hi l'acrosoma, sinó també pel fet de presentar importants particularitats ultraestructurals que, fins i tot, comporten modificacions de caràcter regressiu. Paradoxalment, la morfologia d'aquests gàmetes masculins presenta poca variabilitat al llarg de tot el «phylum» i fluctua al voltant d'uns pocs models generals, tots els quals estan interrelacionats. D'altra banda, és palesa l'escassetat de referències que, a nivell ultraestructural, fan esment dels espermatozoides dels cucs plans.

* Aquest treball forma part del projecte d'estudis gametogenètics patrocinat per la «Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica» de la «Presidencia del Gobierno», Madrid.

Per tots aquests motius vàrem incloure el grup dins el pla general d'estudis gametogenètics que portem a terme conjuntament el Servei de Microscòpia Electrònica i el Departament de Morfologia i Microscòpia de la Universitat de Barcelona.

La raó d'haver començat pels Typhloplanidae és que, a nivell de microscopi ordinari⁵, llurs espermatozoides són els menys modificats, tot i tenir, sens dubte, trets diferencials característics.

T. viridata és un petit turbellari d'1-3 mm de llargada que presenta un color verd intens degut a la presència d'algues simbiotes (*Chlorella*) situades, en gran nombre, al parènquima subepidèrmic. A més, es caracteritza també per: No tenir rabdites ni ramnites. El tub digestiu és senzill, sacciforme i sense ramificar. Viu en bassals continentals o en rierols petits, tant al plàncton com al hiponèuston i a l'herpon, a temperatures compreses entre -5 i 18 °C i a pH de 6,8 a 7,5.

Quant a la reproducció, *T. viridata* és un organisme hermafrodita proteràndric. L'aparell reproductor mascle és format per dues llargues branques testiculars que, unides per sengles conductes espermàtics condueixen llurs productes sexuals a una sola vesícula seminal i a un penis complex.

MATERIAL I MÈTODES

El material va ésser proporcionat pels senyors F. COSTA i L. UGEDO, del Departament d'Ecologia de la Universitat de Barcelona, als quals regraciem llur amable col·laboració. Els espècimens procedeixen d'una bassa propera a Sant Martí del Brull i també d'uns bassals del terme d'Olesa de Bonesvalls.

Els organismes varen ser anestesiats amb MS 222 (Sandoz) a l'1 % durant 15 minuts i submergits en el medi fixador, seccionats transversalment en 2, 3 o 4 parts en raó de la petitesa dels animals.

Les observacions al microscopi ordinari es feren emprant la tècnica del «squash» per a l'estudi dels gàmetes «in vivo» i la de talls semifins (d'1 a 2 μ) tenyits amb blau de metilè-bòrax a l'1% per als estudis citològics i histològics.

La metodologia escollida no difereix essencialment de la típica per a microscòpia electrònica actual; per aquest motiu la resumim així:

1. Fixació amb glutaraldèhid al 2,5 % en tampó cacodilat al 0,1 M a pH 7,1 durant 1 hora 30 minuts a 4 °C.
2. Rentat en tampó cacodilat al 0,1 M (pH 7,1) amb 5 % de glucosa durant 30 minuts a temperatura ambient.

3. Fixació amb OsO_4 a l'1 % en la solució anterior durant 1 hora 30 minuts.
4. Rentat, deshidratació ràpida amb etanol i inclusió en araldita.
5. Seccionament amb ultramicrotòtom Reichter OmU2.
6. Contrastat amb acetat d'uranil i amb citrat de plom.
7. Observacions amb els microscopis electrònics Philips EM200 i EM301.

OBSERVACIONS

Microscòpia fotònica

L'espermatozoide madur és una cèhula llarga de 120 μ i de 0,5 μ de gruix, d'aspecte fusiforme i rígid. Presenta un segment caudal d'unes 10 μ de llarg lleugerament més prim que la resta del gàmeta. El cos cellular és recorregut longitudinalment per una estructura fibrosa que mostra una torsió patent. Hi ha 2 flagels implantats justament entre el cos cellular i l'extrem caudal. No s'observa la presència d'acrosoma ni de cap altra estructura similar.

El moviment flagellar és molt lent i els espermatozoides dels conductes deferents quasi no es desplacen.

Microscòpia electrònica

Hom pot reconèixer 4 tipus d'espermàtida perfectament diferenciats, tant per llur estructura general com per llur corespondència amb fases nucleals concretes. No obstant, les espermàtides tenen el tret comú d'estar unides sincicialment per mitjà de ponts plasmàtics notables.

Les *espermàtides més joves* (I) ja són bastant diferenciades. El nucli, en posició polar, és més o menys esfèric amb una cromatina d'aspecte alveolar (fig. 1). L'aparell de Golgi té una aparença que és típica en tot el procés espermiogenètic; en efecte, és voluminós i format per gran quantitat de sàculs molt pròxims, els quals, en determinats sectors, es densifiquen intensament (fig. 2). Aquests sàculs semblen originar unes *vesícules denses* de 0,3 μ de diàmetre formades per una membrana fonamental que inclou una substància granular clara i un «nucli» esfèric i excèntric molt dens. Les esmentades unitats que, en gran nombre es difonen per tot el recinte plasmàtic, proliferen durant l'espermioquèsi. El condrioma és compost per petites mitocondries disseminades pel citoplasma. Entre el nucli i la membrana plasmàtica més distal es localitza una renglera de microtúbuls disposats molt junts en un sol pla (fig. 1).

A les *espermàtides joves* (II) s'inicia l'allargament cel·lular que comença pel citoplasma i, de moment, deixa intacte el nucli que sembla com evaginar-se del gàmeta (fig. 3). Aquest orgànul manté la cromatina com a l'estadi anterior.

El caràcter més manifest de la fase II és la formació molt ràpida del complex caudal constituït pels dos flagels i per una prolongació estreta, llarga i distal anomenada *apèndix caudal* que es mantindrà pràcticament intacta durant la resta de l'espermioquèsi i en l'espermatozoide (figs. 3 i 4). Aquest apèndix és format per una evaginació plasmàtica reforçada internament per una densificació en forma de cilindre buit i una altra plana en disposició diametral. Entre la densificació cilíndrica i la membrana unitària, i també a cada banda de la diametral, hi ha sengles rengleres de microtúbuls col·locats molt pròxims i amb una torsió longitudinal més o menys helicoidal (fig. 5).

Aquests microtúbuls són connectats a un element en forma de tascó que presenta diverses làmines denses i a cada costat d'aquell s'ubiquen els corpuscles basals flagel·lars (fig. 8). En efecte, els flagels són implantats oposadament un a cada banda de la zona de transició del cos cel·lular amb l'apèndix caudal. Els corpuscles basals són obturats i presenten lateralment una sèrie de bandes denses que recorden un arrel ciliar rudimentària. El nucli esdevé cònic en el sector caudal i el vèrtex del con coincideix precisament amb aquesta complicada zona.

Els dos flagels tenen un axonema de composició 9+1 (fig. 6), però amb la salvetat de que l'element central no és un microtúbul sinó una densificació d'uns 170 Å de gruix. Al voltant d'aquest element, en secció transversal, s'observa una estructura en forma d'estrella de 9 puntes. En conseqüència, poden distingir-se tres zones en el complex axial: l'apical, la intermèdia i la cortical. En seccions longitudinals (fig. 7) hom observa que la beina central o zona cortical (que mesura 430 Å de diàmetre) sembla estar composta per dos cordons de 150 Å de gruix mitjanament denses, disposats en sengles hèlices defasades 180° i amb un període d'uns 950 Å. També es defineixen clarament els radis axonemàtics. Els braços de les subfibres A de les fibres perifèriques semblen ésser tres: dos en direcció a la subfibra B de la fibra immediata, com és habitual a la gran majoria d'axonemes, i un tercer que quasi connecta l'esmentada subfibra A amb la membrana flagel·lar per la zona més propera.

Les *espermàtides mitjanes* (III) es caracteritzen per l'allargament del nucli dins la invaginació formada en l'estadi precedent (fig. 9). La cromatina es disposa en filaments longitudinals molt notables. Al mateix temps, s'observa l'inici d'un embolcall de *microtúbuls corticals*⁸ que s'estén al llarg de la cèl·lula, immediatament sota la mem-

brana plasmàtica. Segueix la proliferació de vesícules denses per tot el citoplasma, exceptuant la zona ocupada pel nucli.

Les *espermàtides madures* (IV) tenen ja una gran longitud i el nucli s'estén per quasi tota la cèl·lula, havent-se aprimat prou com per a permetre que les vesícules nucleades se situin entre ell i l'embolcall microtubular (fig. 10). Els filaments cromatínics són ara molt compactes.

Els *espermatozoides* són cèl·lules ja lliures, molt llargues i estretes. El nucli és més gruixut a la part anterior i cap l'extrem posterior es fa progressivament més prim. En les seccions més cefàliques (fig. 11) s'observa, de fora a dintre, la membrana cel·lular, una sola renglera de microtúbuls corticals compacta i disposada en hèlix de gran pas, la membrana nuclear i el recinte del nucli ple de cromatina laminar formant curioses imatges que recorden, a vegades, les empremtes digitals. A nivells mitjans (fig. 12), a més dels elements citats, es veuen mitocondries petites, normals i situades centralment; posant-se, per tant, en una renglera paral·lela a l'eix principal. Les vesícules denses continuen essent notables. A nivells caudals (fig. 13) el nucli és molt prim i la cromatina encara és més compacta. A les seccions longitudinals de les porcions mitjanes dels espermatozoides (fig. 14), les vesícules denses es mostren amb una gran compacitat, puix es posen en contacte tan estret que esdevenen polièdriques.

DISCUSSIÓ

La conformació del contingut nuclear dels gàmetes de *T. viridata* travessa una sèrie de fases notablement diverses. És sorprenent que, malgrat aquesta complicació, la cromatina de l'espermatozoide madur no sigui completament condensada. Això també ha estat observat en altres turbellaris policlàdids per HENDELBERG (1975), el qual autor en descriu, tanmateix, l'helicoïdització dels filaments cromatínics. En el cas de *Typhloplana* pensem que la disposició helicoïdal de la cromatina perd notorietat davant la condensació lateral dels seus filaments, la qual dóna lloc a cintes de dimensions considerables (fig. 11) i a imatges transversals ben curioses (fig. 12).

El condrioma es disposa, de preferència, prop del nucli i, tot essent format per mitocondries petites, aquestes són moltes. HENDELBERG (1975) atorga a aquesta disposició una major facilitat per a l'ondulació del gàmeta de *Cryptocelides loveni*. Aquesta cèl·lula necessita l'esmentada facilitat per tenir els 2 flagels fermament adherits a tot el llarg del cos. No obstant, en les nostres observacions de l'espermatozoide de *T. viridata* no sembla que el cos cel·lular pugui tenir un moviment ondulatori continuat. El cert és que en un gàmeta molt modificat i complex, el condrioma mostra una senzillesa sorprenent.

La producció de vesícules denses a partir dels sàculs golgians especialment modificats és un fenomen interessant, si més no, per la gran repetició d'aquests elements. Cada unitat recorda, per la seva forma i el seu origen, una vesícula proacrosòmica amb el seu grànul preminentment dens i acèntric. Això mateix va fer notar HENDELBERG (1975) a propòsit dels espermatozoides dels policlads. Nosaltres afegim que la gran producció d'aquestes vesícules, juntament amb un aparell de Golgi molt desenvolupat i particular, fa pensar en intents repetits, per infructuosos, de formar l'acrosoma. Aquest fet, al costat de les dades de BURTON (1967)⁸ segons les quals els tremàtodes, presumptes derivat filogenèticament dels neorabdòcels, tenen espermatozoides que fertilitzen lateralment els corresponents oòcits, pot ésser un punt de partença per a aprofundir sobre aquest tema. No hi ha dubte, per altra banda, de la importància de les consideracions filogenètiques que de tot això es podria treure.

L'axonema presenta una beina molt semblant a la trobada per THOMAS (1975) a *Stylochus zebra* o per SILVEIRA (1974) a diferents turbel·laris. Coincidint amb aquestes dues autores, pensem que es tracta d'un element central envoltat helicoïdalment per dos complexos fibrosos. THOMAS (1975), emprant una tècnica de digestió enzimàtica, demostrà que cada un dels elements helicoïdals de la beina exonemàtica és constituït per un grup de 4 fibretes, 2 de gruixudes al mig de 2 de més fines disposades helicoïdalment a la superfície d'un cilindre de substància mitjanament densa. Les nostres observacions no permeten de corroborar aquestes dades, però corresponen amb la descripció general de SILVEIRA (1974).

La presència de tres braços per cada subfibra A de l'axonema també ha estat detectada per SILVEIRA (1974) a *Geobia subterranea* amb una disposició molt comparable a la trobada a *T. viridata*.

El que nosaltres no hem observat és la presència de β -glucogen als axonemes, com trobà l'esmentada autora¹⁰ a l'espermatozoide de *Geoplana* i de *Dugesia*.

Els microtúbuls corticals ja són prou coneguts per diferents treballs sobre espermatozoides de cucs plans^{1, 3, 4, 8, 12}, però aquí atribuïm l'origen del complex a la renglera microtubular que ja s'insinua a les espermàtides més joves entre nucli i membrana plasmàtica.

Tampoc no s'han pogut trobar els elements denses que, segons SILVEIRA (1974), connecten els microtúbuls contigus de les regions del cos cel·lular més allunyades dels axonemes. Podem concloure que a *T. viridata* no n'hi ha.

L'apèndix caudal és un òrgan que probablement confereix direccionalitat al moviment de l'espermatozoide i donada la densa disposició dels nombrosos microtúbuls i el petit diàmetre de l'òrgan, pro-

porciona una rigidesa adequada a una zona de la cèl·lula on s'apliquen les forces del batec flagel·lar.

La zona d'inserció dels axonemes té una complexitat manifesta que recorda una implantació ciliar més que no pas flagel·lar. En efecte, els centríols obturats i les plaques denses que els acompanyen són més pròpies d'algunes cèl·lules ciliades.

Comparant els processos espermiogènètics a nivell de microscòpia fotònica dels diferents cucs plans, hom veu que l'espermatozoide de *T. viridata* es forma per simple allargament de l'espermàtida jove. En canvi, en altres grups com els Acels, d'una espermàtida jove comparable a la aquí descrita es passa a una espermàtida madura que dirigeix els flagels en sentit cefàlic i aquests s'adhereixen a tot el llarg del cos cel·lular. D'aquesta manera els flagels dels espermatozoides dels Acels i de molts altres cucs plans perden llur independència del protoplasma.

D'això es pot derivar que *T. viridata* té un espermatozoide de model més primitiu que la resta de Plathelminths, puix als altres grups del «phylum» incloent-hi molts trematodes i cèstodes, els flagels han sofert una modificació que considerem de caire regressiu.

L'existència d'espermatozoides d'axonema 9+2 en certs acels sembla una resta del tipus que podria ser l'original, donat que aquests mateixos axonemes tenen una composició 9+0 en la part proximal¹.

Als trematodes i cèstodes, el nombre de flagels originari és de dos i HENDELBERG (1970) considera que, si a vegades n'hi ha un de sol, ho és per reducció. També aquest mateix autor⁸, ha trobat turbellaris amb un sol flagel, però en aquest cas es tracta d'organismes paràsits.

Per tant, i d'acord amb HENDELBERG^{7,8}, sembla adient concloure, des d'un punt de vista filogenètic, que l'espermatozoide del *platihelminth arquetípic* seria una cèl·lula biflagel·lada. Nosaltres hi afegim que tindria axonemes amb dos microtúbuls centrals (9+2). A partir d'aquest model, les exigències dels models de fertilització dels platihelminths han produït un ventall de formes espermiogèniques relativament reduït puix que malgrat ésser gàmetes complexes, la diversificació és escassa a tot el llarg del «phylum».

RESUM

L'espermiogènesi de *Typhloplana viridata* presenta una sèrie de caràcters peculiars. La cèl·lula germinal, que és pràcticament rodona, s'estira fins donar un espermatozoide madur, prim i llarg ($0,5 \mu \times 120 \mu$). A 10μ de l'extrem caudal s'insereixen ortogonalment els 2 flagels de gàmeta. La cromatina passa d'una fase grànulo-alveolar (per a les espermàtides joves) a una disposició en cintes cromosòmiques molt com-

pactes (per als espermatozoides). El condrioma es modifica molt poc donant un rosari axial de mitocondries petites. Un enorme dictiosoma genera moltes vesícules denses que es distribueixen per tot el cos de l'espermatozoide al voltant del nucli. Malgrat les nostres especulacions, la funció d'aquestes vesícules ens és desconeguda. L'apèndix caudal és un òrgan post-flagellar estrany format per una evaginació en la qual entra la prolongació de l'embolcall dels microtúbuls corticals que entapissen interiorment la cèl·lula. Es fan comparacions amb dades ultraestructurals d'altres gàmetes de cucs plans i se'n treuen consideracions filogenètiques.

BIBLIOGRAFIA

1. BEDINI, C. i PAPI, F. — *Peculiar patterns of microtubular organization in spermatozoa of lower Turbellaria*. A: «Comparative Spermatology», Baccetti, B., Ed., «Academic Press», N. Y. and London 363-366 (1970).
2. HENDELBERG, J. — *Paired flagella and nucleus migration in the spermiogenesis of Dicrocoelium and Fasciola (Digenea, Trematoda)*. «Zool. Bidr. Uppsala», 35: 569-587 (1962).
3. HENDELBERG, J. — *On different types of spermatozoa in Polycladida, Turbellaria*. «Arkiv for Zoologi», 18: 267-304 (1965).
4. HENDELBERG, J. — *Flatworm spermiogenesis and spermatozoa studied by light and electron microscope methods*. «Acta Universitatis Uppsaliensis», 140: 1-12 (1969a.).
5. HENDELBERG, J. — *On the development of different types of spermatozoa from spermatids with two flagella in the Turbellaria with remarks on the ultrastructure of the flagella*. «Zool. Bidr. Uppsala», 38 (1):1-50 (1969b.).
6. HENDELBERG, J. — *On the number and ultrastructure of the flagella of flatworm spermatozoa*. A: «Comparative Spermatology», Baccetti, B. Ed., Academic Press, N. Y. and London, 267-374 (1970).
7. HENDELBERG, J. — *Spermiogenesis, sperm morphology, and biology of fertilization in the Turbellaria*. A: «Biology of the Turbellaria», Riser, N. W. and Morse, M. P., Eds. McGraw-Hill N. Y., 148-164 (1974).
Press, N. Y. and London 267-374 (1970).
8. HENDELBERG, J. — *Functional aspects of flatworm sperm morphology*. A: «The functional anatomy of the spermatozoon». Afzelius, B. A. Ed., Pergamon Press. Oxford and N. Y., 299-309 (1975).
9. LÓPEZ-CAMPS, J. i BARGALLÓ, R. — *El anoxema del gameto masculino de Typhloplana viridata (Turbellaria, Typhloplanidae)*. Actes «VII Reunión de la Soc. Esp. Microsc. Electr.», Córdoba, 32 (1976).
10. SILVEIRA, M. — *Intraaxonemal glycogen in 9+1 flagella of flatworm*. «J. Ultrastr. Res.», 44: 253-264 (1973).
11. SILVEIRA, M. — *The fine structure of 9+1 flagella in Turbellarian flatworms*. A: «The functional anatomy of the spermatozoon». Afzelius, B. A. Ed., Pergamon Press. Oxford and N. Y., 289-298 (1974).
12. THOMAS, M. B. — *The structure of the 9+1 axonemal core as revealed by treatment with trypsin*. «J. Ultrastr. Res.», 52: 409-422 (1975).

FIG. 1. — Espermatida molt jove. Observeu la renglera microtubular (fletxa) originària del complex helicoïdal de microtúbuls. Les vores del pont plasmàtic són indicades per asteriscs.

FIG. 2. — Aparell de Golgi d'una espermatida molt jove. Les densificacions marcades per la fletxa són les que originen les vesícules denses (v).

FIG. 3. — Espermatida jove en secció longitudinal mostrant l'apèndix caudal (ac). Vegeu la ubicació de: nucli (N), aparell de Golgi (G) i vesícules denses (v).

FIG. 4. — Detall de l'extrem caudal de la imatge anterior. La secció no interessa els flagels, però talla un dels corpuscles basals (cb) amb l'arrel corresponent. Hom pot veure l'estriació produïda pels microtúbuls arrenclerats (fletxa) a un costat del nucli (N).

FIG. 5. — Secció transversal de l'apèndix caudal mostrant les densificacions cilíndrica i plana amb llurs microtúbuls (mt).

FIG. 6. — Secció transversal d'un flagel. La fletxa assenyala els braços externs. També pot observar-se el complex axial. Els components axials tenen menys densitat electrònica que els microtúbuls i els braços.

FIG. 7. — Secció longitudinal d'un flagel (f) mostrant els dos cordons helicoïdals desfasats 180° (fletxes).

FIG. 8. — Secció obliqua de la zona d'implantació flagellar. El nucli (N) cònic és vorejat per alguns microtúbuls. El tall sols interessa l'apèndix caudal (ac) i una part del flagel (f). El corpuscle basal (cb) és complex (vegeu text) i sota d'aquest es veu el tascó dens (t).

FIG. 9. — Secció longitudinal d'una espermatida mitjana. El tall no passa pel complex caudal. La cromatina es disposa en filaments. Hi ha moltes vesícules denses (v).

FIG. 10. — Secció longitudinal d'una espermatida madura. La cromatina s'ha densificat encara més i els filaments s'uneixen donant cintes cromatíniques. El nucli (N) ha sofert un gran allargament. Les vesícules denses (v) es disposen al voltant del nucli.

FIG. 11. — Secció transversal d'un espermatozoide per una zona molt cefàlica. El protoplasma és ocupat pràcticament pels microtúbuls corticals (mt) força aparents i pel nucli que presenta la cromatina en forma de cintes.

FIG. 12. — Secció transversal d'un espermatozoide per un nivell mitjà. A més dels elements descrits a la figura anterior, hom veu algunes vesícules denses (v).

FIG. 13. — Secció transversal d'un espermatozoide per la zona caudal. El nucli (N) ha reduït la secció. Hi ha un element mitocondrial (M) ubicat centralment.

FIG. 14. — Secció longitudinal d'un espermatozoide que mostra un nucli prim i dens (N). Les vesícules denses (v) estan disposades de forma compacta.

ABREUJAMENTS

ac:	apèndix caudal
cb:	corpuscle basal
f:	flagel
G:	aparell de Golgi
M:	mitocòndria
mt:	microtúbuls
N:	nucli
t:	tascó dens
v:	vesícules denses