
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

FERNANDO DINI, PAOLO BRACCHI

Ciclo cellulare di *Aspidisca aculeata* (Ehrenberg)

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 60 (1976), n.1, p. 64–69.

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1976_8_60_1_64_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/>

Zoologia. — *Ciclo cellulare di Aspidisca aculeata (Ehrenberg).*
Nota di FERNANDO DINI e PAOLO BRACCHI (*), presentata (**) dal
Socio M. BENAZZI.

SUMMARY. — Under our experimental conditions (22-23 °C with plenty of food), the cell cycle of *Aspidisca aculeata*, stock Ge₁, lasts 9 hrs. The macronuclear phases G₁, S, G₂ and D occupy 58%, 34%, 3%, 5%, respectively, of the cell cycle. The micronuclear cycle is characterized by the absence of the G₂ phase as the S phase is followed immediately by the micronuclear division which precedes the macronuclear one. The length of micronuclear phases, G₁, S and D corresponds, respectively, to 87%, 5%, 8% of the cell cycle. When more micronuclei are present in the same cell, they divide asynchronously.

Nell'ambito di un'indagine sulla biologia di alcuni Ciliati Ipotrichi [11], [17] è stato analizzato il ciclo cellulare di un Aspidiscide.

I membri di questa famiglia [8], [10], fileticamente vicini agli Euplotidi, vivono sia in mare che in acqua dolce. Le aspidische marine, frequentemente reperibili in campioni di sabbia, sono difficilmente allevabili in laboratorio, difficoltà riscontrabile anche per quanto concerne le forme di acqua dolce.

Questo fatto può spiegare perchè specie del genere *Aspidisca* sono state studiate abbastanza bene dal punto di vista tassonomico [2], [3], [6], [12], [15], [19] e ecologico [4], [5], [15], mentre scarsa è la letteratura circa la loro biologia. Dal classico lavoro di Summers [23], in cui vengono descritti i fenomeni nucleari associati alla divisione cellulare, si passa a quelli morfogenetici di Tuffrau [24] e Deroux e Tuffrau [9] per finire al lavoro di Diller [10] sul comportamento nucleare e cambiamenti morfogenetici durante la divisione e la coniugazione. Niente è noto sul ciclo cellulare.

Nei Protozoi, come in tutti gli organismi unicellulari, il ciclo cellulare può essere considerato come la caratteristica principale della loro biologia e quindi ogni evento è correlabile a determinati suoi stati [7].

Il presente studio costituisce dunque la base per ulteriori e più approfondite ricerche biologiche in tale genere e fornisce elementi per una analisi comparativa fra Ipotrichi appartenenti a varie famiglie

MATERIALI E METODI

Le indagini sono state condotte sullo stock Ge₁ reperito in un campione di sabbia raccolto lungo le coste somale (località Gesira) il quale, tra gli otto isolati, è quello che ha dimostrato di adattarsi meglio e per un periodo di

(*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Zoologia e Anatomia comparata dell'Università di Pisa con un contributo del C.N.R. Gli Autori ringraziano il prof. P. Luporini per l'aiuto prestato nella raccolta degli animali durante un soggiorno presso il «Centro di Studio per la Faunistica ed Ecologia Tropicali del CNR».

(**) Nella seduta del 10 gennaio 1976.

tempo maggiore alle condizioni di laboratorio: gli animali, mantenuti a temperatura costante di 22-23 °C, venivano cibati giornalmente con *Dunaliella salina* coltivata in « Erd-Schreiber medium ».

L'apparato nucleare è stato studiato in cellule fissate in Sanfelice e colorate con Allume-Ematossilina Carazzi o con la reazione di Feulgen. Per gli esperimenti di marcatura si è usata timidina H³ (Radiochemical Centre Amersham, England) con attività specifica di 5 Ci/mM, diluita in acqua di mare fino alla concentrazione di 10 µCi/ml; i preparati autoradiografici sono stati eseguiti secondo la tecnica descritta da Luporini e Bracchi [16].

Si è calcolato il tempo di incorporazione della timidina H³ da parte delle cellule, misurando l'intervallo di tempo intercorrente tra l'aggiunta del marcatore radioattivo ad una coltura di *Aspidisca*, che proliferava asincronicamente, e la comparsa di bande di replicazione macronucleari marcate. Esso è risultato essere di circa 30 min.

Non essendo riusciti ad ottenere colture sincrone applicando le più comuni tecniche, la determinazione del ciclo macronucleare è stata effettuata utilizzando popolazioni asincrone in fase logaritmica di crescita. In tali popolazioni, secondo quanto descritto da Nachtwey e Cameron [18], è possibile convertire il numero di cellule in una qualsiasi fase del ciclo cellulare nella frazione di tempo di generazione spettante a quella fase, applicando un fattore di correzione che tenga conto del gradiente di età delle cellule nella popolazione.

RISULTATI

Morfologia.

Gli animali osservati *in vivo* con l'ausilio del microscopio interferenziale presentano le seguenti caratteristiche. Lunghezza totale del corpo 35-40 µm, massima larghezza 25-28 µm. Contorno cellulare laterale e posteriore largamente rotondeggiante, anteriormente più acuto con apice volto a sinistra. Mentre la superficie dorsale convessa è priva di ciglia, quella ventrale concava porta sette cirri frontoventrali, sei anali ed una cavità boccale spostata verso il margine sinistro dell'animale. La cavità orale si presenta costituita da due sezioni di diversa grandezza. Quella anteriore più piccola è provvista di 4 membranelle, la seconda molto più grande ne presenta 10-11. Gli animali sono spiccatamente tigmotattici.

L'apparato nucleare consiste di un macronucleo a forma di ferro di cavallo con una protuberanza anteriore e di un numero di micronuclei variabile da 1 a 4. In corrispondenza del lato destro dell'animale sono presenti da sei ad otto globuli sferici altamente rifrangenti. La restante parte del citoplasma si presenta ialina e trasparente.

Per tutte queste caratteristiche, gli animali dello stock Ge₁ possono essere ascritti alla specie *Aspidisca aculeata* (Ehrenberg).

Durata del ciclo cellulare.

Il tempo di generazione (intervallo compreso tra due divisioni cellulari successive) calcolato partendo da 20 animali in divisione provvisti di abbondante cibo, è risultato essere di circa 9^h (Media = $9,01 \pm 0,37$) a 22-23 °C.

Ciclo Macronucleare.

In *Aspidisca*, come in tutti gli Ipotrichi, il riconoscimento in preparati fissati e colorati di animali con macronucleo in G_1 , S, G_2 e fase divisoria (D) è estremamente semplice, date le caratteristiche tipiche presentate dal macronucleo in ciascuna fase del ciclo cellulare.

Dall'esame di 906 animali prelevati a caso da colture asincrone in fase logaritmica di crescita e preparati alla Feulgen, sono risultati essere 598 (66%) in G_1 , 254 (28%) in S, 18 (2%) in G_2 e 36 (4%) in D. Applicando il metodo precedentemente descritto [18, pag. 223, l.c.] si è ricavato che la durata delle diverse fasi macronucleari G_1 , S, G_2 e D (fig. 1) corrisponde rispettivamente a circa il 58%, 34%, 3%, 5% della durata dell'intero ciclo.

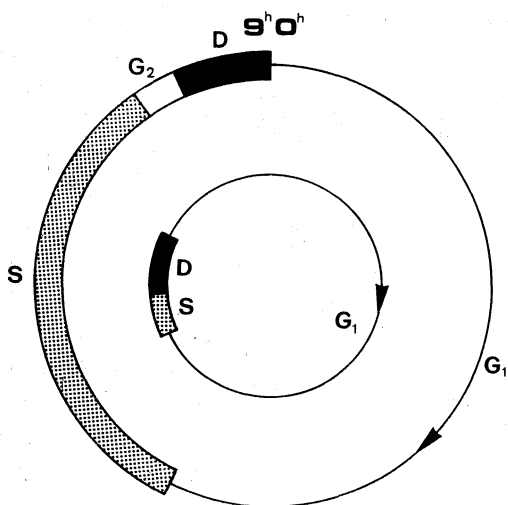


Fig. 1. - Diagramma del ciclo cellulare di *Aspidisca aculeata* (Ehrenberg). Il ciclo procede in senso orario. Il cerchio più esterno si riferisce al ciclo macronucleare, il più interno a quello micronucleare.

L'estrema brevità della fase G_2 è stata confermata applicando il metodo descritto da Prescott e Stone [21], secondo cui, somministrando timidina H^3 ad una popolazione asincrona di cellule in fase logaritmica di crescita e prelevandone campioni ad intervalli frequenti per l'analisi autoradiografica, il valore minimo dello G_2 è definito come l'intervallo di tempo compreso tra l'incorporazione del marcatore radioattivo e la comparsa di macronuclei marcati in divisione. Usando questo metodo sono state trovate *Aspidische* con macronucleo marcato in divisione (circa il 3%) dopo 15 min dall'inizio dell'incorporazione della timidina H^3 . Tale risultato concorda con quello ottenuto in precedenza circa la brevità della fase G_2 macronucleare.

Ciclo Micronucleare.

L'osservazione dei preparati autoradiografici allestiti per la determinazione del tempo di incorporazione della timidina H^3 , aveva messo in evidenza la presenza di micronuclei marcati solo in animali in cui le bande di replicazione macronucleari avevano percorso circa $1/3$ del loro percorso. Sulla base di questo reperto, singole popolazioni di 40-50 animali isolati in divisione, sono state sottoposte ad un « pulse » di timidina H^3 della durata di 30 min e fissate ad intervalli di 15 min. dalla 5° all'8° ora del ciclo cellulare. La 5° ora corrisponde all'inizio della fase S macronucleare. Dall'esame autoradiografico dei preparati si è potuto rilevare che la duplicazione dell'ADN micronucleare inizia alla 6° ora del ciclo cellulare e si completa in circa 30 min. La fase S è seguita immediatamente dalla divisione del micronucleo che richiede un tempo di circa 40 min. Nel ciclo micronucleare si succedono dunque le fasi G_1 , S e D (fig. 1), la cui durata corrisponde rispettivamente al 87 %, 5 %, 8 % della durata dell'intero ciclo.

La presenza, nelle suddette popolazioni, di animali plurimicronucleati ha permesso di rilevare come tutti i micronuclei presenti non replicano il loro ADN contemporaneamente; in tutti comunque la fase S si esaurisce entro circa l'8° ora del ciclo cellulare per cui la divisione del (i) micronucleo (i) precede sempre quella macronucleare (fig. 1).

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti indicano che, nelle condizioni in cui abbiamo operato, lo stock Ge_1 di *Aspidisca aculeata* presenta un tempo di generazione di 9^h . I cicli dei due tipi di nucleo (macro- e micronucleo) differiscono tra loro per quanto concerne la porzione di tempo di generazione spettante alle rispettive fasi. Infatti nel ciclo macronucleare si succedono le fasi G_1 , S, G_2 e D la cui durata corrisponde rispettivamente a circa il 58 %, 34 %, 3 % e 5 % della durata del ciclo cellulare; nel ciclo micronucleare manca uno G_2 , mentre a ciascuna delle restanti fasi G_1 , S e D spetta rispettivamente circa l'87 %, 5 % e 8 % del tempo di generazione. Risulta quindi: a) che non vi è sincronia tra il ciclo macro- e micronucleare sia per quanto concerne l'inizio che la durata delle diverse fasi; b) mentre la divisione macronucleare coincide con la citodieresi, quella micronucleare le precede entrambi; c) e inoltre quando nella stessa cellula sono presenti più micronuclei questi svolgono il loro ciclo in maniera asincrona.

Il ciclo di *Aspidisca* si allinea dunque con quelli già noti degli altri Ipotrichi [14], [1], [22], [11] essendo caratterizzato dall'assenza o estrema brevità della fase G_2 rispettivamente a livello del ciclo micro- e macronucleare. Da questa situazione unitaria si distacca *Euplotes*, unico genere il cui micronucleo, compiendo la fase S in telofase [20], trascorre la massima parte del suo ciclo in G_2 , manca cioè di una fase G_1 . In tutti gli altri generi studiati che,

con l'aggiunta di *Aspidisca*, coprono tutte le famiglie dell'ordine degli Ipotrichi, si riscontra dunque una elevata omogeneità dei cicli macro- e micronucleari, per cui si può considerare questa omogeneità di ciclo come un carattere distintivo dell'ordine.

BIBLIOGRAFIA

- [1] D. AMMERMANN (1970) - *The micronucleus of the ciliate Stylonychia mytilus; its acid synthesis and its function*, « Exp. Cell. Res. », 61, 6-12.
- [2] A. C. BORROR (1965) - *New and little-known tidal marsh ciliates*. « Trans. Amer. Microsc. Soc. », 84, 550-565.
- [3] A. C. BORROR (1972) - *Revision of the order Hypotrichida (Ciliophora, Protozoa)*, « J. Protozool. », 19, 1-23.
- [4] T. J. BROWN (1966) - *Observation on the morphology and reproduction of Aspidisca cicada*, « N.Z.J. Sci. », 9, 65-76.
- [5] T. J. BROWN (1967) - *Utilization of four sugar known to occur in activated sludge by Aspidisca cicada*, « J. Protozool. », 14, 340-344.
- [6] I. V. BURKOVSKY (1970) - *The ciliates of the mesopsanmon of the Kandalaksha Gulf (White Sea)*, « Acta Protozool. », 7, 475-489.
- [7] G. CLEFMANN (1974) - *The cell cycle*. In de Puytorac, Grain J., Eds. *Actualités Protozoologiques*, Université de Clermont, Clermont-Ferrand, 1, 315-324.
- [8] J. O. CORLISS (1961) - *The ciliated Protozoa: Characterization of the principal groups*. Pergamon Press, Inc. New York 169 pp.
- [9] G. DEROUX e M. TUFFRAU (1965) - *Aspidisca orthopogon n. sp., révision de certains mecanismes de la morphogénèse à l'aide d'une modification de la technique au Protargol*, « Cah. Biol. Mar. », 6, 293-310.
- [10] W. F. DILLER (1975) - *Nuclear behavior and morphogenetic changes in fission and conjugation of Aspidisca costata (Dujardin)*, « J. Protozool. », 22, 221-229.
- [11] F. DINI, P. BRACCHI e P. LUPORINI - *Cellular cycle in two ciliate hypotrichs*, « Acta Protozool. », in press.
- [12] J. DRAGESCO (1954) - *Diagnoses préliminaires de quelques Ciliés nouveaux des sables*, « Bull. Soc. Zool. France », 79, 62-70.
- [13] A. HAMM (1964) - *Untersuchungen über die Ökologie und Variabilität von Aspidisca costata (Hypotricha) in Belebtschlamm*, « Arch. Hydrobiol. », 60, 286-339.
- [14] M. JERKA-DZIADOSZ e J. FRANKEL (1970) - *The control of DNA synthesis in macronuclei of a hypotrich ciliate: a comparison of normal and regenerating cells*, « J. Exp. Zool. », 173, 1-21.
- [15] A. KAHL (1932) - *Urtiere oder Protozoa I: Wimpertiere oder Ciliata (Infusoria)*. In Dahl F., Ed., *Die Tierwelt Deutschlands*, Teil 25, 399-650.
- [16] P. LUPORINI e P. BRACCHI (1973) - *Micronuclear behavior in the life cycle of a plurimicronucleate strain of Euplotes crassus (Dujardin) (Ciliata Hypotrichida)*, « Mon. Zool. Ital. (N.S.) », 7, 71-85.
- [17] P. LUPORINI e F. DINI (1975) - *Relationships between cell cycle and conjugation in 3 Hypotrichs*, « J. Protozool. », 22, 541-544.
- [18] D. S. NACHTWEY e I. L. CAMERON (1968) - *Cell cycle analysis*. In Prescott D.M., Ed., *Methods in Cell Physiology*, Academic Press, New York and London 3, 213-259.
- [19] H. PLOUGH (1916) - *The genus Aspidisca Ehrenberg*, « Trans. Amer. Microsc. Soc. », 35, 233-244.
- [20] D. M. PRESCOTT, R. F. KIMBALL e R. F. CARRIER (1962) - *Comparison between the timing of micronuclear and macronuclear DNA synthesis in Euplotes eurystomus*, « J. Cell Biol. », 13, 175-176.

-
- [21] D. M. PRESCOTT e G. E. STONE (1967) - *Replication and function of the protozoan nucleus*. In Chen T. T., Ed., *Research in Protozoology*, Pergamon Press, N. Y., 2, 117-146.
- [22] A. RUTHMANN (1972) - *Division and formation of the macronuclei of Keronopsis rubra*, « J. Protozool. », 19, 661-666.
- [23] F. M. SUMMERS (1935) - *The division and reorganization of the macronuclei of Aspidisca lynceus Müller, Diophrys appendiculata Stein, and Stylonychia pustulata Ehrbg.* « Arch. Protistenk. », 85, 173-208.
- [24] M. TUFFRAU (1964) - *La morphogénèse de bipartition et les structures neuromotrices dans le genre Aspidisca (Ciliés hypotriches)*. *Revue de quelques espèces*, « Cah. Biol. Mar. », 5, 173-179.