

Paolo Pizzolongo

**Sulla ultrastruttura dei caulicini di *Cuscuta pentagona* Engelm.
nello stadio di vita preparassitaria**

INTRODUZIONE

Nel 1963, in un lavoro sulla *Cuscuta pentagona* Engelm., mi ripromisi di studiare al microscopio elettronico l'ultrastruttura di questa interessante pianta parassita. Servendomi delle attrezzature esistenti nell'Istituto Botanico di Portici iniziai nell'anno successivo le relative ricerche che ebbi occasione di portare a termine nell'autunno scorso presso il Whitman Laboratory di Chicago, diretto dal Prof. H. SWIFT, dove mi recai con un contributo del CNR.

Per quanto mi consta, dell'ultrastruttura delle specie di *Cuscuta* si sono occupati soltanto BONNEVILLE e VOELLER (1963) e LAUDI (1964). I primi hanno descritto, nelle cellule austoriali di *Cuscuta campestris*, oltre al reticolo endoplasmico, ai mitocondri ed ai dittiosomi, un nuovo componente cellulare con probabile funzione secretiva; LAUDI ha esaminato l'ultrastruttura cellulare nei tessuti corticali caulinari di plantule di *Cuscuta australis* appena germinate e dopo sei giorni dalla germinazione; oltre al normale corredo di organuli citoplasmatici egli ha rilevato la presenza di plastidi con voluminosi granuli di amido che, possedendo sempre alcuni grani ben differenziati, composti da due soli dischi, sono stati considerati dall'Autore come cloroplasti molto primitivi; l'inverdimento delle plantule più adulte sarebbe accompagnato dall'aumento, nei plastidi, del numero e della lunghezza dei grani. LAUDI ha ammesso inoltre la possibilità che si formino in *Cuscuta* cloroplasti più evoluti, avendo osservato in tessuti teratologici della stessa specie grani con un numero maggiore di dischi e sviluppo di lamelle stromatiche congiungenti dischi di grani differenti.

Io mi sono proposto di studiare l'ultrastruttura delle cellule di *Cuscuta pentagona* nei diversi stadi del suo ciclo biologico e nelle condizioni di autoparassitismo.

Nel presente lavoro comunico quanto ho notato in plantule nello stadio di vita preparassitaria; in un prossimo lavoro illustrerò i risultati delle osservazioni sulla ultrastruttura degli austori e sulla modalità della loro penetrazione.

E' noto che dai semi di *Cuscuta* si sviluppano plantule in forma di semplici filamenti costituiti da due porzioni: una superiore gialla-arancio o gialla-verdastra ed una inferiore, priva di pigmento con l'estremità rigonfia (fig. 1), talora in forma di ventosa (FRITSCHÉ et al., 1959-60), adibita probabil-

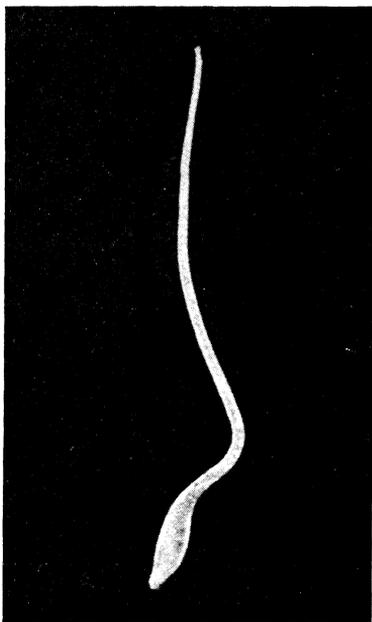


Fig. 1 — Plantula di *Cuscuta pentagona* Engel.

mente all'assorbimento e al trasporto dell'acqua. Solo la parte pigmentata è capace di emettere austori mentre la parte inferiore è destinata a seccarsi progressivamente. In queste plantule quindi tutte le funzioni vitali sembrano localizzarsi nel breve tratto pigmentato il cui studio si è mostrato particolarmente interessante.

MATERIALE E METODO

Tutto il materiale osservato è stato ottenuto da semi di *Cuscuta pentagona* raccolti nella zona di Mondragone (Napoli) nell'estate del 1964 e 1965. I semi sono stati messi a germinare su carta bibula imbevuta di acqua nel novembre '65, alla temperatura di circa 22°C ed alla luce solare. Le plantule da essi sviluppatesi sono state prelevate e fissate in tempi successivi, dall'età di 3-4 giorni fino all'età di 14-15 giorni. Le plantule più giovani da me esaminate avevano una lunghezza media di 3 cm e mostravano ancora la porzione superiore del caule piegata ad uncino; la loro colorazione era generalmente gialla-arancione. Le plantule più adulte erano invece lunghe in media 8-10 cm e la porzione pigmentata del caule era di un colore tendente al verde. Esse si sono accresciute in condizioni di luminosità non ideali per il cielo quasi sempre nuvoloso e per la breve durata del giorno; in natura infatti i semi di questa specie germinano verso maggio sulla spiaggia completamente esposta ai raggi del sole.

Le porzioni pigmentate dei caulicini sono state fissate per 1 ora in aldeide glutarica e successivamente per 1 ora in OsO₄ in tampone fosfato (0,5 M) a pH 7,4. La disidratazione è stata fatta nella serie degli alcoli ed infine i pezzi sono stati inclusi in Epon 812.

Le sezioni fatte con l'ultramicrotomo Porter-Blum sono state colorate per 1 ora con acetato di uranile e talora con citrato di piombo. Per le osservazioni ho usato sia il microscopio elettronico R.C.A. EMU 3 C, sia il Siemens Elmiskop.

RISULTATI

Le parti pigmentate delle plantule di circa 3-4 giorni di età si mostrano, nelle sezioni osservate al microscopio elettronico, particolarmente ricche di plastidi contenenti granuli di amido molto voluminosi. Ciò si vede chiaramente nella fotografia della Tav. I dove tra i granuli di amido, a contatto tra loro, si pos-

sono notare esili aree stromatiche residue. Numerosi sono i mitocondri (M) di forma varia e con le creste visibilmente rigonfiate dal fissativo; altrettanto numerosi appaiono gli sferosomi (S) mentre sporadici sono i dittiosomi (D); particolarmente abbondanti nel citoplasma si presentano i ribosomi (R) molto spesso riuniti in gruppi a costituire i poliribosomi o polisomi.

In una plantula di circa una settimana di età ho trovato, sempre nella porzione pigmentata del caule, strutture particolari che ho riportato nella Tav. II. Sebbene la sezione sia piuttosto doppia e quindi la fotografia non sia riuscita bene, essa si presta ad un confronto con la fig. 3 riportata nel lavoro di BONNEVILLE e VOELLER (1963). Questi Autori ritengono che in *Cuscuta campestris* le cellule in via di differenziazione in austori abbiano un aspetto particolare in quanto in esse si formerebbero « componenti cellulari » nuovi, non trovati in nessuna altra pianta, costituiti da una pila di sacculi appiattiti, a forma di scodella (bowl-shaped), in stretto rapporto con vescicole talora di considerevoli dimensioni e dall'aspetto di vacuoli. Tali componenti cellulari, simili all'apparato del Golgi, potrebbero essere una sorgente di secrezioni enzimatiche ed essere interessati nell'assorbimento della membrana cellulare della pianta ospite. Le formazioni vacuolari trovate da me (Tav. II) sono molto simili a quelle riportate da BONNEVILLE e VOELLER e mostrano lo stesso contenuto granulare osmiofilo; esse inoltre sono spesso associate a strane strutture citoplasmatiche a forma di anello; potrebbe essere questo un inizio di formazione dei « componenti cellulari » descritti dai due Autori citati e la cellula in questione potrebbe essere destinata a differenziarsi in cellula austoriale.

Nelle plantule più adulte, di circa 15 giorni di età, la struttura della parte pigmentata dei caulicini, nella loro porzione corticale, è alquanto diversa soprattutto per l'evoluzione subita dai plastidi. Alcuni di essi contengono grossi granuli di amido, altri ne sono quasi sprovvisti per cui è bene visibile la struttura stomatica plastidiale. Nei plastidi che si vanno nettamente differenziando in cloroplasti si nota chiaramente, oltre alla doppia membranella delimitante, di cui quella interna spesso

introflessa a costituire tubuli o vescicole (Tav. III, fig. 1), il sistema lamellare in via di formazione, che talora si estende da un estremo all'altro del plastidio, senza o con brevi tratti di interruzione. Si formano anche rudimenti di grani costituiti sempre da pochi dischi, segno indiscutibile dell'evoluzione del plastidio in cloroplasto (Tav. III - VI).

Nelle sezioni più sottili si notano nello stroma dei plastidi altre particolarità strutturali degne di rilievo. Nelle Tav. III, IV e V si osservano per esempio numerose goccioline (G), di natura chimica ancora sconosciuta, e nelle Tav. IV e V sono chiaramente evidenti masse cristalline che interpreto come nuclei di fitoferritina (F). Questa sostanza, ricca di ferro, si rinviene più frequentemente ed in masse più cospicue nei plastidi ricchi di amido e meno differenziati in cloroplasti.

Un grosso cristallo di natura chimica e di significato ancora oscuro si nota nello stroma del plastidio riportato nella Tav. VI (CC) dove sono evidenti anche alcuni tubuli riuniti in gruppo e tagliati trasversalmente. Tali tubuli hanno un diametro di circa 160 Å ed un decorso diverso rispetto all'orientamento del sistema lamellare. Sulla loro funzione non molto chiara mi riprometto di indagare meglio; appiattendosi, essi potrebbero contribuire alla formazione di altre lamelle.

Un'altra particolarità di notevole interesse è la presenza, nello stroma di molti plastidi, di aree contenenti masserelle di ADN, evidenti soprattutto nelle Tav. III, fig. 2 (frecce) e Tav. IV, fig. 1 (AN). Esse si presentano come zone chiare irregolari racchiudenti filamenti di ADN più o meno ramificati, isolati o costituenti una sorta di esile reticolo.

Anche nelle plantule più adulte sono bene visibili, nel citoplasma, i mitocondri, gli sferosomi, qua e là i dittiosomi, la cui struttura è particolarmente evidente nella Tav. VII, fig. 1, ed i ribosomi che punteggiano tutta la massa citoplasmatica. Questi ultimi talvolta sembrano aggregarsi in particolari strutture spiralate come quelle indicate nella Tav. VII, fig. 1 (PR) e fig. 2.

In prossimità di alcune membrane cellulari longitudinali ho potuto mettere talora in evidenza la presenza di microtubuli, decorrenti parallelamente tra loro e costituenti nel loro insieme

una sorta di fascia immediatamente al di sotto del plasmalemma. Per avere una idea più precisa del decorso di tali microtubuli, descritti finora nelle piante solo da qualche Autore (HEPLER e NEWCOMB, 1964), è stato fatto l'esempio della botte e dei cerchi che la fasciano. Naturalmente nel caso della cellula i cerchi (microtubuli) non starebbero all'esterno come nella botte, ma nell'interno, molto vicini alla membrana. Si capisce quindi perché i microtubuli si possano presentare come piccoli cerchietti del diametro di 110 Å o come tubuli allungati (Tav. VIII, fig. 1) a seconda che essi siano tagliati trasversalmente od obliquamente.

La struttura dei nucleoli di *Cuscuta pentagona* è apparsa particolarmente chiara nelle sezioni più sottili quali quelle riportate nelle Tav. VIII, fig. 2, Tav. IX e Tav. X. Hanno forma generalmente tondeggianti e sono costituiti da due regioni facilmente distinguibili tra loro: una centrale di natura fibrillare ed una periferica di natura granulare immerse in una matrice fondamentale. Intorno ai nucleoli si notano talora le masse cromatiniche del nucleo il quale è sempre delimitato dalla doppia membrana interrotta qua e là da « pori ». Frequentemente, in prossimità del nucleolo, si trovano dei corpi particolari (Tav. IX e X, CN), simili ai « cariosomi » di SANKARANARAYANAN e HYDE (1964).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I fatti più importanti messi in evidenza dalle esposte osservazioni sulla ultrastruttura della porzione caulinare pigmentata di plantule di *Cuscuta pentagona* riguardano: le modalità di sviluppo dei cloroplasti; la presenza, nei plastidi, di fitoferri-tina e di ADN; la struttura ad elica di alcuni poliribosomi; la presenza di corpi nucleolari simili ai « cariosomi » e l'ultrastruttura del nucleolo.

I. - *Modalità di sviluppo dei cloroplasti.*

In *C. pentagona* le plantule allo stadio preparassitario posseggono plastidi capaci, in opportune condizioni di illuminazione, di differenziarsi in cloroplasti. Ciò è conforme a quanto è stato già detto da LAUDI (1964) per la *C. australis* dove peraltro la tendenza alla formazione dell'apparato lamellare sembra essere alquanto minore. Il rinvenimento della clorofilla *a* e *b* (PIZZOLONGO, 1963) in questa specie di *Cuscuta* trova la sua logica spiegazione nella presenza delle strutture lamellari sopra descritte dati i rapporti ben noti tra clorofilla e sviluppo del sistema lamellare (HONSELL, 1962); le molecole di clorofilla si disporrebbero nei dischi che costituiscono i grani (GRANICK, 1961).

Secondo GRANICK lo sviluppo dei cloroplasti si può dividere nelle tre fasi seguenti:

- a) fase di moltiplicazione dei proplastidi caratterizzata dalla loro scissione e dalla formazione, da parte della membrana interna che avvolge il proplastidio, di vescicole sferiche o allungate;
- b) fase di differenziazione nella quale i proplastidi si allargano, diventano lenticolari e perdono gradualmente il loro carattere ameboide; le cisterne appiattite si allungano e si fondono in modo da formare pile continue di cisterne. Nello stesso tempo alcune regioni delle membrane delle cisterne aumenterebbero di spessore formando i grani mentre si verificherebbe un aumento di clorofilla;
- c) fase di maturazione nella quale i cloroplasti raggiungono le loro dimensioni finali, le lamelle aumentano di numero, i grani diventano meglio definiti e le scissioni cessano.

In *C. pentagona*, almeno nello stadio preparassitario delle plantule, si può dire che le prime due fasi di questo processo evolutivo, che porta alla differenziazione dei cloroplasti, sembra realizzarsi regolarmente; le vescicole originatesi per invaginazione tangenziale della membrana interna del plastidio (Tav. III, fig. 1) si fondono formando grana-lamelle e stroma-

lamelle che talora decorrono da un estremo all'altro del plastidio; ma il loro numero è sempre alquanto limitato per la mancata realizzazione dell'ultimo stadio evolutivo di maturazione. A questo punto però è lecito chiedersi se in *C. pentagona* i plastidi siano sempre incapaci di portare a termine il loro processo di evoluzione in cloroplasti maturi per fattori inibitori interni ed ereditari, o se piuttosto l'ultima fase del ciclo di GRANICK non si sia realizzata, nel materiale da me esaminato, per le sfavorevoli condizioni in cui le plantule si sono accresciute ed a cui ho fatto cenno in altra parte del presente lavoro. In migliori condizioni di illuminazione il sistema lamellare potrebbe infatti avere uno sviluppo maggiore. Va inoltre rilevato che lo stadio di vita preparassitaria in *C. pentagona* è stato sempre più lungo nei mesi caldi (maggio, giugno, luglio), specialmente se tra le plantule si stabilivano rapporti di autofagia. In tali condizioni vi sono infatti plantule che riescono a superare un mese di vita conservando la capacità di attaccarsi su altre piante ospiti. Invece la durata media della vita nelle plantule su cui ho condotto queste mie osservazioni è stata di soli 15 giorni nei mesi di novembre-dicembre. Si potrebbe quindi anche pensare che, in uno spazio di tempo più lungo e più adatto, l'evoluzione plastidiale abbia maggiore possibilità di completarsi.

Le osservazioni condotte finora sulla struttura dei plastidi di *Cuscuta* riguardano soltanto le plantule allo stadio di vita preparassitaria; non prive di interesse saranno le ricerche già iniziate su piante adulte che, pur conducendo normale vita parassitaria, non sono prive di clorofilla.

Una interessante questione su cui ritengo di dover soffermarmi è quella delle modalità con cui si formano i grani nei plastidi di *C. pentagona*. Questo argomento è stato già trattato, in altre specie di piante, da altri AA. tra cui GEROLA et al. (1960) i quali hanno seguito al microscopio elettronico l'origine dei grani in *Nicotiana tabacum* giungendo alla conclusione che essa « appare legata al convergere ed allo stretto appaiarsi di unità lamellari stromatiche ». Le Tav. IV, fig. 1; Tav. V, fig. 1 e 2 e Tav. VI mostrano chiaramente che in *C. pentagona* l'origine dei grani è alquanto diversa e riconducibile allo schema disegnato

da WEHRMEYER e PERNER (1962) per i cloroplasti di *Spinacia oleracea*. In *Spinacia* i grani sarebbero formati:

- a) da vescicole appiattite, costituenti i dischi, di estensione limitata alla larghezza del grano (grana-lamelle);
- b) da vescicole di estensione un poco maggiore delle precedenti in quanto sporgerebbero o a destra o a sinistra del grano, finendo nella contigua zona tra un grano e l'altro (stroma-lamelle « nicht durchgehenden », non decorrenti);
- c) da stroma-lamelle « decorrenti », cioè congiungenti due o più grani o talora attraversanti il cloroplasto da un estremo all'altro.

WEHRMEYER e PERNER suggeriscono di riunire le grana-lamelle e le stroma-lamelle sotto la denominazione di « tilacoidi », termine coniato per la prima volta da MENKE (1962, riferito da FREY-WISSLING, 1965).

Ora, in alcuni cloroplasti di *C. pentagona* (Tav. V, 2) in via di differenziazione, si nota che i grani si formano per sovrapposizione di 2 o 3 vescicole appiattite (dischi) di estensione variabile, come è stato osservato dai due AA. sopra citati. Dove la differenziazione dei grani è meno evidente i cloroplasti di *C. pentagona* assumono però un aspetto che ricorda quel tipo di cloroplasti « agranulari » (GEROLA, 1962) trovati da HODGE et al. (1955) e da JACOBSON et al. (1963) in prossimità delle nervature nel *Mais*, in cui la differenziazione sembra si arresti precocemente.

In conclusione, le suddette osservazioni, unitamente a quelle riportate nel mio precedente lavoro sui pigmenti di *C. pentagona*, dimostrano che i cloroplasti di questa pianta posseggono la tipica struttura lamellare e sono provvisti di clorofilla *a* e *b* in quantità peraltro non rilevante; è lecito quindi domandarsi se in essi si possano verificare anche le altre condizioni indispensabili per la fotosintesi. Attualmente si conosce molto poco sulla funzionalità del rudimentale apparato fotosintetico del genere *Cuscuta* e gli studi più recenti a tale riguardo sono quelli di CIFERRI e POMA (1962; 1963) i quali hanno dimostrato che in *Cuscuta epithymum* la fissazione di CO₂ avviene sia alla luce

che al buio secondo un meccanismo « diverso da quello che comprende la ribulosio-1,5 difosfato carbossilasi e la carbossidismutasi ». Le ricerche di questi AA. su estratti cellulari di plantule e di filamenti di *C. epithymum* staccati dall'ospite indicherebbero la presenza di una carbossilasi dell'acido fosfoenolpiruvico.

II. - Presenza di fitoferritina.

Gli addensamenti di granuli costituenti le masse cristalline evidenti nei cloroplasti delle Tav. IV e Tav. V, fig. 1 sono stati da me interpretati come nuclei di fitoferritina. Il loro aspetto infatti è del tutto simile a quello riportato nelle figure del lavoro di HYDE et al. (1963) i quali estrassero questo composto ferro-proteico da embrioni di pisello mediante centrifugazione differenziale e cromatografia su colonna e lo identificarono spettrofotometricamente ed al microscopio elettronico. Questa mia interpretazione si basa anche sul fatto che il diametro medio dei granuli da me misurati (60-70 Å), non differisce molto da quello trovato dagli AA. citati (circa 55 Å); un'ulteriore conferma della presenza di fitoferritina nei cloroplasti di *C. pentagona* dovrebbe risultare dall'esito delle relative analisi già in corso.

HYDE et al. hanno trovato la fitoferritina negli embrioni di pisello e nelle prime foglie di plantule di fagiolo cresciuti alla luce o al buio, esclusivamente nei plastidi, con o senza granuli di amido. Masse cristalline simili alla fitoferritina sono state trovate da SITTE (1961) nei meristemi radicali di *Pisum* e da SCHNEPF (1962) nelle cellule dei nettari di *Passiflora*; JACOBSON et al. (1963) hanno osservato la fitoferritina nei plastidi in via di sviluppo di *Zea mays*. Il rinvenimento di questo complesso ferro-proteico nei plastidi di *C. pentagona* sembra quindi dar valore alla ipotesi di HYDE et al. secondo cui la fitoferritina si troverebbe largamente se non universalmente nei semi e nelle plantule delle Angiosperme.

Circa la funzione della fitoferritina nelle piante HYDE et al. sono del parere che essa rappresenti una riserva di ferro utilizzata dai plastidi durante lo sviluppo dell'apparato fotosintetico,

essendo il ferro indispensabile sia per la sintesi della clorofilla che per la riduzione di piridin-nucleotide. Le plantule di *C. pentagona* possiederebbero allora un'abbondante riserva di ferro da poter utilizzare per la differenziazione dei loro cloroplasti, data la frequenza con la quale ho potuto mettere in evidenza, al ME, masse di fitoferritina nei plastidi in via di sviluppo. Devo far notare però che ho rinvenuto la fitoferritina con una certa frequenza anche nei cloroplasti di *C. pentagona* maggiormente evoluti per cui ci si può chiedere se la residua riserva di ferro avrebbe potuto essere utilizzata per una eventuale ulteriore evoluzione dei cloroplasti. Questa abbondanza di fitoferritina, accompagnata da incompleta evoluzione dei cloroplasti, potrebbe però anche interpretarsi come la conseguenza di una scarsa capacità di utilizzare il ferro disponibile, come forse accade secondo BOGORAD et al. 1958 (citato da GEROLA, 1962) nei « ferromutanti ».

III. - Presenza di ADN.

L'ADN in *C. pentagona* si presenta in forma di masserelle estraibili e quindi identificabili con la desossiribonucleasi; esse sono evidenti nelle sezioni molto sottili colorate con acetato di uranile perché legano fortemente gli ioni del colorante.

L'ADN nei cloroplasti è stato trovato recentemente da altri AA. (per la bibliografia vedi KISLEV et al., 1965) i quali lo hanno messo in evidenza al microscopio elettronico e al microscopio ottico con metodi citochimici, usando la reazione di Feulgen, il verde di metile e l'arancio di acridina. Ultimamente nel Whitman Laboratory di Chicago l'ADN è stato messo in evidenza nei mitocondri e nei cloroplasti di *Beta vulgaris* var. *cicla* da KISLEV, SWIFT e BOGORAD (1965) con la tecnica dell'autoradiografia e con l'uso della desossiribonucleasi. Sembra quindi accertato che molte specie di piante contengono nei cloroplasti masserelle di ADN la cui origine e la cui funzione non sono ancora del tutto chiare. WOLLGIEHN e MOTHES (1963, citato da FREY-WISSLING, 1965) hanno trovato che nel tabacco soltanto i cloroplasti in via di sviluppo possono incorporare timidina marcata e non quelli già sviluppati. Anche KISLEV et al. affer-

mano che nel materiale da loro esaminato soltanto nelle foglie molto giovani i cloroplasti erano Feulgen-positivi. Si può pensare pertanto che l'ADN nei cloroplasti sia in rapporto con il loro ciclo evolutivo, a somiglianza di quanto avviene nel nucleo in cui l'ADN è più facilmente rilevabile nelle cellule giovani in attività meristemica.

KISLEV et al. affrontando il problema della origine e della funzione dell'ADN trovato nei mitocondri e nei cloroplasti, affermano che l'ADN contenuto in tali organuli potrebbe essere simile a quello dei virus, capace di riproduzione; oppure potrebbe rappresentare « storage or may be fortuitous products of mitochondrial enzymes, without further biological function ». Essi però si dimostrano più propensi a ritenere che mitocondri e cloroplasti, sebbene ancora dipendenti dal nucleo, posseggano una parziale autonomia genetica spiegabile se si considerano questi organuli come antichi simbionti, secondo quanto è stato suggerito da RIS (1961, citato da KISLEV, 1965). Un'altra ipotesi possibile, secondo questi AA., è che lo sviluppo dei mitocondri e dei cloroplasti nella evoluzione abbia comportato una divisione del genoma (a splitting of the genoma) della cellula in due porzioni separate ma dipendenti (come per esempio nei macro- e micronuclei dei ciliati) e che la frazione citoplasmatica sia necessaria a controllare *in situ* la morfogenesi e la moltiplicazione dei mitocondri e dei cloroplasti. E' per ora impossibile dire se qualcuna di queste ipotesi sia giusta; io ritengo che il problema della presenza dell'ADN nei mitocondri e nei cloroplasti vada esaminato anche alla luce degli studi recenti di MÜHLETHALER e BELL (1962, citato da FREY-WISSLING, 1965) i quali in *Pteridium aquilinum* hanno messo in evidenza l'origine dei proplastidi e dei promitocondri per evaginazioni della doppia membrana nucleare contenenti dense porzioni di nucleoplasma che potrebbero essere pertanto responsabili della ereditarietà di tali organuli.

IV. - *Struttura elicoidale di alcuni poliribosomi.*

In tutte le fotografie riportate nel presente lavoro sono evidenti, nella massa citoplasmatica, numerosissimi ribosomi va-

riamente disposti, a volte isolati, a volte riuniti in gruppi a costituire i poliribosomi o polisomi.

Dei ribosomi e della loro disposizione nel reticolo endoplasmico si sono interessati vari AA. tra cui STRUGGER (1956), FALK (1962) e WARNER et al. (1962). STRUGGER in un suo lavoro ha riportato alcune fotografie in cui i ribosomi sono disposti in file lineari parallele, interpretate come sezioni di eliche ribosomiche del diametro di 300-600 Å; ma FREY-WISLING non ritiene convincente questa interpretazione. FALK ha trovato nelle cellule radicali di cipolla ribosomi disposti a spirale piana, come era stato già notato in cellule animali. WARNER et al. hanno chiamato per la prima volta poliribosomi o semplicemente polisomi degli aggruppamenti di 5 o talora più ribosomi trovati nei reticulociti di coniglio e capaci di compiere la sintesi proteica. Tali polisomi, trattati con ribonucleasi, si scinderebbero nei singoli ribosomi; inoltre nei polisomi la distanza tra due ribosomi adiacenti sarebbe di 70-120 Å, mentre il diametro di ciascun ribosoma è di circa 230 Å. Secondo WARNER et al. questi fatti suggerirebbero che i ribosomi siano tenuti insieme tra loro da sottilissimi filamenti di ARN e che i polisomi possano presentarsi sotto configurazioni diverse. Infatti essi hanno trovato polisomi fatti da unità ribosomiche con disposizione lineare, o formanti gruppi talora « compatti » e talora « aperti ». Inoltre essi sono riusciti a dimostrare in una fotografia al ME l'esistenza di un sottilissimo filamento di connessione tra due unità ribosomiche.

Dei polisomi si sono occupati anche GOODMAN e RICH (1963) i quali hanno ribadito il concetto, già espresso da WARNER et al., secondo cui le unità ribosomiche che costituiscono i polisomi siano tenute insieme dall'ARN messaggero. Questi AA. hanno inoltre ideato un interessante modello che riguarda le modalità secondo le quali, nei polisomi, si formano e successivamente si liberano, le catene polipeptidiche. Nel citoplasma di alcune cellule di *C. pentagona* non è difficile notare poliribosomi simili a quelli descritti dagli AA. ora citati; ma a questo proposito maggiore interesse assumono gli aggruppamenti di ribosomi indicati con le lettere PR nella Tav. VII, fig. 1 e 2, che sembrano mostrare una struttura ad elica e che si potreb-

bero interpretare come polisomi interessati nella sintesi di particolari catene polipeptidiche. In questo modello elicoidale di polisomi si possono contare fino a 10-12 ribosomi e ciò fa pensare ad una catena di ARN messaggero abbastanza lunga; pertanto anche le catene polipeptidiche prodotte dovrebbero essere lunghe poiché esse sono, secondo GOODMAN e RICH, una funzione del numero dei ribosomi e della lunghezza dell'ARN messaggero.

V. - *Presenza di corpi nucleolari.*

Questi corpi particolari, osservati da me molto spesso in prossimità del nucleolo (Tav. IX e Tav. X, CN) potrebbero identificarsi con quelli di 1μ di diametro trovati recentemente da LAFONTAINE (1965) in *Allium cepa*, *Vicia faba* e *Raphanus sativus* e considerati da questo Autore come corpi nucleolari Feulgen negativi costituiti prevalentemente di fibrille di circa 50-100 Å simili a quelle rinvenute in certe zone del nucleolo delle medesime piante. Secondo LAFONTAINE le strutture in questione potrebbero avere origine dal nucleolo col quale hanno somiglianze citochimiche e sulla cui superficie sono spesso localizzate; oppure potrebbero rappresentare materiale ribonucleoproteico extranucleolare sintetizzato da *loci specifici* di cromosomi ai quali si mostrano frequentemente associati. Anche SANKARANARAYANAN e HYDE (1965) hanno descritto nei piselli corpi analoghi, coi caratteri della cromatina e dei nucleoli, e da loro chiamati « cariosomi ». Essi si distinguerebbero dal nucleolo per la mancanza delle particelle ovoidali ribonucleoproteiche di 120-160 Å che caratterizzano il nucleolo nei piselli. Sebbene i due suddetti AA. abbiano formulato altre ipotesi sul ruolo dei cariosomi io ritengo che attualmente le nostre conoscenze siano ancora limitate per poter capire la loro vera funzione. Lo studio di questo interessante problema non dovrebbe essere disgiunto, a mio avviso, da quello della presenza dei satelliti nucleolari trovati da alcuni AA. per es. in *Centranthus* (POUCQUES, 1949; PIZZOLONGO, 1959).

VI. - *Ultrastruttura del nucleolo.*

L'ultrastruttura dei nucleoli in *C. pentagona* corrisponde a quella descritta recentemente da altri AA. tra cui MARINOZZI (1963) in materiale animale. Vi si possono identificare una porzione periferica granulare, una interna fibrillare ed una massa amorfa probabilmente di natura proteica. MARINOZZI ha stimato in 150-200 Å il diametro dei singoli granuli e in 50 Å circa lo spessore medio delle fibrille; queste misure coincidono all'incirca con quelle effettuate da me e quelle riportate da HYDE et al. (1964). Anche questi ultimi AA. hanno distinto nei nucleoli del pisello una regione granulare fatta di particelle di circa 160 Å ed una fibrillare fatta da una rete di esili cordoni del diametro medio di 100 Å: essi però hanno trovato che ambedue le regioni sono in effetti costituite da fibrille di 15-20 Å variamente disposte. La medesima distinzione in una parte granulare ed una fibrillare è stata fatta da FABBRI (1963) nei nucleoli di *Psilotum*.

Molto interessante è l'ipotesi avanzata da alcuni AA. tra cui HYDE et al. (1964) e JONES (1965), della esistenza di stretti rapporti tra ribosomi e nucleoli. JONES ha studiato l'ultrastruttura di un mutante di *Xenopus laevis* incapace di sintetizzare i ribosomi; in questo mutante il nucleolo non presenta la regione più periferica composta normalmente di granuli di 150-300 Å, ma possiede solo dense masse fibrose corrispondenti alla regione fibrillare dei nucleoli normali. In *C. pentagona* la somiglianza tra i ribosomi del citoplasma ed i granuli della porzione periferica dei nucleoli è evidentissima e meriterebbe una più approfondita ricerca.

Nel materiale da me esaminato non ho trovato nessuna struttura corrispondente al nucleolonema di ESTABLE e SOTELO (1951 e 1954). FABBRI nega che una simile struttura esista nelle cellule animali e vegetali; tuttavia vi sono AA. che ne sostengono l'esistenza. Per esempio SCHOEFL (1964), studiando l'effetto della actinomicina D sulla struttura dei nucleoli di rene di *Papio papio*, ha messo in evidenza, oltre ad un materiale amorfo non descritto, secondo l'A., precedentemente, anche il nucleolonema ed una porzione granulare in una matrice proteica. Lo

stesso ESTABLE in una comunicazione al Simposio Internazionale sulla struttura e le funzioni del nucleolo, tenutosi a Montevideo nel dicembre 1965, ha riconfermato che il nucleolonema è una struttura reale la cui esistenza è stata dimostrata mediante tecniche di colorazioni varie, al microscopio a contrasto di fase « in vivo » ed al microscopio elettronico.

Esprimo il mio più vivo ringraziamento al Prof. H. SWIFT per la cortese ospitalità concessami nel Whitman Laboratory dell'Università di Chicago da lui diretto, dove ho potuto disporre delle attrezzature necessarie per la realizzazione del presente lavoro.

Ringrazio inoltre DAVID PHILLIPS e CHRISTOPHER CHOW del cui consiglio ed aiuto mi sono largamente avvalso durante l'allestimento dei preparati e le osservazioni al microscopio elettronico.

RIASSUNTO

Lo studio al microscopio elettronico della porzione caulinare pigmentata di plantule di *Cuscuta pentagona* ha messo in evidenza, nei plastidi differenziatisi in cloroplasti, la tipica struttura lamellare con rudimenti di grani costituiti sempre di pochi dischi sovrapposti (2-3); la presenza in essi di clorofilla *a* e *b* in piccola quantità pone il problema della possibilità che in questa pianta parassita si compia una debole attività fotosintetica.

La formazione dei grani avviene per sovrapposizione di vescicole appiattite, formatesi per invaginazione della membranella delimitante interna del plastidio.

Nello stroma di molti plastidi sono stati messi in evidenza dall'A. un complesso ferro-proteico, la fitoferritina, e masserelle di ADN le cui origini e funzioni sono state brevemente discusse.

Sono stati descritti poi aggruppamenti particolari di ribosomi con struttura elicoidale, interpretati come poliribosomi probabilmente inte-

ressati nella sintesi di lunghe catene polipeptidiche, ed alcuni corpi nucleolari simili ai « cariosomi » trovati da altri AA.

E' stata discussa infine la struttura dei nucleoli in cui sono riconoscibili una porzione granulare periferica ed una fibrillare interna, in una massa amorfa probabilmente di natura proteica.

SUMMARY

The ultrastructure of the coloured stem portion of *Cuscuta pentagona* revealed that plastids developing in chloroplasts have the typical lamellar structure and show rudimentary grana consisting of few overlapped discs (2-3); as they hold a little amount of chlorophyll *a* and *b*, the problem rises whether that parasitic plant is able to make a photosynthetic activity.

The grana development takes place by overlap of flattened vesicles arising from invaginations of the internal membrane of the plastids.

Phytoferritin, an iron-protein complex, and DNA filaments inside the chloroplasts have been identified and their origin and function briefly discussed.

Some particular ribosome grouping with an helicoidal structure, regarded by the A. as polysomes probably engaged in synthesis of long polypeptidic chain, have been described.

Finally have been discussed some nucleolar bodies, like the « Karyosomes » described by others AA., and the structure of the nucleolus consisting of a proteinic amorphous mass, a granular portion and a fibrillar one.

Portici, Istituto Botanico, dicembre 1965.

BIBLIOGRAFIA

- BOGORAD, L., G. PIRES, H. SWIFT & W. J. MC ILRATH, 1958. *The structure of chloroplasts in leaf tissue of Iron deficient Xanthium*. In « *The photochemical apparatus its structure and function* ». Brookhaven Symp. Biol., **11**: 132-137.

- BONNEVILLE, M. A. & B. R. VOELLER, 1963. *New cytoplasmic component of plant cells*. J. of Cell Biol., **18** (3): 703-708.
- CIFERRI, O. & G. POMA, 1963. *Fissazione dell'anidride carbonica da parte di Cuscuta epithimum*. Giorn. Bot. Ital., **70**: 345-346.
- ESTABLE, C. & J. R. SOTELO, 1951. *Una nueva estructura celular: el nucleolonema*. Publ. Inst. Invest. Cien. Biol., Montevideo, **1**: 105-126.
- — — — —, 1954. *The behaviour of the nucleolonema during mitosis*. In « Symposium on fine structure of cells ». Noordhoff, Groningen.
- FABBRI, F., 1963. *Ricerche al microscopio ottico ed elettronico sulla struttura del nucleolo di cellule meristematiche di alcune piante e considerazioni critiche sulla teoria del « nucleolonema »*. Caryologia, **16**: 715-749.
- FALK, H., 1962. *Spiralige Anordnung von Ribosomen in Pflanzenzellen*. Protoplasma, **54**: 594-597.
- FRITSCHÉ, E., M. BOUILLENNE-WALRAND & R. BOUILLENNE, 1959-60. *Quelques observations sur la biologie de Cuscuta europaea L.* Arch. Inst. Bot., Liège, **26**: 163-187.
- GEROLA, F. M., 1962. *Le infrastrutture del plastidio verde*. Giorn. Bot. Ital., **69**: 140-166.
- GEROLA, F. M., F. CRISTOFORI & G. DASSU', 1960. *Ricerche sulle infrastrutture delle cellule del mesofillo fogliare di piante sane e virosate di Tabacco (Nicotiana tabacum)*. A: *Piante sane*. Caryologia, **13**: 352-366.
- GOODMAN, H. M. & A. RICH, 1963. *Mechanism of polyribosome action during protein synthesis*. Nature, **199**: 318-322.
- GRANICK, S., 1961. *The chloroplasts: inheritance, structure, and function*. The Cell, **2**: 489-602.
- HEPLER, P. K. & E. H. NEWCOMB, 1964. *Microtubules and fibrils in the cytoplasm of Coleus cells undergoing secondary wall deposition*. J. of Cell Biol., **20** (3): 529-533.
- HODGE, A. J., J. D. MCLEAN & F. V. MERCER, 1955. *Ultrastructure of the lamellae and grana in the chloroplast of Zea Mays L.* J. Biophys. Biochem. Cytol., **1**: 605-614.
- HONSELL, E., 1961. *Osservazioni sull'ultrastruttura dei plastidi in foglie albicate di Aspidistra elatior*. Ann. di Bot., **27** (1): 66-79.
- HYDE, B. B., A. J. HODGE, A. KAHN & M. L. BIRNSTIEL, 1963. *Studies on Phytoferritin. I. Identification and localization*. J. Ultrastructure Research, **9**: 248-258.

- HYDE B. B., K. SANKARANARAYANAN & M. L. BIRNSTIEL, 1965. *Observations on fine structure in Pea nucleoli in situ and isolated*. J. Ultrastructure Research, **12**: 652-667.
- JACOBSON, A. B., H. SWIFT & L. BOGORAD, 1963. *Cytochemical studies concerning the occurrence and distribution of RNA in plastids of Zea Mays*. J. of Cell. Biol., **17** (3): 557-570.
- JONES, K. W., 1965. *The role of nucleolus in the formation of Ribosomes*. J. of Ultrastructure Research, **13**: 257-262.
- KISLEV, N., H. SWIFT & L. BOGORAD, 1965. *Nucleic acids of chloroplasts and mitochondria in Swiss Chard*. J. of Cell Biol., **25** (2): 327-344.
- LAFONTAINE, J. G., 1965. *A light and electron microscope study of small spherical nuclear bodies in meristematic cells of Allium cepa, Vicia faba, and Raphanus sativus*. J. of Cell Biol., **26**: 1-17.
- LAUDI, G., 1964. *Ricerche infrastrutturali sui plastidi delle piante parassite. I. Cuscuta*. Caryologia, **17**: 139-152.
- MARINOZZI, V., 1964. *Cytochimie ultrastructurale du nucléole-RNA et protéines intranucléolaire*. J. Ultrastructure Research, **10**: 433-456.
- MENKE, W., 1962. *Structure and chemistry of plastids*. Ann. Rev. Plant Physiol., **13**: 27-44.
- MÜHLETHALER, K. & P. R. BELL, 1962. *Untersuchungen über die Kontinuität von Plastiden und Mitochondrien in der Eizelle von Pteridium aquilinum (L.) Kuhn*. Naturwissenschaften, **49**: 63-64.
- PIZZOLONGO, P., 1959. *Ricerche sulla cariologia del genere Centranthus e loro importanza tassonomica*. Delpinoa, **1**: 149-164.
- —, 1963. *Notizie preliminari sull'autoparassitismo in Cuscuta pentagona Engel*. Ann. di Bot., Roma, **27**: 509-516.
- —, 1963. *Sui pigmenti di Cuscuta pentagona Engel*. Delpinoa, **5**: 9-16.
- POUCQUES, M. L., 1949. *Recherches caryologiques sur les Rubiales*. Rev. Gen. Bot., **56** (661): 101-109 e 122-138.
- RIS, H., 1961. *Ultrastructure and molecular organization of genetic systems*. Canadian J. Genet. Cytol., **3**: 95.
- SANKARANARAYANAN, K. & B. B. HYDE, 1965. *Ultrastructural studies of a nuclear body in Peas with characteristics of both chromatin and nucleoli*. J. Ultrastructure Research, **12**: 748-761.
- SCHNEPF, E., 1962. *Plastidenstrukturen bei Passiflora*. Protoplasma, **54**: 310-313.

- SCHOEFL, G. I., 1964. *The effect of Actinomycin D on the fine structure of the nucleolus*. J. Ultrastructure Research, **10**: 224-243.
- SITE, P., 1961. *Zum Bau der Plastidenzentren in Wurzelproplastiden*. Protoplasma, **53**: 438-442.
- STRUGGER, S., 1956. *Die Uranylacetat-Kontrastierung für die elektronenmikroskopische Untersuchung von Pflanzenzellen*. Naturwiss., **43**: 357-358.
- WARNER, J. R., A. RICH & C. E. HALL, 1962. *Electron microscope studies of ribosomal clusters synthesizing hemoglobin*. Science, **138**: 1399-1403.
- WEHRMEYER, W. & E. PERNER, 1962. *Der submikroskopische Bau der Grana in den Chloroplasten von Spinacia oleracea L.* Protoplasma, **54**: 573-593.
- WOLLGIEHN, R. & K. MOTHES, 1963. *Über DNS in den chloroplastes von Nicotiana rustica*. Naturwissenschaften, **50**: 95-96.

T A V O L E

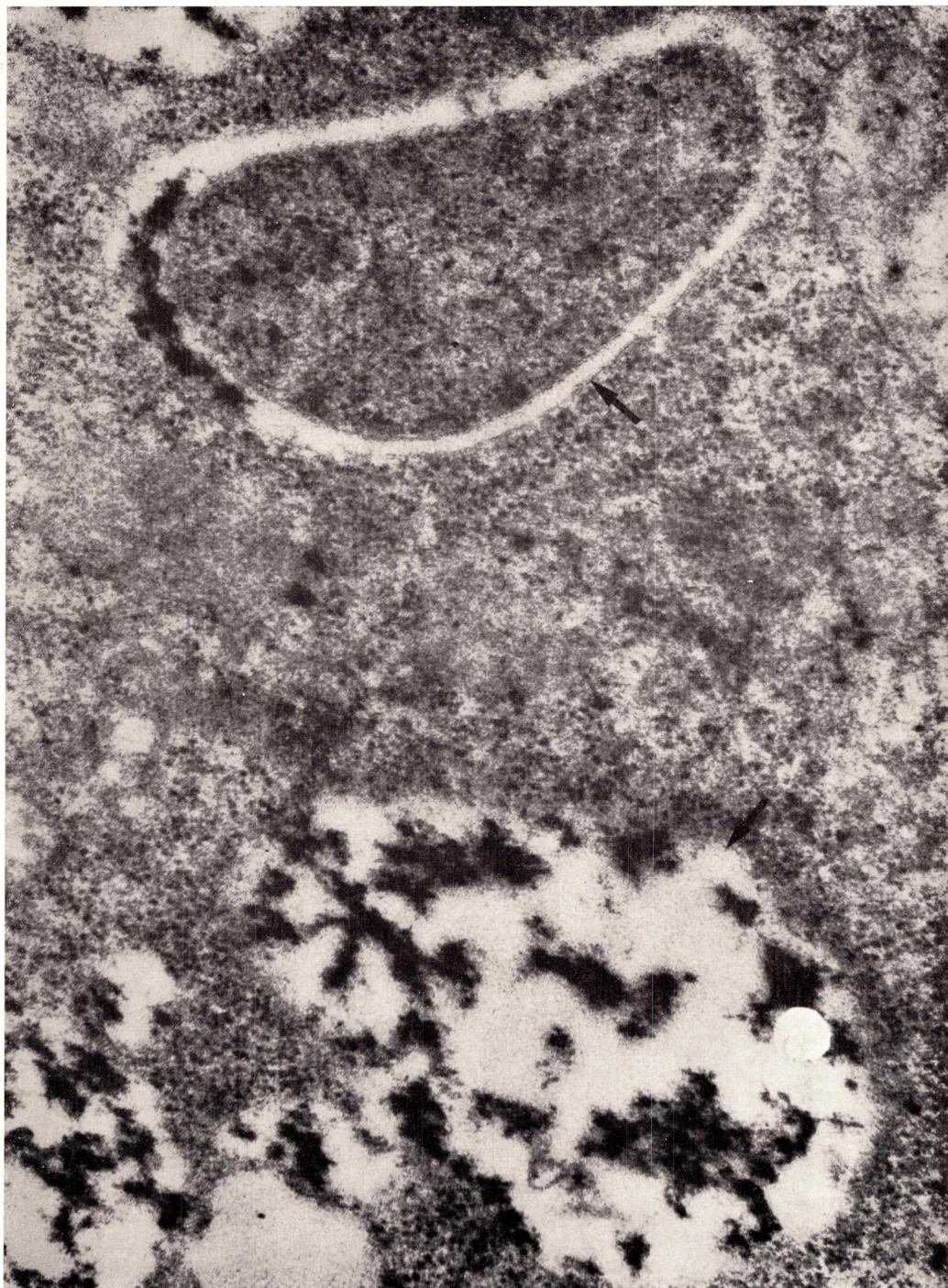
ELENCO DELLE ABBREVIAZIONI

A = Amido; AN = Masserelle di ADN; CC = Corpo cristallino; CN = Corpo nucleolare; CR = Cromatina; D = Dittiosomi; F = Fitoferritina; G = Goccioline osmiofile; M = Mitochondri; MN = Membrana nucleare; N = Nucleolo; P = Plasmodesmi; PR = Poliribosomi; R = Ribosomi; S = Sferosomi; T = Tubuli; V = Vacuolo.

TAV. I — Granuli di amido (A), dittiosomi (D), mitocondri (M), ribosomi (R) e sferosomi (S) in cellula di plantula di *Cuscuta pentagona* dell'età di 3-4 giorni (41616×).

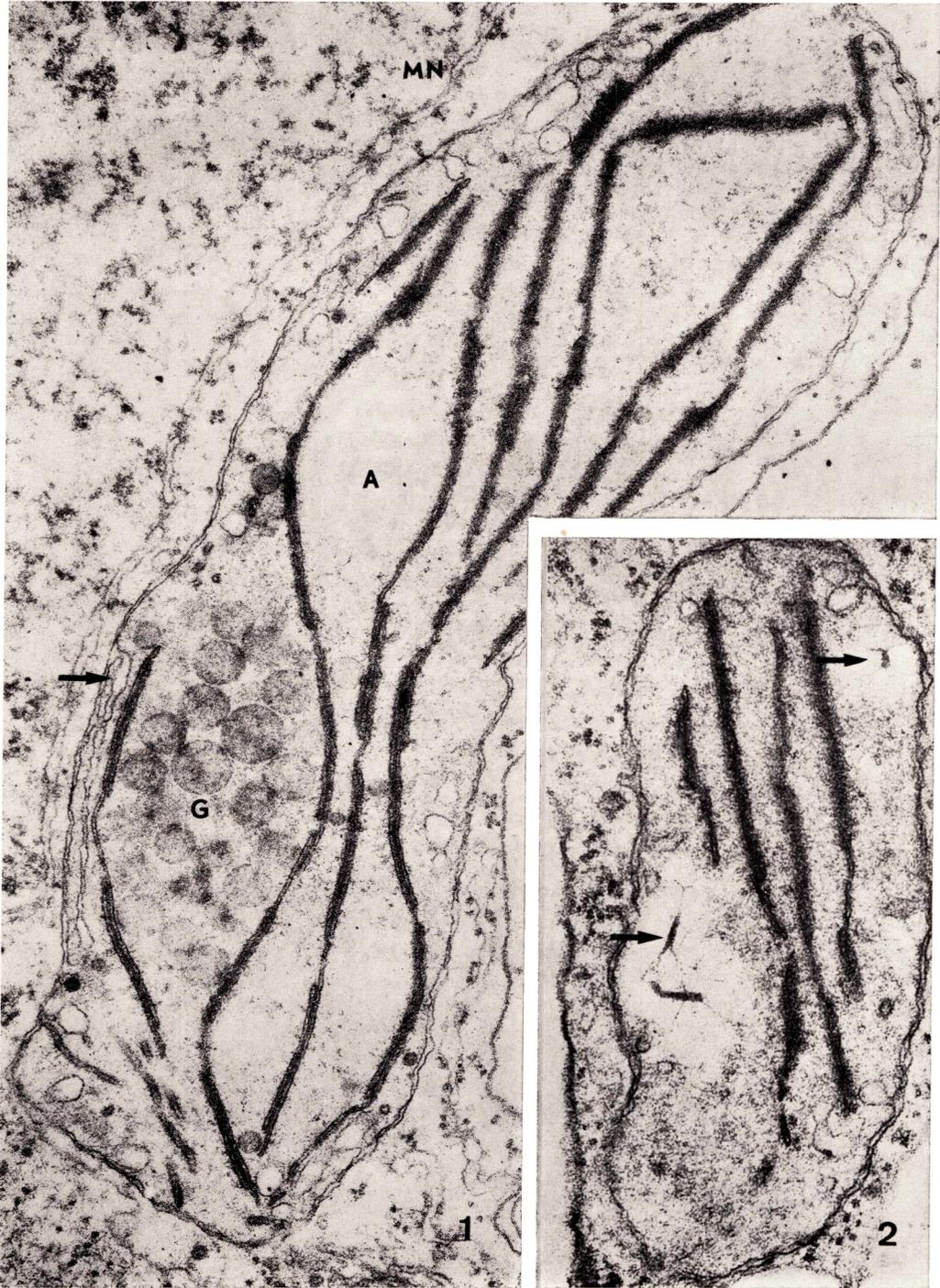


TAV. II — Strutture citoplasmatiche a forma di anello (in alto) e formazioni vacuolari con granulazioni osmiofile (in basso) in una cellula probabilmente destinata a differenziarsi in cellula austoriale. (66096×).



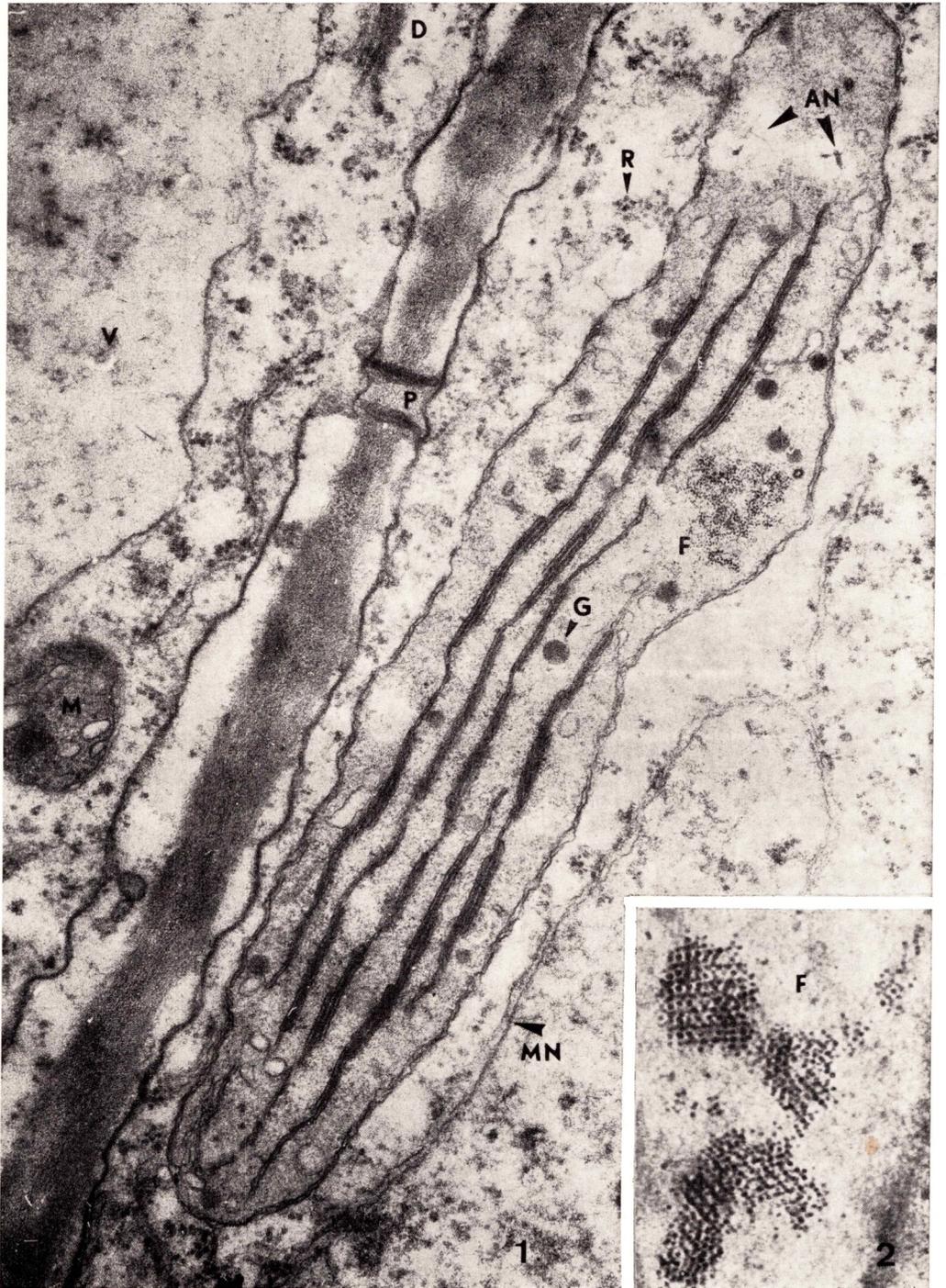
TAV. III — Fig. 1. Cloroplasto in via di differenziazione; nel punto indicato dalla freccia si nota una invaginazione della membranella interna del plastidio con formazione di una vescicola allungata. (39340×).

Fig. 2. Cloroplasto con masserelle di ADN. (62400×).



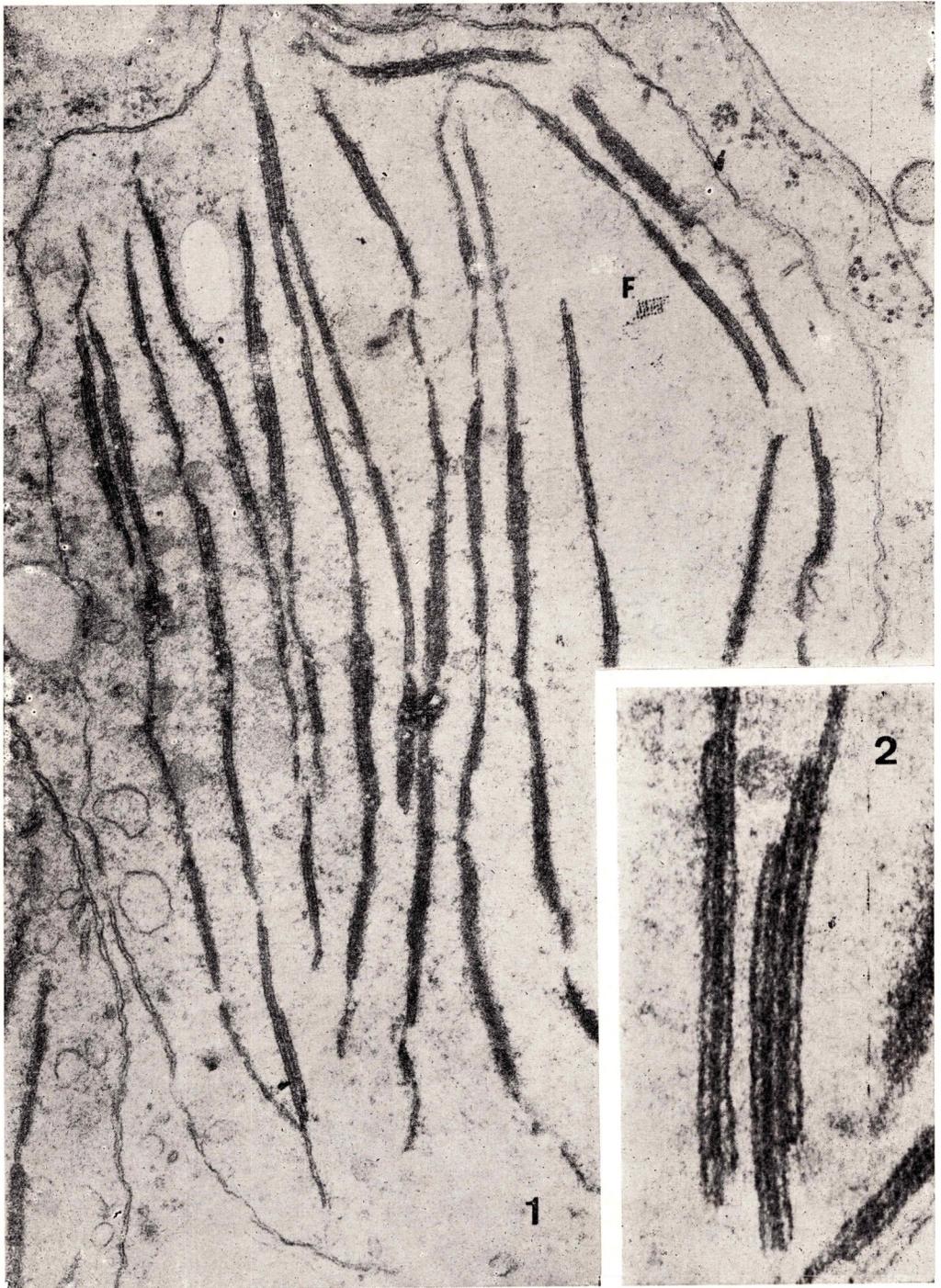
TAV. IV — Fig. 1. Cloroplasto con masserelle di ADN (AN) e fitoferritina (F). (52322×).

Fig. 2. Masse cristalline costituite da addensamenti di granuli interpretati con nuclei di fitoferritina. (100970×).



TAV. V — Fig. 1. Cloroplasto in via di differenziazione con inizio di formazione di grani. (51600×).

Fig. 2. Particolare di un cloroplasto in cui si vede che la formazione dei grani avviene per sovrapposizione di vescicole appiattite. (116800×).

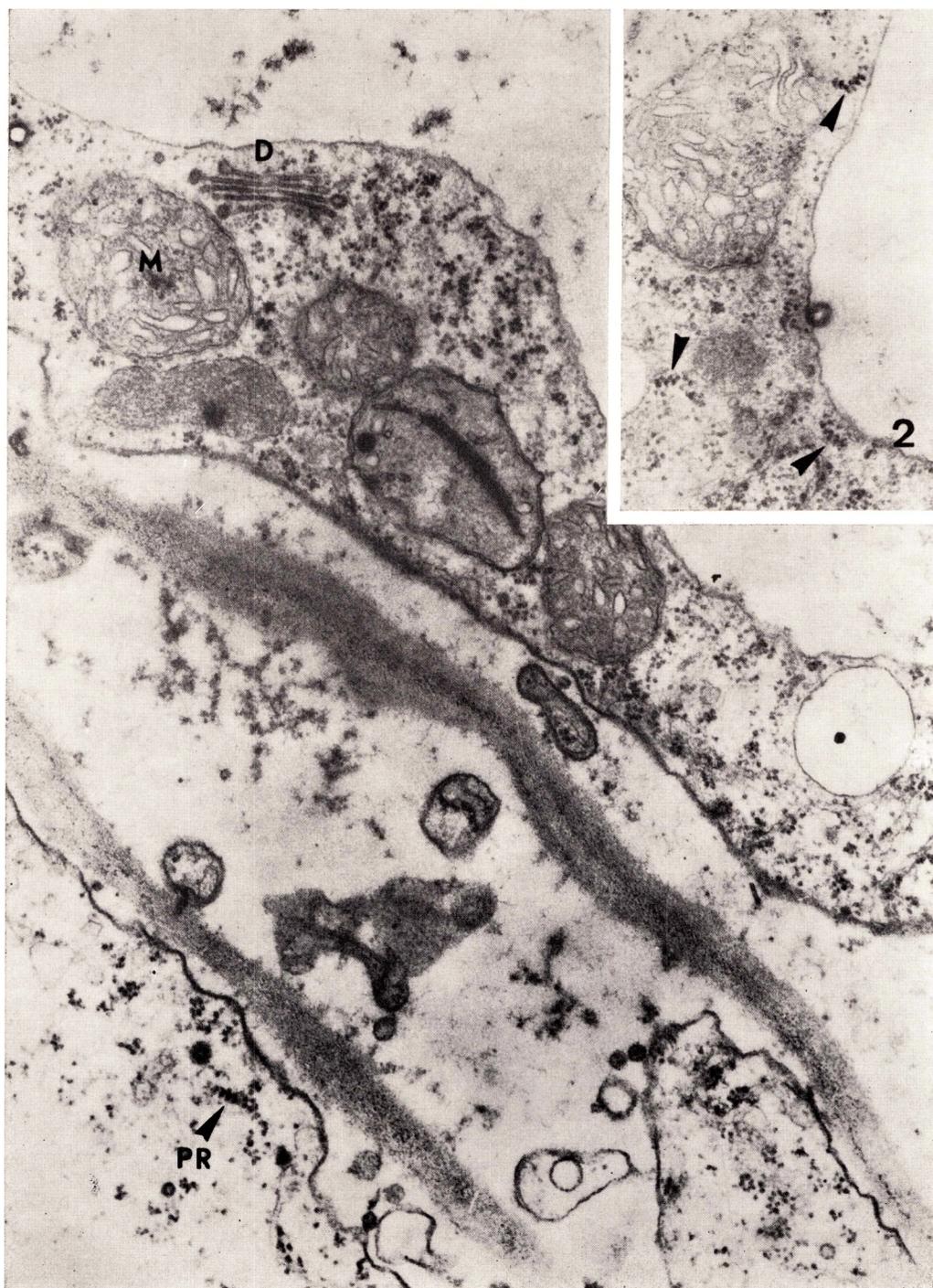


Tav. VI — Cloroplasto mostrante un granulo di amido (A), un gruppo di tubuli tagliati trasversalmente (T) ed un corpo cristallino scuro (CC). Nel cloroplasto in basso si nota la formazione di un grano costituito dai più dischi sovrapposti. (47000×).



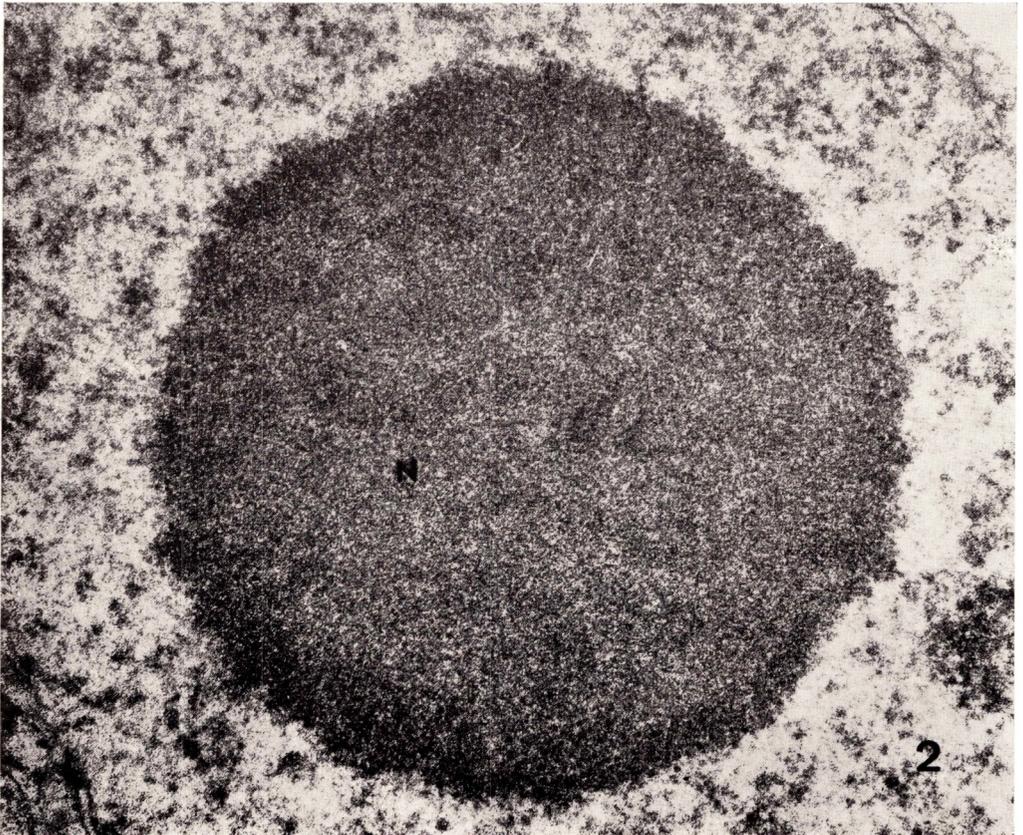
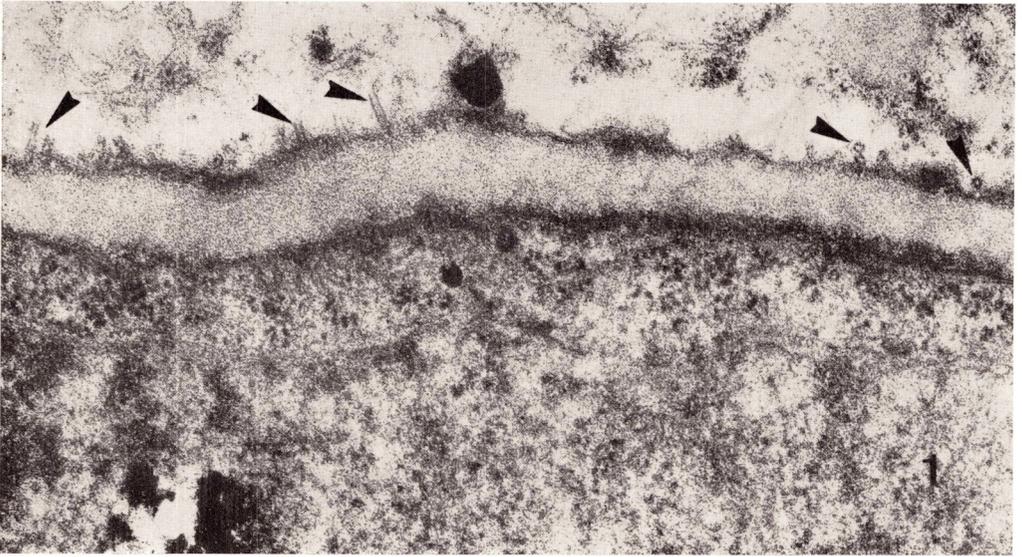
TAV. VII — Fig. 1. Particolare di una cellula in cui è evidente la tipica struttura di un dittiosoma (D) ed un poliribosoma (PR) con struttura spiralata. (40200×).

Fig. 2. Sono indicati dalle frecce tre poliribosomi chiaramente spiralati. (40200×).

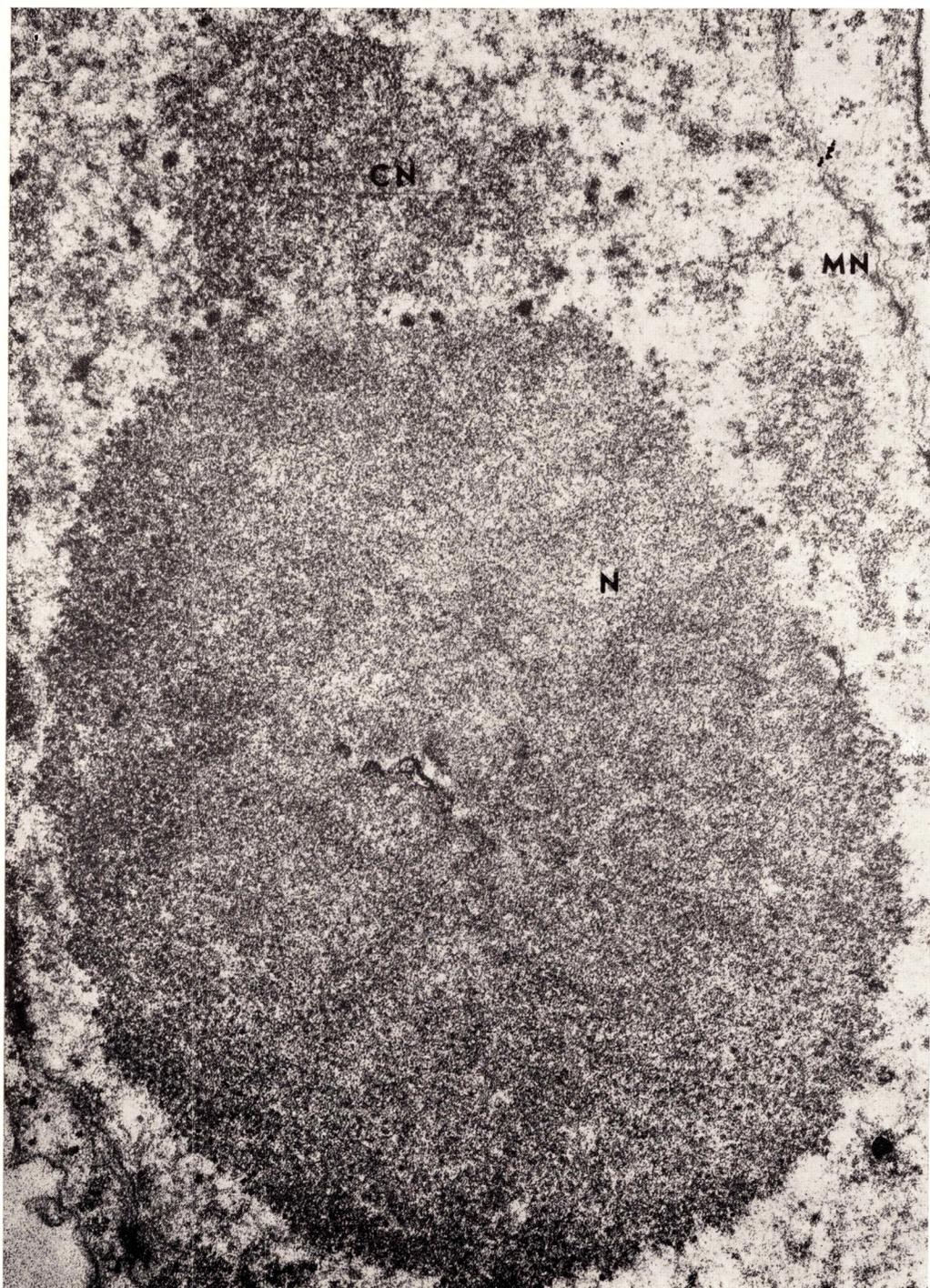


TAV. VIII — Fig. 1. Microtubuli (freccette) tagliati longitudinalmente e trasversalmente in prossimità della parete cellulare. (94.000×).

Fig. 2. Nucleolo con una porzione fibrillare al centro ed una granulare alla periferia. (47.000×).



TAV. IX — Particolare di una cellula in cui si notano il nucleolo (N), un corpo nucleolare (CN) e la membrana nucleare (MN). (48000 ×).



TAV. X — Particolare di una cellula mostrante un nucleolo (N), un corpo nucleolare (CN) ed una massa cromatinica (CR). (48000 ×).

