

**Le leucocisti di *Sphagnum recurvum* P. Beauv.
studiate comparativamente al microscopio
elettronico a scansione ed al microscopio
elettronico a trasmissione. (*)**

In precedenti lavori (CAPUTO & CASTALDO, 1967, 1968), rivolti allo studio della conduzione dell'acqua nelle Briofite, venivano riferite le prime osservazioni sull'ultrastruttura delle cellule del caulidio di due *Bryales*: *Mnium undulatum* Weiss. (muschio provvisto di cordone idroconduttore) e *Tortula ruralis* (L.) Ehrh. subsp. *ruraliformis* (Besch.) (muschio privo di cordone idroconduttore).

Allo scopo di avere ulteriori informazioni, utili per l'interpretazione delle modalità con cui si attua la conduzione nei muschi, abbiamo ritenuto opportuno estendere le nostre ricerche alle *Sphagnales*, data la presenza in questo gruppo di speciali cellule morte, le leucocisti, che potrebbero, secondo alcuni AA., giocare un ruolo importante nell'accumulo e nella circolazione dell'acqua.

Queste cellule furono notate per la prima volta da MOLDENHAWER (1812) e successivamente descritte da MOHL (1837), DOZY (1854), SCHIMPER (1857) e BRAITHWAITE (1880). Solo molto più tardi (DURHAM, 1937), però, fu affrontato il problema della loro ontogenesi e dell'origine dei particolari pori che ne caratterizzano le pareti. Le uniche osservazioni sull'ultrastruttura di queste cellule sono quelle effettuate da

(*) Lavoro eseguito con un contributo del Consiglio Nazionale delle Ricerche, nell'ambito del Comitato Biologia e Medicina, presso l'Istituto Botanico dell'Università di Napoli (Facoltà di Scienze).

MOZINGO & AL., (1969) in uno studio al microscopio elettronico a scansione sulle foglioline del gametofito di *Sphagnum imbricatum* Hornsch. ex Russ.

MATERIALE E METODI

Si sono utilizzate le foglioline dei rami del gametofito di *Sphagnum recurvum* P. Beauv., proveniente dal lago di Pratinano (Appennino modenese)*.

Le osservazioni al microscopio ottico sono state fatte direttamente su materiale fresco.

Per lo studio al microscopio elettronico a scansione i rametti apicali e le singole foglioline sono stati disidratati con una serie di alcoli etilici a concentrazione crescente, asciugati all'aria e successivamente ricoperti con uno strato di oro dello spessore di 200 Å. Si è usato per le osservazioni e le microfotografie un microscopio elettronico JEOL Scanning JSM 2** con un voltaggio di accelerazione di 25 kV.

Per le ricerche al microscopio elettronico a trasmissione i rametti apicali e le singole foglioline sono stati fissati, per 30' a 4°C, parte con una soluzione di KMnO_4 al 2% in acqua bidistillata e parte con una soluzione di KMnO_4 al 2% in tampone veronal-acetato a pH 6,5. Dopo ripetuti lavaggi in acqua bidistillata per la prima fissazione ed in tampone veronal-acetato per la seconda, si è proceduto alla disidratazione con una serie di alcoli etilici a concentrazione crescente e, quindi, all'inclusione in Epon 812. Le sezioni ultrasottili, ottenute con un ultramicrotomo Ultratome III della LKB, sono state contrastate con acetato di uranile (5') e citrato di piombo (5'). Per

* Gli AA. ringraziano vivamente il Prof. F. Corbetta per aver fornito il materiale di studio.

** Gli AA. ringraziano l'Istituto di Paleontologia della Facoltà di Scienze dell'Università di Napoli per aver consentito l'uso del microscopio elettronico a scansione, installato nell'Istituto di Geologia della stessa Università.

le osservazioni e le microfotografie si è utilizzato un microscopio elettronico Siemens Elmiskop 1A.

OSSERVAZIONI AL MICROSCOPIO OTTICO

Le foglioline dei rami del gametofito di *Sphagnum recurvum* P. Beauv., a completo sviluppo, presentano cellule dall'aspetto vermiforme, vive, ricche di cloroplasti, dette clorocisti, e cellule fusiformi, ialine, prive di ogni contenuto protoplasmatico, dette anche leucocisti o otricelli.

I due tipi di cellule sono riuniti a formare un reticolo regolare, monostratificato, in cui le leucocisti, lunghe fino a 225 μ e larghe al massimo 26 μ , sono circondate da quattro a sei clorocisti, lunghe fino a 79 μ e larghe al massimo 11 μ . Queste ultime, a causa del loro minore diametro, in sezione trasversale non occupano tutto lo spessore delle foglioline, ma, nella specie in esame, appaiono localizzate verso la superficie dorsale.

La parete delle cellule ialine si presenta particolarmente interessante, perché caratterizzata da ispessimenti di sostegno anulati o più raramente spiralati e da piccoli pori ovali-triangulari, facilmente distinguibili soprattutto alle due estremità della cellula (Tav. I, A, C).

Nelle leucocisti, inoltre, si trovano spesso annidati protozoi, batteri, colonie di *Nostoc*, alghe verdi, ecc.

OSSERVAZIONI AL MICROSCOPIO ELETTRONICO A SCANSIONE

A piccolo ingrandimento, lo studio al microscopio elettronico a scansione della superficie dorsale e ventrale delle foglioline dei rami di *Sphagnum recurvum* P. Beauv. conferma le osservazioni fatte al microscopio ottico e permette una migliore visualizzazione dei pori (Tav. I, B).

A più forte ingrandimento, la parete delle cellule ialine, in corrispondenza degli ispessimenti, si mostra leggermente infossata e caratterizzata da brevi sculture lineari e parallele tra loro che hanno un andamento ortogonale rispetto al piano passante per l'ispessimento stesso (Tav. II, A, C e Tav. V, A).

Osservando la superficie dorsale delle foglioline, risultano bene evidenti, anche se leggermente infossate, le clorocisti (Tav. IV, A). Queste presentano sulla loro parete sculture parallele, che, però, a differenza di quelle delle leucocisti, si estendono per tutta la lunghezza della cellula e risultano più distanziate (Tav. I, E).

Per quanto concerne i pori, le microfotografie a piccolo ingrandimento consentono di localizzarli chiaramente e di stabilire la loro frequenza sulle due superfici delle foglioline. Essi risultano sempre più numerosi sulla superficie ventrale (da 4 a 6) che non su quella dorsale (da 1 a 3) ed appaiono spesso riuniti in gruppi di tre, in relazione alla forma ed alla particolare disposizione delle cellule ialine. Nelle foglioline più giovani essi non sono pervi, ma chiusi da una membranella, che, talvolta, presenta un inizio di perforazione* (Tav. IV, A, B).

A più forte ingrandimento, i pori mostrano di avere un bordo irregolare e appena sollevato. Inoltre, quando essi si trovano in vicinanza di uno degli ispessimenti della parete delle leucocisti, le rugosità, descritte precedentemente in corrispondenza di tali ispessimenti, si continuano, talvolta, fino al margine del poro (Tav. V, A, B, C).

In alcuni casi è possibile osservare, attraverso queste aperture, la superficie interna delle leucocisti con i relativi ispessimenti, che appaiono come cercini sporgenti nel lume cellulare (Tav. V, C).

OSSERVAZIONI AL MICROSCOPIO ELETTRONICO A TRASMISSIONE

L'osservazione al microscopio elettronico a trasmissione di sezioni longitudinali delle foglioline dei rami del gametofito di *Sphagnum recurvum* P. Beauv. mette chiaramente in evidenza

il caratteristico aspetto sinuoso della parete delle leucocisti, dovuto alla presenza di strozzature in corrispondenza degli ispessimenti interni. Questo particolare, d'altronde, si può rilevare, sebbene meno distintamente, anche al microscopio ottico ed a quello a scansione (Tav. II, B, D).

Le microfotografie ottenute al microscopio a trasmissione, sia da sezioni trasversali che longitudinali delle foglioline, consentono, poi, di misurare lo spessore della parete delle cellule ialine ($0,6 \mu$), che risulta sempre leggermente inferiore rispetto a quello delle clorocisti (1μ), tranne in corrispondenza degli ispessimenti, dove può raggiungere fino a 5μ (Tav. I, D).

Inoltre, lo studio delle sezioni in serie permette sia di misurare il sottile spessore della membranella di chiusura del poro (150 \AA circa), laddove questa è presente, sia di stabilire i rapporti morfologici tra la parete della cellula ialina e la membranella stessa. Nelle leucocisti a completo sviluppo appare chiaramente che essa rappresenta soltanto lo strato più esterno della parete primaria. Infatti, in quelle cellule ialine in cui sono ancora presenti tracce di citoplasma, la rimanente parte della parete primaria mostra una sorta di disfacimento in atto che procede dal centro verso la periferia del poro (Tav. III).

Per quanto riguarda le clorocisti, la loro ultrastruttura (Tav. I, D) presenta tutte le caratteristiche descritte per le cellule verdi di altre Briofite (PAOLILLO & REIGHARD, 1967).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il confronto delle nostre osservazioni al microscopio ottico, al microscopio elettronico a scansione ed al microscopio elettronico a trasmissione, ci ha consentito di approfondire la morfologia delle leucocisti e di accertare alcune caratteristiche strutturali, che confermano l'ipotesi avanzata da vari AA. sull'importanza che esse avrebbero nell'accumulo e nella circolazione dell'acqua.

Infatti, lo studio delle microfotografie ottenute al microscopio elettronico a trasmissione ci ha permesso di vedere, per la prima volta, l'ultrastruttura delle leucocisti e di confrontare lo spessore della loro parete con quello delle clorocisti. D'altra parte il microscopio elettronico a scansione ha avvalorato l'ipotesi di MOZINGO & AL. (1969), sulle rugosità in corrispondenza degli ispessimenti, in quanto anche noi le interpretiamo come un artefatto di tecnica. Tale artefatto conferma che i tratti in cui la parete è più spessa, sono maggiormente imbibiti e, di conseguenza, subiscono, al momento dell'essiccamento, una più forte disidratazione (Tav. II, C e Tav. V, A).

Interessanti, inoltre, si sono rivelate le nostre osservazioni, al microscopio elettronico a trasmissione, sulla membranella di chiusura del poro, poiché, oltre alla valutazione dello spessore della membranella stessa, hanno consentito di definire chiaramente i rapporti morfologici intercorrenti tra questa e la rimanente parete. Infatti la membranella non corrisponde, come aveva ipotizzato DURHAM (1937), a tutta la parete primaria, ma solamente allo strato più esterno di essa (Tav. III).

L'interpretazione delle modalità con le quali si attua la rottura e la scomparsa della membranella del poro rimane, invece, ancora dubbia. Alcuni autori affermano che essa scompare per riassorbimento da parte della cellula; altri, tra cui DURHAM (1937), suppongono che ciò possa avvenire per digestione batterica o per azione delle soluzioni esterne a contatto con le foglioline. MOZINGO & AL. (1969) ritengono che la scomparsa della membranella del poro sia conseguenza di una rottura iniziata con l'essiccamento della pianta. Essi infatti, a sostegno di questa ipotesi, danno particolare rilievo alla conformazione del bordo del poro ed al notevole spessore della parete alla base di questo.

Per quanto riguarda la prima ipotesi, poiché abbiamo spesso osservato la presenza della membranella in leucocisti ormai del tutto prive di protoplasma, ci sembra che non sia possibile attribuirne la scomparsa ad un riassorbimento da parte della cellula. Più probabile, invece, è che la rottura della membranella sia dovuta ad un fenomeno puramente meccanico

causato dall'essiccamento. Questa nostra interpretazione, però, è suggerita più dalla particolare struttura di tutta la parete delle cellule ialine che, come sostengono MOZINGO & AL. (1969), dalla conformazione dei singoli pori. Questi, infatti, in *Sphagnum recurvum* P. Beauv., non hanno un bordo eccessivamente rialzato e la loro base, come già detto nelle osservazioni, presenta rugosità solo quando essi si trovano in prossimità di un ispessimento della parete (Tav. V, A, C). La digestione batterica, cui accenna DURHAM (1937), non interverrebbe, a nostro avviso, come causa di rottura della membranelle, ma forse parteciperebbe alla scomparsa dei brandelli, formati in seguito alla rottura e che ancora restano in prossimità del poro.

Infine, le considerazioni che ci fanno pensare che le leucocisti possano rappresentare il « sistema idroconduttore » degli sfagni sono:

1) La morfologia delle leucocisti con i loro particolari ispessimenti, i quali, oltre ad un indubbio significato di sostegno, potrebbero anche avere una certa influenza sull'ascesa delle soluzioni. Tali ispessimenti, infatti, per la loro maggiore capacità di imbibizione rispetto alla restante parete, costituirebbero punti di dilatazione e contrazione di questi otricelli.

2) La costante organizzazione a reticolo delle leucocisti nelle foglioline dei rami degli sfagni, che determina la caratteristica distribuzione dei pori; questi si corrispondono, sia in cellule contigue sia lungo la stessa cellula, in maniera tale da rendere quanto più continua possibile la corrente del liquido circolante (Tav. I, B e Tav. IV, B).

Data l'importanza ecologica e filogenetica (RIGG, 1940, 1951; SMITH, 1955; WATSON, 1964) connessa a tale problema, è nostra intenzione estendere le ricerche anche alla morfologia ultrastrutturale del caulidio degli sfagni, sempre privo di cordone conduttore e la cui porzione corticale è generalmente costituita da più strati concentrici di leucocisti.

RIASSUNTO

Nell'ambito di ricerche sulla conduzione dell'acqua nelle Briofite è stato condotto uno studio comparato al microscopio ottico, al microscopio elettronico a trasmissione ed al microscopio elettronico a scansione, sulla struttura delle leucocisti delle foglioline dei rami di *Sphagnum recurvum* P. Beauv.. Speciale attenzione è stata rivolta ai pori della parete di queste cellule, data la loro importanza ai fini della circolazione dell'acqua.

In particolare vengono studiati, al microscopio elettronico a trasmissione, i rapporti morfologici intercorrenti tra la membrana di chiusura dei pori e la rimanente parete delle leucocisti. Si è potuto stabilire che essa corrisponde allo strato più esterno della parete primaria. Ancora dubbie, invece, sono le modalità con le quali si attuano la rottura e la scomparsa della membrana. Per quanto riguarda la rottura gli AA. ritengono che essa sia da attribuire ad un fenomeno puramente meccanico causato dall'essiccamento e basato più sulla particolare struttura di tutta la parete della cellula che sulla conformazione dei singoli pori. Alla scomparsa dei residui della membrana provvederebbe, probabilmente, anche la digestione batterica.

Infine, viene avanzata l'ipotesi che gli ispessimenti anulati o spiralati della parete delle leucocisti avrebbero, oltre ad un indubbio significato di sostegno, anche una certa influenza sull'assorbimento e sulla conduzione delle soluzioni. A ciò contribuirebbe anche la particolare distribuzione dei pori che si corrispondono in maniera tale da rendere quanto più continua possibile la corrente del liquido circolante.

SUMMARY

Comparative research on the structure of the hyaline cells of the branch leaves of *Sphagnum recurvum* P. Beauv. has been carried out with the optical microscope and scanning and transmission electron microscopes. Special attention was given to the structure of the pores of the cell wall, in relation to their importance in the circulation of water.

Observations with the transmission electron microscope have established that the covering membrane of the pores represents the outermost part of the primary cell wall.

We suggest that the rupture of the membrane occurs as a mechanical phenomenon, caused by drying of the cell. This phenomenon seems to be due mainly to the special structure of the whole cell wall rather than to the conformation of the single pore.

The annular and spiral thickenings of the wall of the hyaline cells play a fundamental role as supporting bars of the cell. They also seem to have an important influence on the absorption and conduction of water. The special distribution of the pores allows the possibility of a continuous flow of the water.

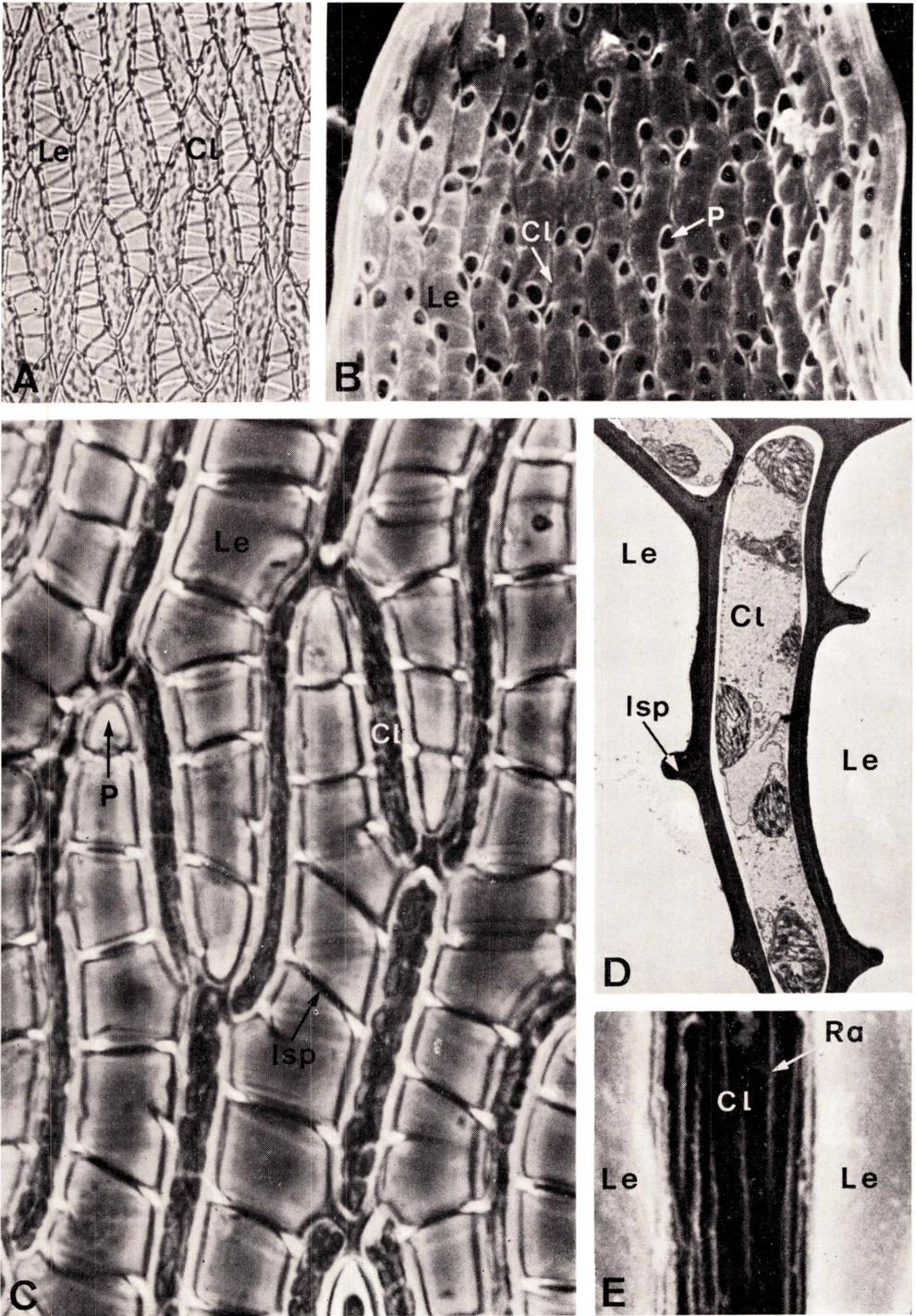
BIBLIOGRAFIA

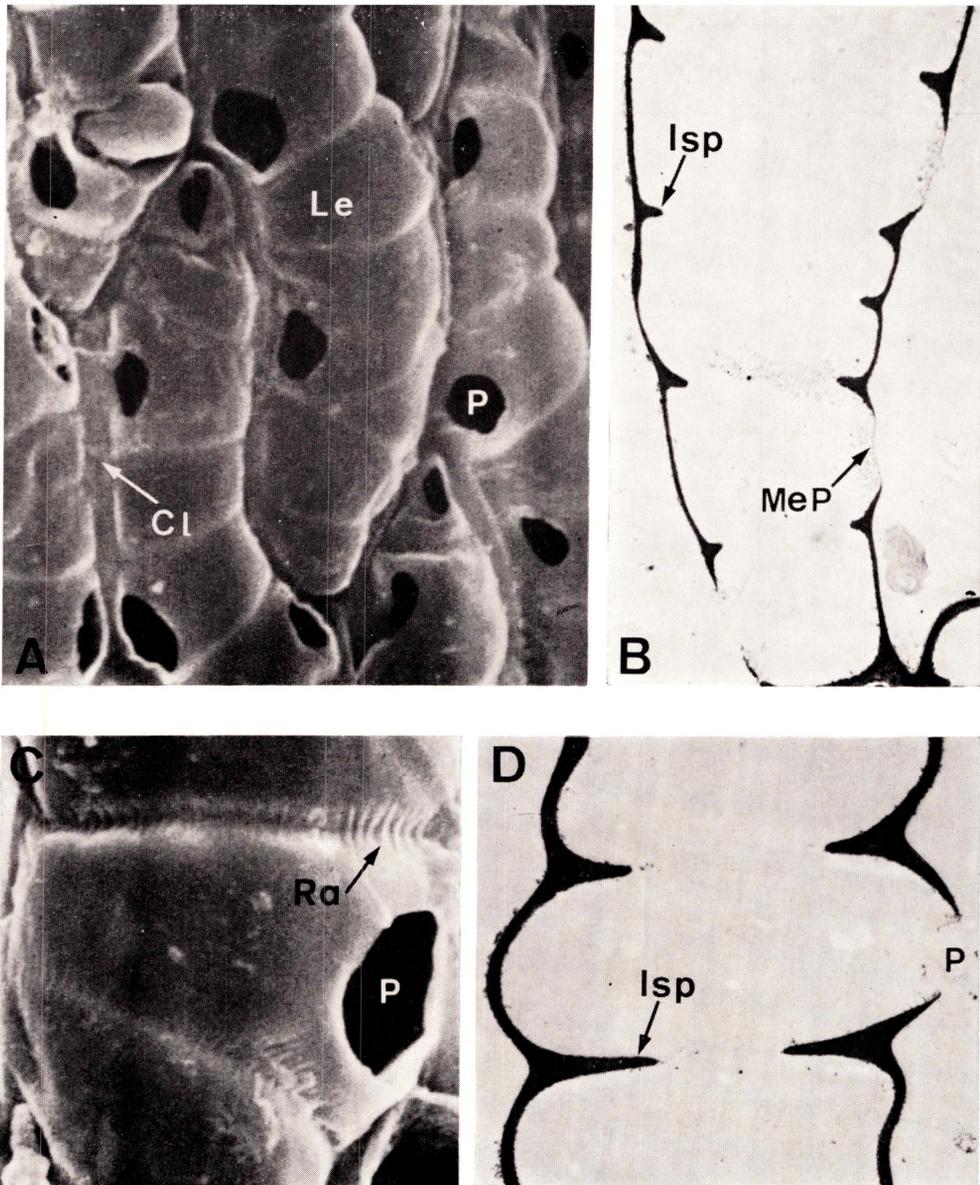
- BRAITHWAITE, R., 1880. *The Sphagnaceae or Peat-Mosses of Europe and North America*. London.
- CAPUTO, G. & R. CASTALDO, 1967. *Prime osservazioni ultrastrutturali sul « sistema conduttore » di Mnium undulatum Weiss.* Delpinoa, n.s., **8-9**: 85-91.
- — & R. CASTALDO, 1968. *Ultrastruttura delle « punteggiature » delle cellule nel caulidio di un muschio: Tortula ruralis (L.) Ehrh. subsp. ruraliformis (Besch.)*. Delpinoa, n.s., **10-11**: 27-32.
- DOZY, F., 1854. *Bijdragen tot de anatomie en phytographie van de Sphagna*. Amsterdam.
- DURHAM, J. R., 1937. *Observations on the branch leaves of Sphagnum*. The Bryologist, **40**: 17-20.
- MOHL, H., 1837. *Anatomische Untersuchungen über die porösen Zellen von Sphagnum*. In: *Vermischte Schriften botanischen Inhalts*: 294-313. Tübingen. 1845.
- MOLDENHAWER, 1812. *Beiträge zur Anatomie der Pflanzen*, 117.
- MOZINGO, H. N., P. KLEIN, Y. ZEEVI & E. R. LEWIS, 1969. *Scanning electron microscope studies on Sphagnum imbricatum*. The Bryologist, **72**: 484-488.
- PAOLILLO, D. J., JR. & J. A. REIGHARD, 1967. *Ultrastructural features of some polytrichaceous moss leaves*. The Bryologist, **70**: 61-69.
- RIGG, G. B., 1940. *The development of Sphagnum bogs in North America*. Bot. Rev., **6**: 666-693.
- —, 1951. *The development of Sphagnum bogs in North America. II*. Bot. Rev., **17**: 109-131.
- SCHIMPER, W. Ph., 1857. *Mémoire pour servir a l'histoire naturelle des Sphaignes*. Paris.
- WATSON, E. V., 1964. *The structure and life of Bryophytes*. London.

TAV. I

- A: Particolare, al microscopio ottico, di una fogliolina, in cui sono ben visibili le leucocisti circondate ciascuna da 4-6 clorocisti (x 800).
- B: Particolare, al microscopio elettronico a scansione, della superficie ventrale di una fogliolina, in cui sono chiaramente evidenti i pori delle leucocisti (x 270).
- C: Particolare, al microscopio ottico in contrasto di fase, di una fogliolina. Si notino i caratteristici ispessimenti anulati e spiralati della parete delle leucocisti (x 2.800).
- D: Una clorocisti al microscopio elettronico a trasmissione (x 2.250).
- E: Particolare, al microscopio elettronico a scansione, della parete di una clorocisti (x 9.000).

Cl: clorocisti; Isp: ispessimento della parete delle leucocisti; Le: leucocisti; P: poro; Ra: raggrinzimenti.



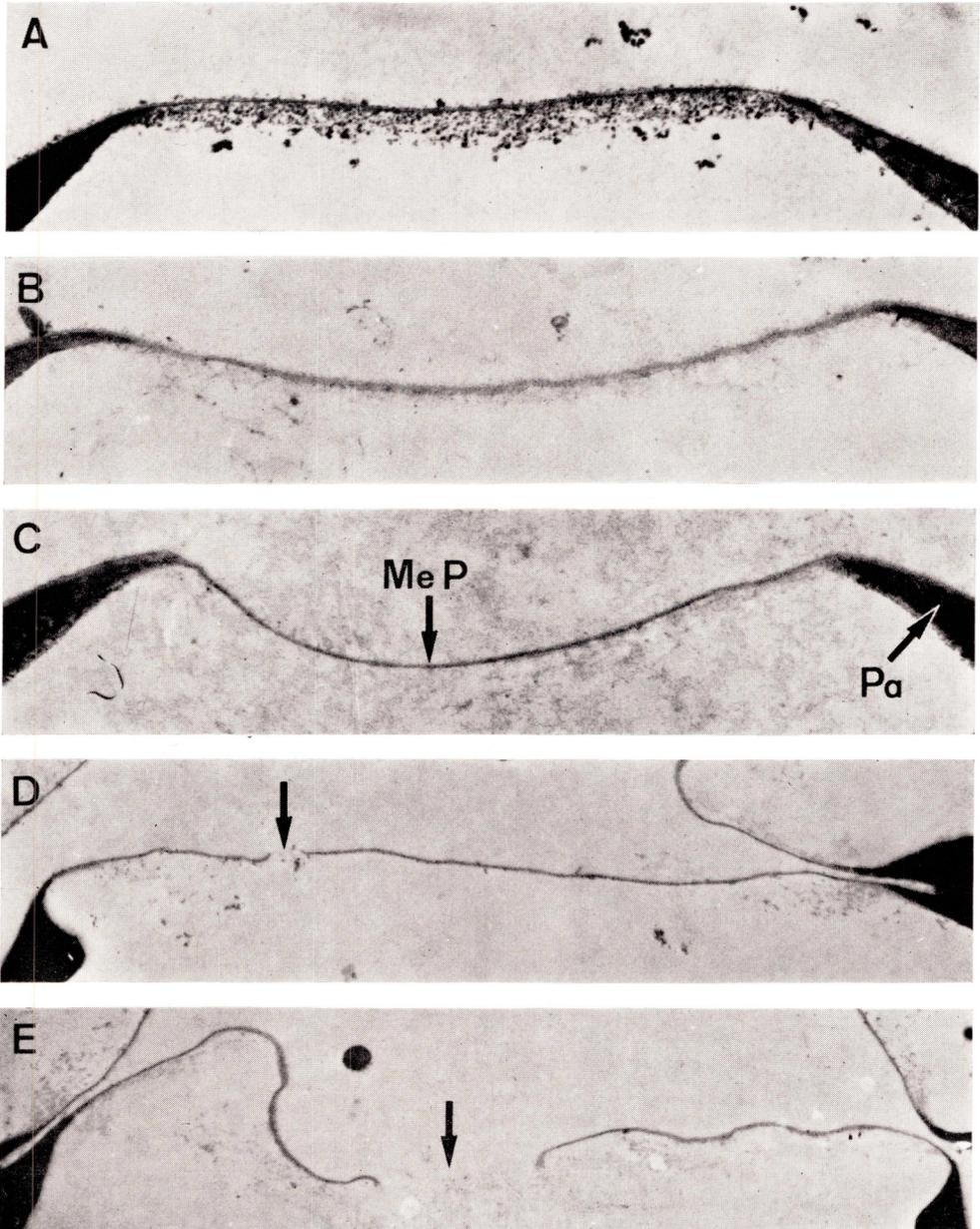


A: Tratti di leucocisti visti al microscopio elettronico a scansione (x 900).

B e D: Particolari di due leucocisti al microscopio elettronico a trasmissione. Sono evidenti i pori ed i caratteristici ispessimenti delle pareti (x di B: 2.250; x di D: 3.250).

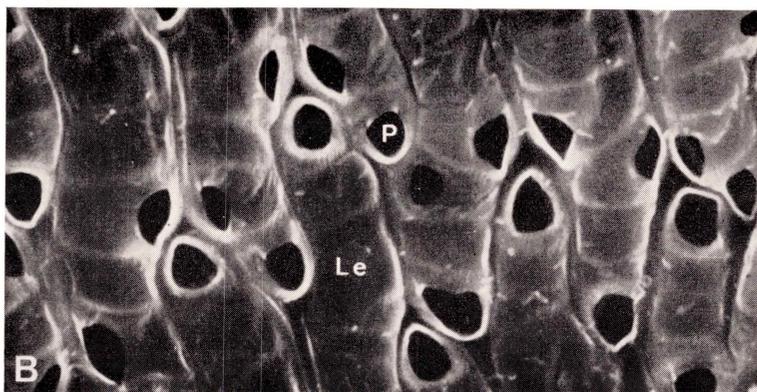
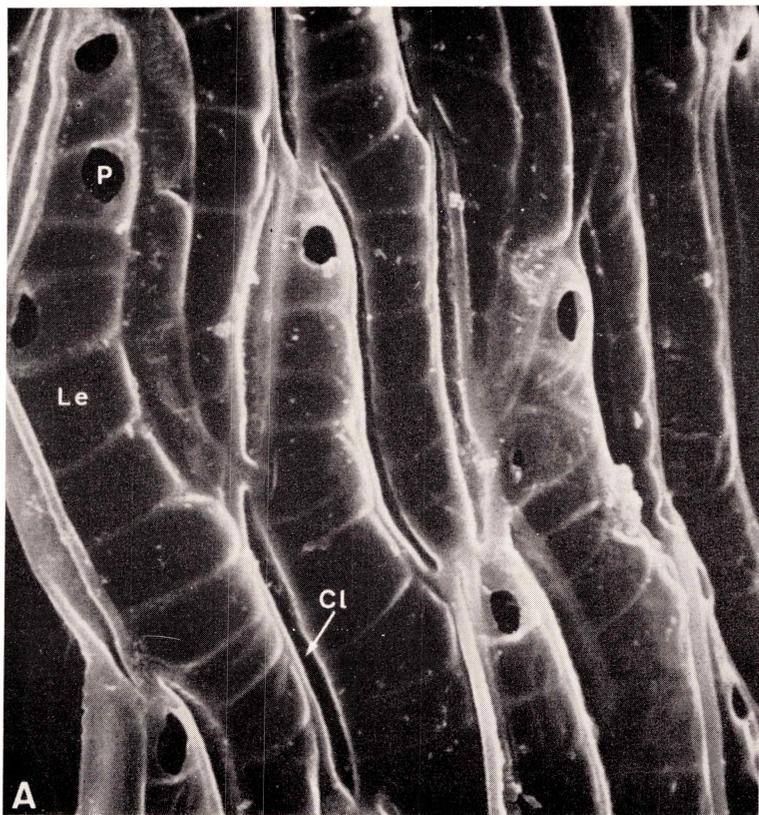
C: Particolare di una leucocisti al microscopio elettronico a scansione. Si notino i raggrinzimenti in corrispondenza degli ispessimenti della parete (x 2.250).

Cl: clorocisti; Isp: ispessimento della parete; Le: leucocisti; MeP: membranello di chiusura del poro; Ra: raggrinzimenti.



Stadi successivi di formazione e di rottura della membranella di chiusura dei pori delle leucocisti, osservati al microscopio elettronico a trasmissione. In D ed in E le frecce indicano l'inizio di rottura della membranella (x 19.500).

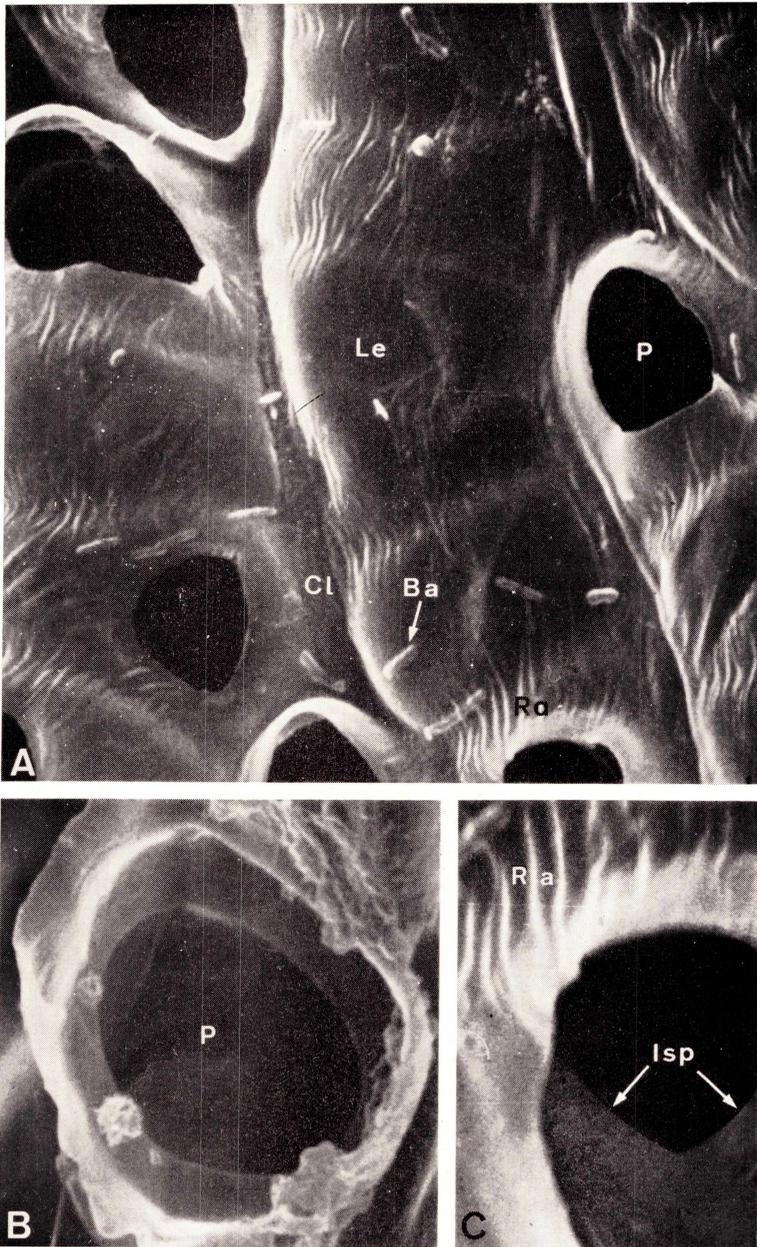
Pa: parete delle leucocisti; MeP: membranella di chiusura del poro.



A: Particolare, al microscopio elettronico a scansione, della superficie dorsale di una fogliolina. Tra le leucocisti sono bene evidenti le clorocisti (x 900).

B: Particolare, al microscopio elettronico a scansione, della superficie ventrale di una fogliolina. Si noti, rispetto ad A, la maggiore frequenza dei pori e la loro caratteristica distribuzione (x 900).

Cl: clorocisti; Le: leucocisti; P: poro.



A: Tratti di leucocisti visti al microscopio elettronico a scansione. All'interno di esse si notano numerosi batteri (x 2.700).

B e C: Pori visti al microscopio elettronico a scansione. In C si osserva, attraverso il poro, un ispessimento della parete (x di B: 11.700; x di C: 8.000).

Ba: batteri; Cl: clorocisti; Isp: ispessimento della parete visto attraverso il poro; Le: leucocisti; P: poro; Ra: raggrinzimenti.