

Rosa Castaldo(*)

**Ultrastruttura di due forme isolate
dalle popolazioni
di *Cyanidium caldarium* (Tilden) Geitler (**)**

In un mio precedente lavoro (CASTALDO, 1968) sull'ultrastruttura del *Cyanidium caldarium* (Tilden) Geitler, rinvenuto ai Campi Flegrei (Napoli), ho riferito di avere osservato, insieme con quest'alga, tra il materiale proveniente dai terreni fumarolici, acidi di tale località, un altro organismo autotrofo, unicellulare, eucariote, molto piccolo (3,5 μ circa), che non mi risultava essere stato mai descritto.

Quest'organismo, che indicai nelle microfotografie come «forma indeterminata», destò subito la mia attenzione perchè, pur avendo come il *Cyanidium* un cloroplasto con membrana limitante semplice, se ne discostava per alcune caratteristiche essenziali. Infatti, la sua organizzazione cellulare differisce da quella che in letteratura è stata attribuita al *Cyanidium caldarium* (ROSEN & SIEGESMUND, 1961; MERCER, BOGORAD & MULLENS, 1962), per un certo numero di caratteri fra i quali:

a) La presenza di un solo mitocondrio, così come si può stabilire da sezioni in serie.

b) La forma del cloroplasto e l'organizzazione del suo sistema lamellare.

(*) Istituto di Botanica della Facoltà di Scienze dell'Università di Napoli (Italia).

(**) Lavoro eseguito con un contributo, per ricerche ecologiche, del Consiglio Nazionale delle Ricerche, Comitato Biologia e Medicina.

c) La mancanza di vacuoli.

La mia segnalazione, circa la presenza di questa «forma indeterminata», è stata successivamente confermata dalle ricerche di DE LUCA & TADDEI (1970). Questi AA., infatti, hanno individuato nelle popolazioni naturali di *Cyanidium caldarium*, provenienti dai terreni fumarolici, acidi dei Campi Flegrei (Napoli), due diverse forme, che essi hanno isolato in colture pure, monoalgali e chiamato provvisoriamente *Cyanidium caldarium forma A* e *C. c. forma B*.

Le mie osservazioni ultrastrutturali su queste due forme mi hanno consentito di stabilire che:

1) La *forma A*, per le sue caratteristiche morfologiche, corrisponde a quella da me indicata precedentemente (CASTALDO, 1968) come «forma indeterminata».

2) La *forma B* presenta, invece, caratteri ultrastrutturali corrispondenti a quelli descritti per il *Cyanidium caldarium* (Tilden) Geitler da ROSEN & SIEGESMUND (1961), da MERCER, BOGORAD & MULLENS (1962) e da me (CASTALDO, 1968) ed è, perciò, sulla base delle attuali conoscenze, senz'altro attribuibile a questa specie.

Lo scopo di questo lavoro è di approfondire l'ultrastruttura della *forma A*, soprattutto per quanto riguarda il suo cloroplasto, per accertare:

I) Se tale forma possa considerarsi sistematicamente vicina alla *forma B* e, quindi, al *Cyanidium*, col quale, tra l'altro, divide l'ecologia (è anch'essa, infatti, termofila ed acidofila);

II) Se tale forma possa essere ritenuta un'associazione simbiotica («sincianosi»: PASCHER, 1914, 1929; GEITLER, 1924, 1959 a, 1959 b), dato che le caratteristiche del suo cloroplasto ricordano quelle delle cianelle (Cianofeece simbiotiche: HALL & CLAUS, 1963, 1967; LEFORT, 1965; BOURDU & LEFORT, 1967; SCHNEPF, KOCH & DEICHGRÄBER, 1966).

MATERIALE E METODI

Come si è detto precedentemente, i due organismi, oggetto di questo lavoro, provengono dai terreni fumarolici, acidi dei Campi Flegrei (Napoli) e sono stati isolati in colture pure, monoalgali, presso l'Istituto di Botanica della Facoltà di Scienze dell'Università di Napoli, da DE LUCA & TADDEI (1970).

Sia la *forma A* che la *forma B* sono state fissate parte con una soluzione non tamponata di KMnO_4 al 2% per 30' a 4°C e parte con una soluzione di aldeide glutarica al 3% in tampone fosfatico a pH 6,5 per 2h a 4°C. A questo secondo tipo di fissazione si è fatta seguire una postfissazione in una soluzione di OsO_4 al 2% nello stesso tampone a pH 6,5 per 3h a 4°C.

Dopo lavaggio, rispettivamente, in acqua bidistillata ed in tampone fosfatico a pH 6,5 si è proceduto alla disidratazione con una serie di alcoli etilici a concentrazione crescente e, quindi, alla inclusione in Epon 812.

I blocchetti, ottenuti per polimerizzazione in stufa a 60°C per 48h, sono stati sezionati con un ultramicrotomo Ultratome III della LKB. Le sezioni sono state contrastate con acetato di uranile (5') e citrato di piombo (5'). Per le osservazioni e le microfotografie si è utilizzato un microscopio elettronico Siemens Elmiskop 1A, presso il Centro di Studio di Microscopia Elettronica della Facoltà di Scienze dell'Università di Napoli.

OSSERVAZIONI

La *forma A* di DE LUCA & TADDEI (1970) corrisponde a quella da me indicata, in un precedente lavoro (CASTALDO, 1968), come « forma indeterminata » e, in base alle sue caratteristiche ultrastrutturali, non mi risulta essere stata mai descritta. Essa è subellittica e misura, in direzione del suo asse maggiore, in cellule adulte e non in divisione, generalmente $3,5 \mu$ (Tavv. I e II).

La parete cellulare, omogenea e molto sottile, ha uno spessore di circa $0,02\ \mu$ (Tav. II).

Il plasmalemma circonda un protoplasto che colpisce, a prima vista, per la sua singolare organizzazione. Contiene, infatti, un unico grosso cromatoforo ed un solo mitocondrio, che, con il nucleo, sembrano contendersi l'esiguo volume cellulare disponibile (Tav. II).

Il cloroplasto occupa la maggior parte della cellula ed ha un aspetto lenticolare, con una superficie convessa (lato aderente al plasmalemma) ed una leggermente concava (lato rivolto verso l'interno della cellula). Talvolta questa concavità è notevolmente pronunciata, nel qual caso questo organite tende ad assumere la forma di una coppa (Tav. II: C).

Il cromatoforo, per la sua ultrastruttura, non sembra potersi ascrivere a nessun tipo di cloroplasto finora osservato, anche se la presenza di una membrana limitante semplice lo avvicina a quello del *Cyanidium caldarium* (Tilder) Geitler, descritto da ROSEN & SIEGESMUND (1961), da MERGER, BOGORAD & MULLENS (1962) e da me CASTALDO (1968) (Tav. VI: A, B).

Nelle sezioni fissate con permanganato di potassio esso appare costituito da un sistema di tilacoidi, una dozzina circa, indipendenti, molto allungati, disposti concentricamente, o più raramente a spirale, alla periferia del plastidio e distanti tra loro $500\ \text{A}$. Il centro di questo particolare cloroplasto è generalmente occupato dal solo stroma, nel quale, talvolta, si spingono i tilacoidi più interni. In quest'area si distinguono una o più zone trasparenti agli elettroni, attraversate da numerose e sottili fibrille, che ricordano quelle di DNA osservate nel nucleoplasma dei Batteri e delle Cianofitee (RYTER & KELLENBERGER, 1958; HOPWOOD & GLAUERT, 1960; RIS & SINGH, 1961; LEAK, 1967) (Tav. III).

Il trattamento con permanganato di potassio, però, ci dà un'immagine di questo cromatoforo priva di molti dettagli che, invece, appaiono chiaramente dopo fissazione con glutaraldeide, seguita da una postfissazione osmica. L'area centrale, infatti,

si presenta, come nelle Cianoficee, piena di ribosomi, riuniti in densi ammassi, che si spingono anche negli spazi interlamellari dei tilacoidi più interni (Tavv. IV e V).

In alcuni casi, sia nei preparati trattati con permanganato che in quelli trattati con glutaraldeide-osmio, i tilacoidi presentano una struttura tripla. Essi risultano, infatti, di una linea centrale, molto elettrondensa, dello spessore di circa 40 A e di due linee marginali più chiare, spesse circa 20 A e separate da quella mediana da uno spazio trasparente agli elettroni di circa 50 A (Tavv. IV e V). Questo particolare aspetto dei tilacoidi è stato anche osservato da MERCER, BOGORAD & MULLENS (1962) nel *Cyanidium caldarium* e si ritrova frequentemente nelle Cianoficee.

Nelle immagini, ottenute dopo fissazione con glutaraldeide-osmio, inoltre, appaiono, talvolta, delle granulazioni di circa 200 A di diametro, perfettamente aderenti alla superficie esterna dei tilacoidi, che, anche se poco elettrondense e, quindi, non sempre bene evidenti, richiamano quelle descritte da GANTT & CONTI (1965, 1966) per il *Porphyridium cruentum*, da GANTT, EDWARDS & CONTI (1968) per il *P. aerugineum*, da LEFORT (1965), BOURDU & LEFORT (1967), per le cianelle di *Glaucocystis nostochinearum* e di *Cyanophora paradoxa* e che vanno sotto il nome di cianosomi o ficobilisomi (Tav. IV).

Infine, in alcune sezioni, il cromatoforo, che, come ho detto, è delimitato da una membrana semplice, sembra essere circondato da una seconda membrana unitaria, dall'aspetto crenulato, più sottile e non uniformemente aderente ad esso, sulla cui origine ritornerò più avanti.

Il citoplasma, nei preparati fissati con glutaraldeide-osmio, si presenta ricchissimo di ribosomi che risultano, come di regola, di dimensioni maggiori rispetto a quelli presenti all'interno del cromatoforo (Tav. V).

Il citoplasma, inoltre, contiene un solo mitocondrio di forma allungata e notevolmente sviluppato in rapporto alle dimensioni della cellula e degli altri organuli cellulari. La pre-

senza di un unico mitocondrio è da tenere in notevole considerazione, dal momento che sono noti solo altri due organismi con questa caratteristica: *Chromulina pusilla* (MANTON, 1959) e *Micromonas* (MANTON & PARKE, 1960; MANTON, 1961), appartenenti entrambi ai Fitoflagellati.

Altro fatto degno di nota è che il mitocondrio occupa nella cellula una posizione costante tra il nucleo ed il cromatoforo ed aderisce sempre alla superficie concava di quest'ultimo. Ed anzi, quando il cloroplasto infossa ancor più la sua superficie concava, foggiandosi a coppa, esso segue di pari passo questo processo di curvatura, assumendo l'aspetto di un cuneo (Tav. II: C).

La rimanente parte della cellula è occupata dal nucleo, lobato, circondato, come di norma, da una doppia membrana con pori bene evidenti, che si continua frequentemente in lunghe cisterne del reticolo endoplasmatico (Tav. II).

Sono presenti, inoltre, dittiosomi, che appaiono costituiti dalla sovrapposizione di non più di 4 sacculi (Tav. II: D).

La periferia del citoplasma è occupata da numerosi granuli di riserva, di dimensioni molto variabili. Essi presentano una superficie finemente granulosa ed inoltre, in sezione, non mostrano una struttura omogenea, ma vi si può distinguere una porzione periferica densa agli elettroni, che circonda un nucleo centrale chiaro. Sulla loro natura chimica non sono ancora in grado di dare dati precisi. Per ora ho potuto soltanto notare che essi resistono alla fissazione con glutaraldeide-osmio, mentre vengono distrutti dal permanganato di potassio al 2%, se il trattamento viene prolungato oltre i 30' (Tav. V: A).

La *forma A* di DE LUCA & TADDEI (1970) produce endospore. Ciascuna cellula madre forma costantemente 4 endospore, che vengono liberate in seguito a rottura della parete.

Non ho ancora elementi sufficienti a descrivere le varie tappe di questa moltiplicazione. Tuttavia ho potuto notare che dalla cellula madre, in due successive divisioni, si formano il

nucleo, il cloroplasto ed il mitocondrio delle quattro cellule figlie e che solo al termine di questo processo compaiono le pareti delle quattro endospore. La cellula madre è facilmente riconoscibile per le sue dimensioni ($5\ \mu$ circa) e per il citoplasma che è ricco di vescicole golgiane, in relazione alla formazione dei nuovi framtoplasti e delle nuove pareti.

Per quanto concerne la *forma B* di DE LUCA & TADDEI (1970), essa presenta, invece, caratteri ultrastrutturali corrispondenti a quelli descritti in letteratura per il *Cyanidium caldarium* (Tilden) Geitler (ROSEN & SIEGSMUND, 1961; MERCER, BOGORAD & MULLENS, 1962) ed è, perciò, da attribuirsi a questa specie.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le osservazioni sopra riportate per la *forma A* possono, in sintesi, così riassumersi:

si tratta di un organismo unicellulare, eucariote, di piccole dimensioni ($3,5\ \mu$ circa), molto primitivo, che si riproduce formando costantemente 4 endospore.

Tra le caratteristiche più salienti del suo citoplasma, che può dirsi ridotto all'essenziale, sono da ricordare:

— La presenza di un solo cloroplasto, limitato da una membrana semplice.

— La presenza di un solo mitocondrio.

— L'assenza di vacuoli.

L'insieme di tali caratteri configura un organismo che non mi risulta essere stato mai segnalato e sulla cui natura è possibile formulare le seguenti ipotesi:

I) Alga molto primitiva, vicina sistematicamente alla *forma B* e, quindi, al *Cyanidium caldarium* (Tilden) Geitler.

II) Organismo derivante dall'associazione di un'alga apoplastidiata, o eventualmente, di un protozoo con una cianella (Cianoficea endosimbiotica).

Per quel che concerne la prima ipotesi, uno dei caratteri che, a mio giudizio, veramente avvicina la *forma A* alla *forma B* e, quindi, al *Cyanidium caldarium* è la presenza, in entrambi, di un cloroplasto con membrana limitante semplice. Questo particolare, infatti, ha, come ho detto precedentemente (CASTALDO, 1968), un'importanza ontogenetica e filogenetica notevolissima.

Un'altra caratteristica da tenere nella dovuta considerazione è la particolare struttura tripla che mostrano i tilacoidi del cloroplasto della *forma A*, in determinate condizioni di fissazione. Tale struttura si riscontra frequentemente nelle Cianoficce (ECHLIN, 1964; ALLEN, 1968a, 1968b) ed è stata anche osservata da MERCER, BOGORAD & MULLENS (1962) nel *Cyanidium caldarium*.

Per il resto i cromatofori delle due forme *A* e *B*, anche se presentano un sistema lamellare pressoché identico, sia per il numero dei tilacoidi che per la distanza che separa questi ultimi tra loro, non possono dirsi simili, neppure quando il cloroplasto della *forma A* tende ad assumere lo stesso aspetto a coppa, che si riscontra in quello della *forma B*.

A conferma di ciò, basti pensare alla presenza, nel cromatoforo della *forma A*, di un'ampia area centrale priva di tilacoidi in cui, come ho riferito nelle mie osservazioni, si distinguono una o più zone trasparenti agli elettroni, attraversate da numerose fibrille di DNA, zone che ricordano quelle osservate, per la prima volta, da RYTER & KELLENBERGER (1958) nel nucleoplasma dei Batteri e da HOPWOOD & GLAUERT (1960), RIS & SINGH (1961) e LEAK (1967) nel nucleoplasma delle Cianoficce.

La suddetta area centrale, che non si ritrova nel cromatoforo della *forma B* e che non è stata mai descritta nel cloroplasto di *Cyanidium* o di altre alghe, nè tanto meno in quelli delle piante superiori, si conserva sempre bene evidente, anche

quando il cromatoforo si foggia a coppa e, quindi, più si avvicina morfologicamente a quello di *Cyanidium*.

Un altro elemento, che l'organismo in questione ha in comune con la *forma B* è la produzione di endospore. Questo dato, però, ha un'importanza relativa perché si riscontra in molti gruppi di alghe.

Tra i caratteri nettamente sfavorevoli all'ipotesi, secondo la quale la *forma A* debba considerarsi un'alga molto primitiva, vicina sistematicamente al *Cyanidium caldarium* (Tilden) Geitler e, quindi, alla *forma B*, sono da ricordare:

1) La presenza di un unico mitocondrio. Questo fatto ha, senza dubbio, un significato filogenetico da non sottovalutare, tanto più se si pensa che si conoscono soltanto altri due organismi nei quali si verifica questa condizione: *Chromulina pusilla* (MANTON, 1959) e *Micromonas* (MANTON & PARKE, 1960; MANTON, 1961), appartenenti entrambi ai Fitoflagellati.

2) L'assenza di vacuolo, presente, invece, in *Cyanidium caldarium* e nella *forma B*.

3) La presenza di un abbondante incluso citoplasmatico solido, non dimostrato in *Cyanidium* e nella *forma B*.

Queste differenze ultrastrutturali, riscontrate tra la *forma A* e la *forma B*, mettono chiaramente in evidenza che si tratta di due organismi eucarioti, primitivi, che, anche se affini, specialmente per alcune caratteristiche del cloroplasto (delimitato in entrambi da una membrana semplice e contenente in entrambi clorofilla *a* e C-ficocianina), appartengono, senza dubbio, ad entità sistematiche diverse. Ciò del resto trova conferma nei seguenti fatti: a) le due forme sono state isolate in colture pure, monoalgali; b) entrambe le forme sono termofile ed acidofile, ma la *forma B* presenta una maggiore acidofilia e termofilia (DE LUCA & TADDEI, 1970). Inoltre a 40°C la *forma A*, al contrario della *forma B*, utilizza i nitrati come fonte di azoto (DE LUCA & TADDEI, comunicazione personale).

La seconda ipotesi, circa la possibilità che la *forma A* derivi dall'associazione di un'alga apoplastidiata, o eventualmente di un protozoo, con una Cianoficea, è appoggiata dalla particolare ultrastruttura del cloroplasto, che ricorda quella delle alghe azzurre simbiotiche.

Prima di passare in rassegna singolarmente le caratteristiche che consentono di sostenere una tale interpretazione, è indispensabile soffermarsi brevemente su alcuni tra i più significativi esempi noti di alghe azzurre che vivono in cellule prive di plastidi, nelle quali esse fungono da cromatofori fotosinteticamente attivi.

Queste Cianoficee endofite, che PASCHER (1929) chiama «Cyanellae», sono generalmente unicellulari ed appartengono, per la maggior parte, alle Chroococcales (FRITSCH, 1959).

Sono noti anche esempi di alghe azzurre endofite filamentose. È questo il caso di *Geosiphon pyriforme*, un'associazione simbiotica formata dall'unione tra un Ficomicete ed un *Nostoc*, probabilmente il *Nostoc sphaericum*.

Il *Geosiphon* rappresenta, però, una forma di sincianosi molto primitiva, in quanto l'ospite e la cianella, se vengono separati, sono capaci entrambi, in presenza di un adatto substrato, di un'esistenza indipendente (KNAPP, 1933). Studi di SCHNEPF (1964) sull'ultrastruttura di questa sincianosi si sono rivelati particolarmente interessanti, avendo dimostrato che il *Nostoc* di *Geosiphon* non subisce alcuna alterazione morfologica, quale risultato di tale associazione.

Questa cianella, conserva, infatti, le caratteristiche ultrastrutturali delle alghe azzurre libere, anche per quanto riguarda l'aspetto della sua parete cellulare. Ciò spiega la capacità di entrambi i partner di condurre una vita autonoma.

A differenza di *Geosiphon* che, ripeto, potrebbe considerarsi una sincianosi primitiva, a mio giudizio, molto vicina fisiologicamente alle ectocianosi (PASCHER, 1914, 1929), esistono esempi di endocianosi in cui le alghe azzurre sono così stretta-

mente legate all'ospite, che, se vengono separate, sono in grado di vivere solo per poche ore.

E' questo il caso di *Cyanophora paradoxa* e *Glaucocystis nostochinearum*.

In esse le numerose cianelle presenti mancano completamente di parete cellulare e sono separate dal citoplasma dell'ospite da una membrana semplice, che corrisponde al loro plasmalemma, Il cromatoplasma ed il nucleoplasma conservano, invece, intatta la loro struttura, apparendo del tutto simili a quelli delle Cianofcee libere (HALL & CLAUS, 1963, 1967; LEFORT, 1965; BOURDU & LEFORT, 1967; ECHLIN, 1966, 1967; SCHNEPF, KOCH & DEICHGRÄBER, 1966).

Le caratteristiche ultrastrutturali delle sincianosi, qui sopra riportate, confrontate con quelle della *forma A*, mi hanno consentito di rilevare che il cloroplasto di quest'ultima ricorda le cianelle di *Glaucocystis* e di *Cyanophora* per i seguenti caratteri:

a) La presenza di una membrana limitante semplice, che potrebbe essere considerata come l'equivalente del plasmalemma di tali cianelle. In alcune microfotografie, inoltre, queste appaiono circondate da una seconda membrana unitaria, dall'aspetto crenulato, più sottile e non perfettamente aderente, che si ritrova spesso anche intorno al cromatoforo in questione e che, ammettendo l'ipotesi di una sua origine simbiotica, andrebbe interpretata come plasmalemma dell'ospite che lo ha fagocitato. Secondo HALL & CLAUS (1967), invece, questa membrana più esterna si sarebbe formata nell'interfacie tra il citoplasma dell'ospite e la cianella. Comunque, in entrambi i casi, essa va considerata come una struttura citoplasmatica dell'ospite e non dell'alga azzurra.

b) La presenza nella porzione centrale di questo cloroplasto, priva di tilacoidi, di una o più aree trasparenti agli elettroni, ricche di sottili fibrille di DNA, che ricordano l'area centrale delle cianelle di *Glaucocystis*, nonchè il nucleoplasma dei Batteri e delle Cianofcee libere.

c) La disposizione periferica dei tilacoidi del tutto simile al cromatoplasma delle Cianoficee libere e delle cianelle di *Glaucozystis* e di *Cyanophora*.

d) La particolare struttura tripla che presentano i tilacoidi in alcune microfotografie. Questo interessante aspetto ultrastrutturale, evidente sia nelle microfotografie dei preparati fissati con permanganato che in quelli fissati con glutaraldeide-osmio, è stato segnalato, fino ad oggi, soltanto per le lamelle fotosintetiche di alcune Cianoficee (ECHLIN, 1964; ALLEN, 1968a, 1968b) e di *Cyanidium caldarium* (MERCER, BOGORAD & MULLENS, 1962). Ed anzi, LEFORT (1960), studiando il cromatoplasma di *Phormidium inundatum*, fa, a questo proposito, un'interessante ipotesi di lavoro, secondo la quale le due membrane unitarie, che delimitano ciascun tilacoide di quest'alga azzurra, sarebbero, di norma, strettamente aderenti tra loro e si separerebbero soltanto allorchè interviene un rigonfiamento per effetto della fissazione. Ciò sembra in accordo con i risultati da me ottenuti, in quanto tale struttura tripla scompare nelle microfotografie ottenute da materiale fissato con permanganato al 2% per un periodo superiore a 30'. Con tempi di fissazione più brevi ed a parità di concentrazione essa appare perfettamente conservata.

Il fatto che MERCER, BOGORAD & MULLENS (1962) abbiano segnalato anche per la lamelle fotosintetiche del *Cyanidium caldarium* una struttura talvolta tripla è di notevole interesse, poichè è un dato che, accanto a quello della membrana semplice limitante il cloroplasto, potrebbe, eventualmente, in futuro, consentire di supporre per il cloroplasto del *Cyanidium* un'analogia origine simbiotica. Quest'ipotesi, in passato, è già stata formulata da ALLEN (1959), che però, la esclude come «*estremamente inverosimile*», perchè il *Cyanidium*, a differenza delle Cianoficee, «*è normalmente privo di pigmenti se cresce al buio*».

e) La presenza nel cromatoforo di cianosomi, già messi in evidenza nelle cianelle di *Glaucozystis nostochinearum* e di *Cyanophora paradoxa* (LEFORT, 1965; BOURDU & LEFORT, 1967).

In conclusione sulla base delle considerazioni critiche sopra riportate, indubbiamente non è facile definire la natura di questa *forma A* rinvenuta, insieme con la *forma B*, nel materiale proveniente dai Campi Flegrei (Napoli).

L'ipotesi più facile sarebbe quella di considerare la *forma A* come un'alga primitiva vicina al *Cyanidium caldarium*, dal momento che la comunanza di alcuni aspetti ultrastrutturali, quali la presenza in entrambi di un cloroplasto delimitato da una membrana semplice e l'affinità di esigenze ecologiche, giustificherebbe ampiamente l'appartenenza ad uno stesso gruppo, per altro così incertamente collocato sotto il profilo sistematico.

Ma l'evidenza e la fundamentalità di alcune caratteristiche proprie di questa *forma A*, il loro indubbio valore filogenetico (basti pensare alla presenza di un unico mitocondrio) mi spingono a considerare la *forma A* come un'associazione simbiotica, facendomi propendere per la seconda ipotesi da me avanzata. Un'ipotesi certamente suggestiva, ma con numerosi e precisi riferimenti a dati verificati per altre sincianosi.

Accettando definitivamente l'origine simbiotica del cloroplasto in questione, resterebbe ancora da considerare la natura dell'organismo che l'ospita.

Infatti, anche se l'ipotesi più probabile sembrerebbe quella di considerare quest'ultimo come un'alga apoplastidiata, l'assenza totale e costante di vacuoli non consente, allo stato, di escludere che possa trattarsi di un protozoo. E ciò tanto più se si tiene conto che sono stati descritti (PASCHER, 1914, 1929; GEITLER, 1959 a; FRITSCH, 1959; BUCHNER, 1965; Mc LAUGHLIN & ZAHL, 1966) numerosi esempi di protozoi che ospitano nel loro citoplasma alghe azzurre, trasformandosi, così, in organismi autotrofi.

Il particolare della presenza in questa *forma A* di un solo mitocondrio, caratteristica questa ritrovata solo in *Chromulina pusilla* (MANTON, 1959) ed in *Micromonas* (MANTON & PARKE, 1960; MANTON, 1961), potrebbe far pensare ad un Flagellato e, quindi, avallare quest'ipotesi.

E' mia intenzione, perciò, di proseguire da un lato lo studio di questa « forma indeterminata » (*forma A* di DE LUCA & TADDEI), anche nel tentativo di inquadrarla sistematicamente, dall'altro di approfondire l'ultrastruttura del cloroplasto del *Cyanidium caldarium*. Ulteriori dati potrebbero, infatti, far convergere le due ipotesi, formulate a proposito della *forma A*, diminuendo, così, la distanza che, attualmente, separa quest'ultima dal *Cyanidium caldarium*.

RIASSUNTO

Vengono riportati i risultati delle osservazioni sull'ultrastruttura di due alghe, unicellulari, eucariote, molto primitive, provenienti dai terreni fumarolici acidi dei Campi Flegrei (Napoli).

Questi due organismi sono stati isolati in colture pure, monoalgali, presso l'Istituto di Botanica della Facoltà di Scienze dell'Università di Napoli, da DE LUCA & TADDEI (1970) e chiamati provvisoriamente da questi AA. *Cyanidium caldarium forma A* e *C. c. forma B*.

La *forma A* corrisponde a quella indicata precedentemente dall'A. (CASTALDO, 1968) come « forma indeterminata » e non risulta essere stata ancora descritta. Essa è subellittica e misura in direzione del suo asse maggiore, generalmente 3,5 μ , in cellule adulte e non in divisione. Le sue caratteristiche più salienti sono: 1) una sottile parete cellulare; 2) un nucleo morfologicamente definito; 3) un cloroplasto lamellare, che per la sua ultrastruttura e per la presenza di una membrana limitante semplice ricorda una cianella (Cianoficea endosimbiotica: HALL & CLAUS, 1963, 1967; LEFORT, 1965; BOURDU & LEFORT, 1967; ECHLIN, 1966, 1967; SCHNEPF, KOCH & DEICHGRÄBER, 1966); 4) un solo mitocondrio; 5) uno scarso reticolo endoplasmatico; 6) pochi dittiosomi; 7) numerosi granuli di riserva, che occupano la periferia del citoplasma; 8) la mancanza di vacuoli; 9) la produzione di endospore (costantemente in numero di 4 per ogni cellula madre).

In base a tali caratteri e soprattutto in base alla presenza del particolare cloroplasto, provvisto di una membrana semplice, e dell'unico mitocondrio, l'A. discute la natura di questo organismo, formulando le seguenti ipotesi: I) alga molto primitiva; II) forma derivante dall'associazione di un'alga apoplastidiata, o eventualmente di un protozoo, con una cianella (Cianoficea simbiotica).

Per quanto concerne la *forma B* di DE LUCA & TADDEI (1970), essa presenta, invece, caratteri ultrastrutturali corrispondenti a quelli descritti per il *Cyanidium caldarium* (Tilden) Geitler da ROSEN & SIEGSMUND (1961), da MERCER,

BOGORAD & MULLENS (1962) e dall'A. (CASTALDO, 1968) ed è, perciò, per lo meno in base all'attuale letteratura, senz'altro attribuibile a questa specie.

Il confronto tra la morfologia della *forma A* e quella della *forma B* dimostra che si tratta di due organismi eucarioti, primitivi, che, anche se affini, specialmente per alcune caratteristiche del cloroplasto (delimitato in entrambi da una membrana semplice e contenente in entrambi clorofilla *a* e C-ficocianina), appartengono, senza dubbio, ad entità sistematiche diverse. Ciò, del resto, è confermato dai seguenti fatti: a) le due forme sono state isolate in colture pure; b) le cellule della *forma A* sono prive di vacuoli e presentano sempre un unico mitocondrio, quelle della *forma B*, invece, sono provviste di vacuolo e di numerosi mitocondri; c) entrambe le forme si moltiplicano per endospore, ma le cellule madri della *forma A* producono costantemente 4 endospore, mentre quelle della *forma B* ne producono da 4 a 32; d) la *forma A*, al contrario della *forma B*, utilizza i nitrati come fonte di azoto; e) entrambe sono termofile ed acidofile, ma la *forma B* presenta una maggiore acidofilia e termofilia.

SUMMARY

The Author reports on the results of observations carried out on the ultrastructure of two very primitive, unicellular eucaryotic algae growing near acid fumaroles at Campi Flegrei (Naples).

These two organisms were isolated in 1970 in pure unialgal cultures by DE LUCA & TADDEI at the Institute of Botany of the University of Naples. They were called provisionally *Cyanidium caldarium forma A* e *C. c. forma B*.

The *forma A* is the same which had been previously referred to by the Author (CASTALDO, 1968) as an «indefinite form» and it does not seem to have been described as yet. It is subelliptic in form and it generally is $3,5\mu$ in size along its longest diameter in fully developed cells not yet in their stage of division. Its main characteristics are: 1) a thin cell wall; 2) a morphologically well defined nucleus; 3) a lamellar chloroplast which could be compared to a *Cyanella* (endosymbiotic blue-green alga: HALL & CLAUS, 1963, 1967; LEFORT, 1965; BOURDU & LEFORT, 1967; ECHLIN, 1966, 1967; SCHNEPF, KOCH & DEICHGRÄBER, 1966) because of its ultrastructure and owing to the presence of a single limiting membrane; 4) only one mitochondrion; 5) a scanty endoplasmic reticulum; 6) a few Golgi bodies; 7) a reserve of several granules occupying the peripheral area of the cytoplasm; 8) the absence of vacuoles; 9) the production of endospores (constantly 4 for each mother cell).

The Author discusses the nature of this organism on the basis of its characteristics and chiefly considering the presence of its particular kind of chloroplast, provided with a single membrane, and of its single mitochondrion. Two hypotheses are formulated: I) It is a very primitive eucaryotic alga; II) It is a form deriving from the association of an alga

devoid of chromatophores, or even of a kind of protozoa, with a *Cyanella* (endosymbiotic blue-green alga).

As far as the DE LUCA & TADDEI's *forma B* (1970) is concerned it shows, on the contrary, ultrastructural characteristics corresponding to those of the *Cyanidium caldarium* (Tilden) Geitler as described by ROSEN & SIEGESMUND (1961), by MERCER, BOGORAD & MULLENS (1962) and by the Author (CASTALDO, 1968), and therefore — at least on the basis of the literature presently available — it can certainly be included in that species.

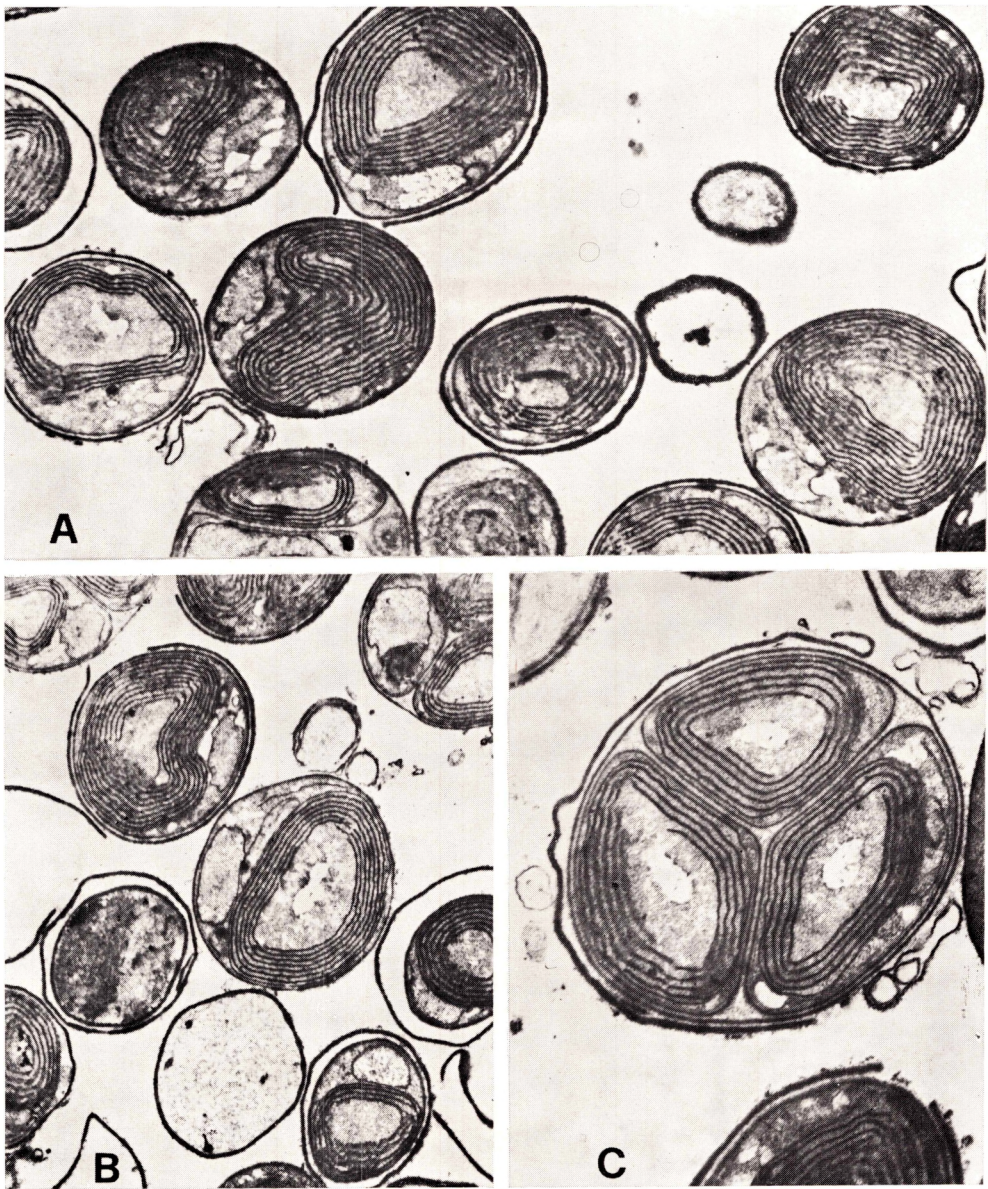
The comparison between the morphological characteristics of the *forma A* and *forma B* shows that they are two eucaryotic, primitive organisms. Although they are similar, especially because of some features of their chloroplasts — both of which are bounded by a single membrane and contain chlorophyll *a* and C-phycoerythrin — they belong without any doubt to two different systematic groups. This is also confirmed by the following facts: a) the two forms were isolated in pure cultures; b) the cells of the *forma A* are provided with no vacuole and they always show a single mitochondrion, while the *forma B* is provided with both a vacuole and several mitochondria; c) both forms reproduce by endospores but the mother cells of the *forma A* constantly generate 4 endospores while those of the *forma B* generate from 4 to 32; d) the *forma A* utilizes nitrates as a source of nitrogen, while the *forma B* doesn't; e) both are thermophilic and acidophilic, but the *forma B* shows a greater acidophilia and thermophilia.

BIBLIOGRAFIA

- ALLEN, M. B., 1959. *Studies with Cyanidium caldarium, an anomalously pigmented chlorophyte*. Arch. Mikrobiol., **32**: 270-277.
- ALLEN, M. M., 1968 a. *Photosynthetic membrane system in Anacystis nidulans*. Journ. Bacteriol., **96**: 836-841.
- —, 1968 b. *Ultrastructure of the cell wall and cell division of unicellular blue-green algae*. Journ. Bacteriol., **96**: 842-852.
- BOURDU, R. & M. LEFORT, 1967. *Structure fine, observée en cryodécapage, des lamelles photosynthétiques des Cyanophycées endosymbiotiques: Glaucocystis nostochinearum Itzigs. et Cyanophora paradoxa Korschikoff*. C. R. Acad. Sc. Paris, Série D, **265**: 37-40.
- BUCHNER, P., 1965. *Endosymbiosis of Animals with Plant Microorganisms*: 3-22. New York.
- CASTALDO, R., 1968. *Ricerche sull'ultrastruttura del Cyanidium caldarium (Tilden) Geitler dei Campi Flegrei (Napoli)*. Delpinoa, n.s., **8-9**: 135-147.
- DE LUCA, P. & R. TADDEI, 1970. *Due alghe delle fumarole acide dei Campi Flegrei (Napoli): Cyanidium caldarium?*. Delpinoa, n.s., **10-11**: 79-89.
- ECHLIN, P., 1964. *The fine structure of blue-green alga Anacystis montana f. minor grown in continuous illumination*. Protoplasma, **58**: 439-457.
- —, 1966. *The fine structure of Glaucocystis nostochinearum in relation to the cyanophytic origin of chloroplasts*. Electron Microscopy, **2**: 285-286. Tokyo.
- —, 1967. *The biology of Glaucocystis nostochinearum. I. Morphology and fine structure*. Br. phycol. Bull., **3**: 225-239.
- FRITSCH, F. E., 1959. *The structure and reproduction of the algae*, **2**: 872-878. Cambridge.
- GANTT, E. & S. F. CONTI, 1965. *The ultrastructure of Porphyridium cruentum*. Journ. Cell Biol., **26**: 365-381.
- — & S. F. CONTI, 1966. *Granules associated with the chloroplast lamellae of Porphyridium cruentum*. Journ. Cell Biol., **29**: 423-434.
- —, M. R. EDWARDS & S. F. CONTI, 1968. *Ultrastructure of Porphyridium aerugineum, a blue-green colored Rhodophyten*. J. Phycol., **4**: 65-71.
- GEITLER, L., 1924. *Der Zellbau von Glaucocystis nostochinearum und Gloeochaete wittrockiana und die Chromatophoren-Symbiosetheorie von Mereschkowsky*. Arch. Protistenk., **47**: 1-24.
- —, 1959 a. *Syncyanosen*. In: RUHLAND, W.. *Handbuch des Pflanzenphysiologie*, **11**: 530-545. Berlin.

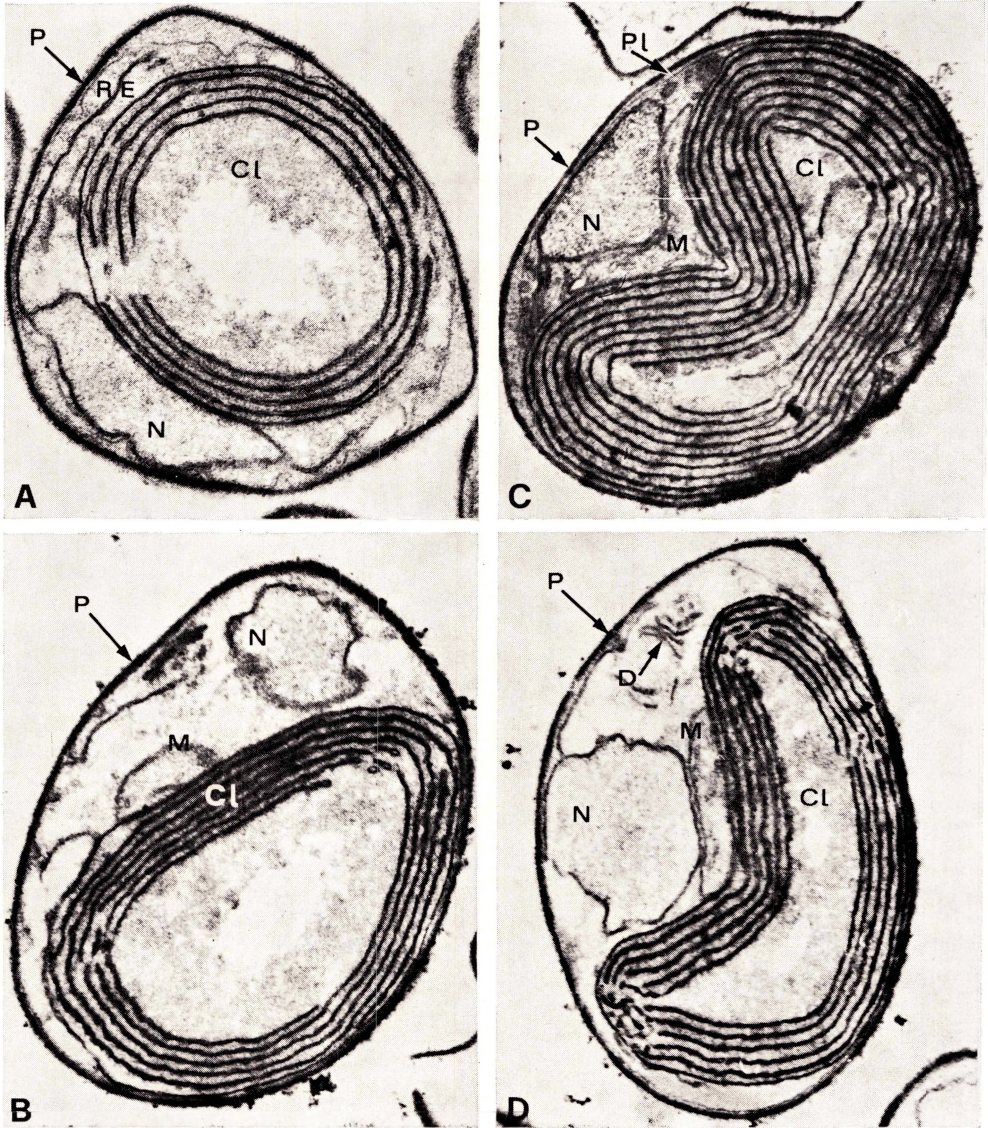
- —, 1959 b. *Eine neue Endocyanose, Cyanoptycha dispersa n. sp. und Bemerkungen über ähnliche Syncyanosen.* Öster. Bot. Z., **106**: 464-471.
- HALL, W. T. & G. CLAUS, 1963. *Ultrastructural studies on the blue-green algal symbiont in Cyanophora paradoxa Korschikoff.* Journ. Cell. Biol., **19**: 551-563.
- — & G. CLAUS, 1967. *Ultrastructural studies on the cyanelles of Glaucocystis nostochinearum Itzigsohn.* J. Phycol., **3**: 37-51.
- HENRY, S. M., 1966. *Symbiosis*, **1**: 257-297. New York.
- HOPWOOD, D. A. & GLAUERT, 1960. *The fine structure of the nuclear material of a blue-green alga Anabaena cylindrica Lemm.* Journ. Biophys. Biochem. Cytol., **8**: 813-823.
- KNAPP, E., 1933. *Über Geosiphon pyriforme Fr. Wettst., eine intrazelluläre Pilz-Algen-Symbiose.* Ber. Dtsch. Bot. Ges., **51**: 210-216.
- LEAK, L. V., 1967. *Studies on the preservation and organization of DNA-containing regions in a blue-green alga, a cytochemical and ultrastructural study.* J. Ultrastructure Research, **20**: 190-205.
- LEFORT, M., 1960. *Nouvelles recherches sur l'infrastructure du chromatoplasma des Cyanophycées.* C. R. Acad. Sc. Paris, Série D, **251**: 3046-3048.
- —, 1965. *Sur le chromatoplasma d'une Cyanophycée endosymbiotique: Glaucocystis nostochinearum Itzigs.* C. R. Acad. Sc. Paris, Série D, **261**: 233-236.
- MANTON, I., 1959. *Electron microscopical observations on a very small flagellate: the problem of Chromulina pusilla Butcher.* J. mar. biol. Ass. U. K., **38**: 319-333.
- —, 1961. *Some problems of mitochondrial growth.* J. Exp. Bot., **12**: 421-429.
- — & M. PARKE, 1960. *Further observations on small green flagellates with special reference to possible relatives of Chromulina pusilla Butcher.* J. mar. biol. Ass. U. K., **39**: 275-298.
- MCLAUGHLIN, J. J. A. & P. A. ZAHL, 1966. *Endozoic algae.* In: HENRY, S. M. *Symbiosis*, **1**: 257-297. New York.
- MERCER, F. V., L. BOGORAD & R. MULLENS, 1962. *Studies with Cyanidium caldarium. I. The fine structure and systematic position of the organism.* Journ. Cell Biol., **13**: 393-403.
- PASCHER, A., 1914. *Über Symbiosen von Spaltpilzen und Flagellaten mit Blaualgen.* Ber. Dtsch. Bot. Ges., **32**: 339-352.
- —, A., 1929. *Studien über Symbiosen. I. Über einige Symbiosen von Blaualgen in Einzellern.* Jahrb. wissensch. Bot., **71**: 386-462.

- RIS, H. & R. N. SINGH, 1961. *Electron microscope studies on blue-green algae.* Journ. Biophys. Biochem. Cytol., **9**: 63-80.
- ROSEN, W. G. & K. A. SIEGESMUND, 1961. *Some observations on the fine structure of a thermophilic, acidophilic alga.* Journ. Biophys. Biochem. Cytol., **9**: 910-914.
- RYTER, A. & E. KELLENBERGER, 1958. *Etude au microscope électronique de plasmas contenant de l'acide désoxyribonucléique. I. Les nucléoides des bactéries en croissance active.* Z. Naturforschg., **13b**: 597-605.
- SCHNEPF, E., 1964. *Zur Feinstruktur von Geosiphon pyriforme. Ein Versuch zur Deutung cytoplasmatischer Membranen und Kompartimente.* Arch. Mikrobiol., **49**: 112-131.
- — , W. KOCH & G. DEICHGRÄBER, 1966. *Zur Cytologie und taxonomischen Einordnung von Glaucocystis.* Arch. Mikrobiol., **55**: 149-174.



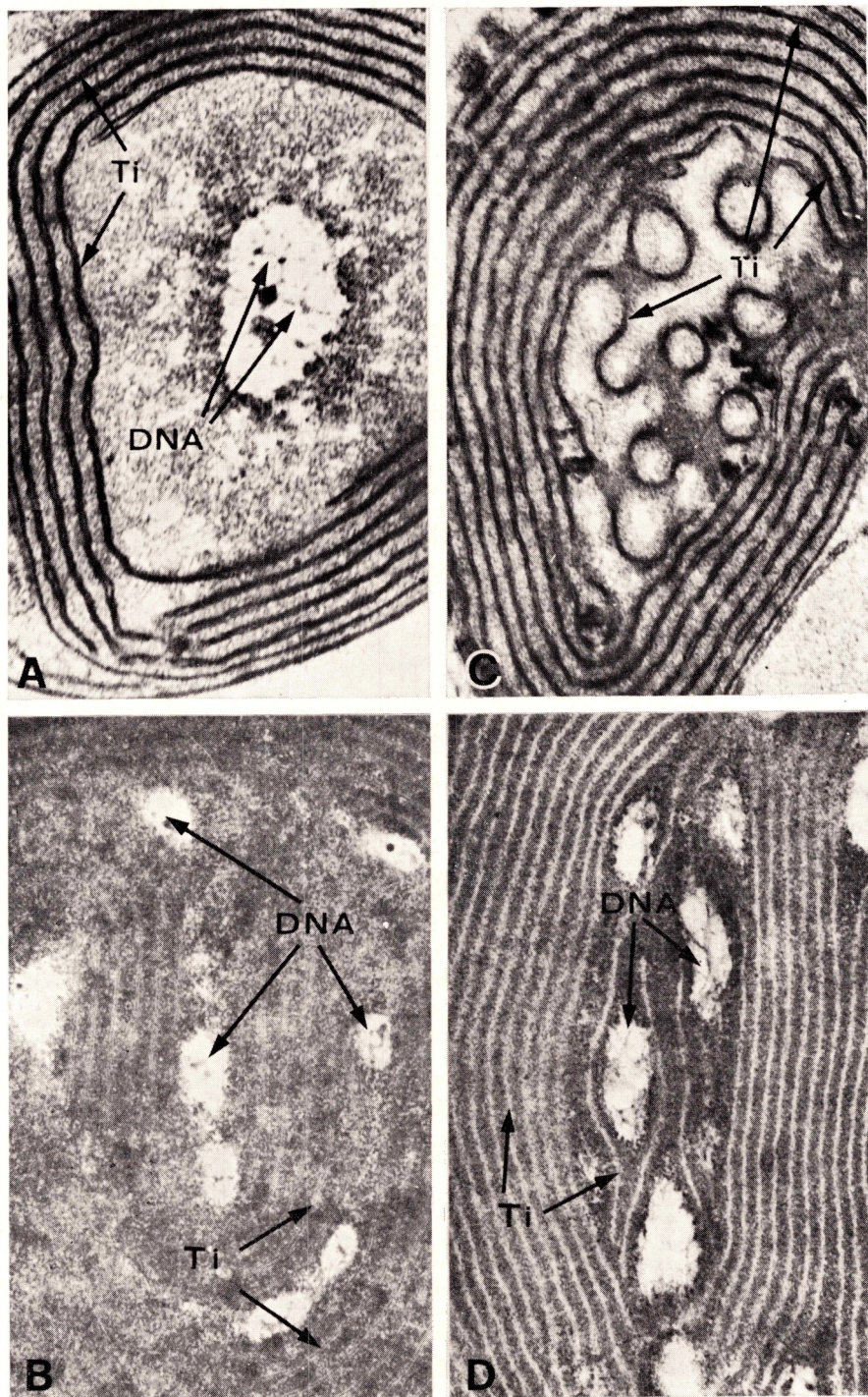
A e B: Cellule di *Cyanidium caldarium* forma A viste a piccolo ingrandimento (x 10.000).

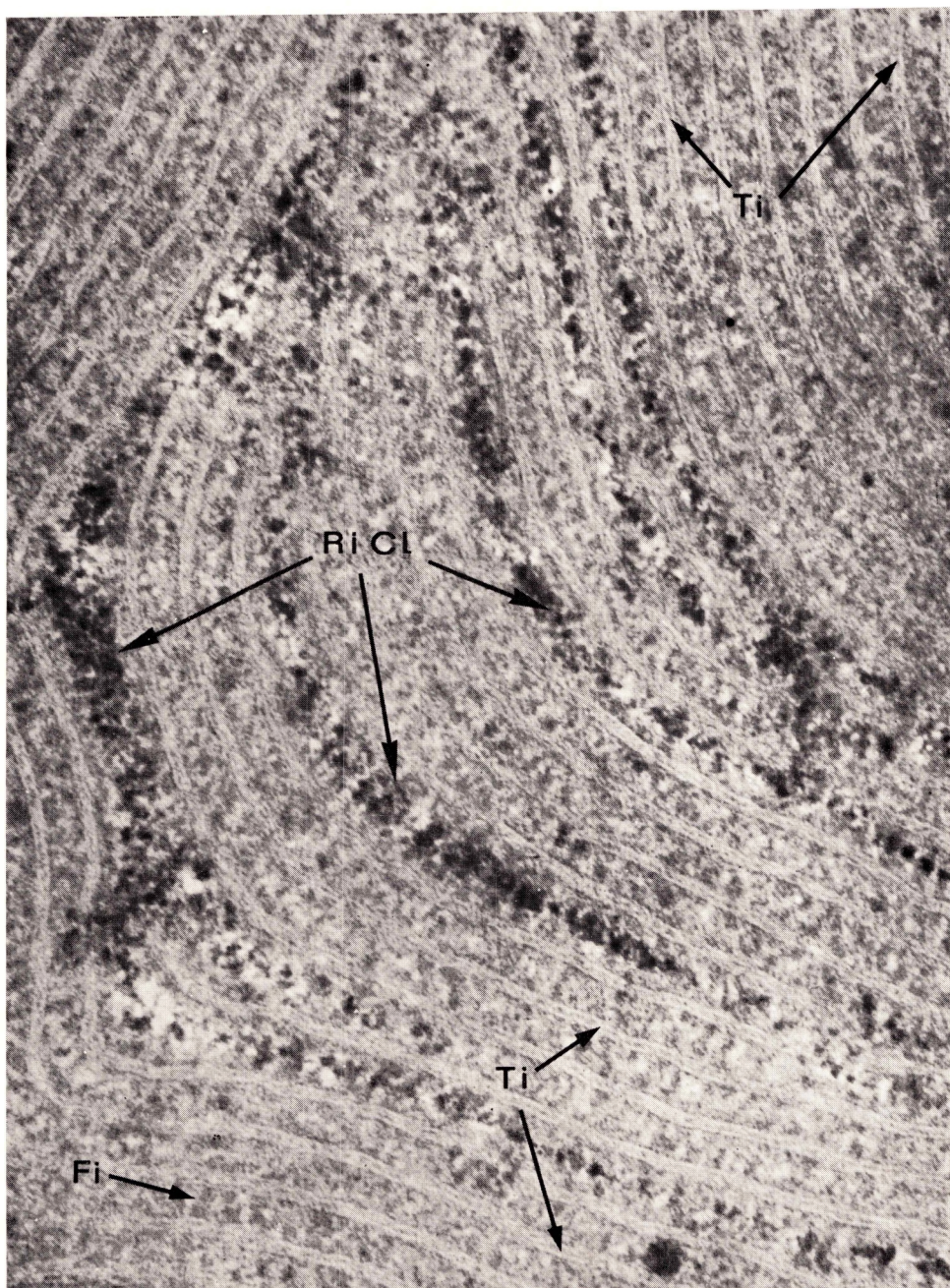
C: Cellula madre della forma A con endospore (x 12.000).



Cellule di *Cyanidium caldarium* forma A (x 25.000).

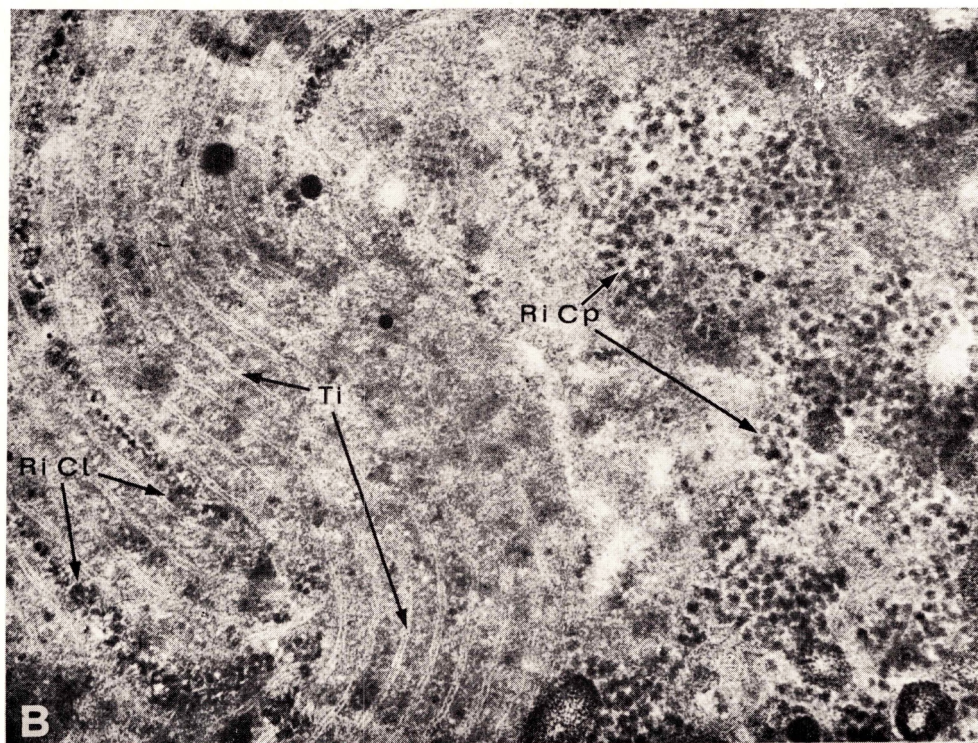
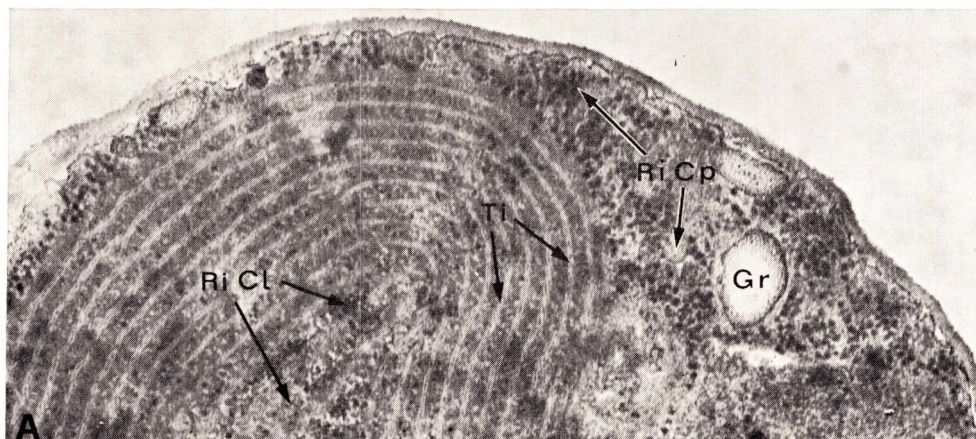
Cl: cloroplasto; D: dittiosmomi; M: mitocondrio; N: nucleo; P: parete;
Pl: plasmalemma; RE: reticolo endoplasmatico.





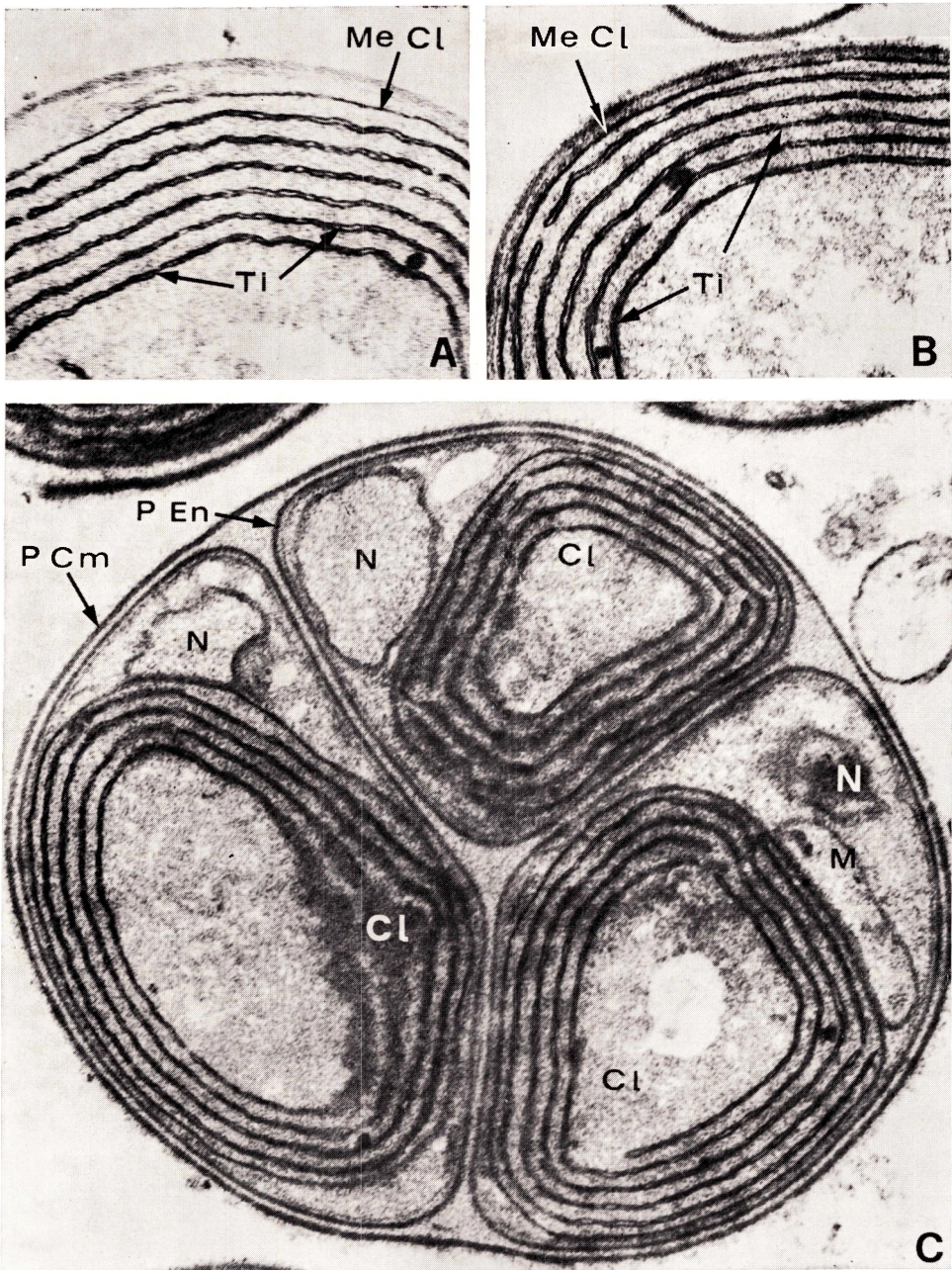
Particolare del cloroplasto di *Cyanidium cladarium* forma A. Si notino i ribosomi riuniti in densi ammassi, che ricordano quelli che si riscontrano nel centroplasma delle cianofitiche. Sono evidenti, inoltre, i ficobilisomi e la particolare struttura tripla dei tilacoidi (x 140.000).

Fi: ficobilisomi; RiCl: ribosomi del cloroplasto; Ti: tilacoidi.



Particolari di due cellule di *Cyanidium caldarium* forma A. Sono evidenti le maggiori dimensioni dei ribosomi del citoplasma rispetto a quelli del cloroplasto (x di A: 60.000; x di B: 80.000).

Gr: granuli di riserva; RiCl: ribosomi del cloroplasto; RiCp: ribosomi del citoplasma; Ti: tilacoidi.



A e B: Particolari di cloroplasti di *Cyanidium caldarium* forma A. È chiaramente evidente la membrana limitante semplice e la caratteristica disposizione periferica dei tilacoidi (x 47.000).

C: Cellula madre della forma A con endospore (x 25.000).

Cl: cloroplasto; M: mitocondrio; MeCl: membrana del cloroplasto; N: nucleo; P Cm: parete della cellula madre; P En: parete dell'endospora; Ti: tilacoidi.