

Salvatore Santisi      Rosa Castaldo  
Edmondo Honsell

## Osservazioni sulla morfologia ultrastrutturale dei cenociti di *Bryopsis duplex* De Not. (\*)

*Bryopsis*, come anche altre Siphonales, è stato da più di un secolo oggetto di attente osservazioni e ricerche di carattere citologico con i metodi della microscopia ottica (cfr. KÜSTER, 1956), principalmente in rapporto alla sua organizzazione cenocitica e a certi aspetti fisiologici. Ricordiamo in particolare, per quanto concerne la morfologia dei cenociti, i lavori di KÜSTER (1933) e di BECKEROWA (1935) nei quali, tra l'altro, sono stati messi in evidenza i vari aspetti degli inclusi vacuolari, così frequenti in queste alghe, e la cui costituzione è indicata come prevalentemente proteica.

Più recentemente uno di noi (HONSELL, 1962) ha rilevato, in base a ricerche con i metodi delle colorazioni vitali, la presenza nel citoplasma di sostanze che si legano con i coloranti basici e con la caffeina, determinando rilevanti processi di vacuolizzazione.

Gli studi a livello ultrastrutturale dei cenociti nel genere *Bryopsis* e in altre Siphonales sono ancora piuttosto scarsi: HEITZ (1960) e SCHULTE (1964) hanno descritto i cloroplasti di *Vaucheria*, GIRAUD (1962) di *Bryopsis plumosa* e DESCOMPS (1965) di *Caulerpa prolifera*, *Halimeda tuna* ed *Udotea petiolata*. Strutture microtubulari sono state descritte per *Caulerpa prolifera*

---

(\*) Lavoro eseguito presso gli Istituti Botanici dell'Università di Napoli e dell'Università di Trieste, con un contributo del Consiglio Nazionale delle Ricerche, Comitato Biologia e Medicina.

da SABNIS & JACOBS (1967) e da DAWES & RHAMSTINE (1967), mentre altri organelli cellulari in diverse specie di *Vaucheria* sono stati studiati da GREENWOOD (1959), GREENWOOD, MANTON & CLARKE (1956), e da SCHULTE (1964).

Alcuni lavori di carattere ultrastrutturale e biochimico sulla parete di alcune Vaucheriaceae (PARKER, PRESTON & FOGG, 1963), di *Caulerpa* (IRIKI, SUZUKI, NISIZAWA & MIWA, 1960), di *Codium* ed *Acetabularia* (MACKIE & PRESTON, 1967), di *Bryopsis* ed altre Siphonales (FREY & PRESTON, 1961, 1968) hanno dimostrato fra l'altro che essa è costituita prevalentemente da fibrille di mannano e xilano.

In una nostra precedente nota di carattere preliminare (CASTALDO, SANTISI & HONSELL, 1968) abbiamo brevemente descritto la morfologia dei cenociti di due specie di *Bryopsis*, rilevando che gli organelli citoplasmatici sono in generale molto simili nella loro organizzazione ultrastrutturale a quelli delle altre alghe verdi finora studiate, mentre appare molto caratteristica la costituzione degli inclusi vacuolari, formati da masse di filamenti con un canalicolo centrale.

Nel presente lavoro, riprendendo in esame la morfologia ultrastrutturale dei cenociti di *Bryopsis duplex*, abbiamo, fra l'altro, posto particolare attenzione ad alcuni aspetti della parete e del cloroplasto.

#### MATERIALE E METODI

Le nostre ricerche sono state eseguite su *Bryopsis duplex* De Not. (= *B. disticha* Ktz., PIGNATTI, 1962), una Siphonales che vive abbondante nel Golfo di Napoli, normalmente nella zona intertidale e che, per il suo lungo periodo vegetativo, la sua forma e dimensione e la facilità di coltura in laboratorio, risulta essere un ottimo materiale per questo genere di studi. Il suo tallo è costituito da sifoni poco ramificati, relativamente corti e di diametro maggiore di quelli di altre specie, come *B. plumosa* e *B. cupressoides*, viventi nello stesso ambiente,

per cui è più facile isolare i singoli individui senza danneggiarli e procedere quindi ai trattamenti richiesti dalle tecniche di preparazione.

Il materiale da noi studiato è stato raccolto, nella primavera e nell'estate del 1968 e 1969, lungo la costa dell'isolotto della Gaiola presso Capo Posillipo, con prelievi periodici: da qui veniva portato direttamente in laboratorio presso l'Istituto Botanico di Napoli, usando particolari accorgimenti al fine di evitare possibili variazioni di temperatura, pressione osmotica, ecc., rispetto all'ambiente naturale. Una parte di esso veniva immediatamente sottoposta ai procedimenti di preparazione per lo studio al microscopio elettronico, mentre il resto veniva tenuto in coltura e serviva per successivi prelievi.

Per la fissazione del materiale abbiamo fatto varie prove orientative, ottenendo i migliori risultati con soluzioni di aldeide glutarica al 2% in tampone fosfatico a pH 7,25 e aggiunta di glucosio secondo la formula proposta da (MILLONIG, 1961), per durate di 2 ore a freddo (4°C) e postfissazione con tetrossido d'osmio all'1% nello stesso tampone per due ore. Fissazioni con permanganato di potassio a varie concentrazioni, a temperatura ambiente (20°C) e a freddo hanno dato invece esito negativo, determinando la comparsa di profonde alterazioni di tutta la massa protoplasmatica, caratterizzate principalmente da vacuolizzazioni ialoplasmatiche.

Dai filamenti fissati in toto sono state quindi prelevate, con tagli trasversali, le porzioni apicali per una lunghezza di circa 2-3 mm e queste sono state incluse in Epon 812, dopo disidratazione con alcool etilico (LUFT, 1961). Le sezioni, contrastate con acetato di uranile e citrato di piombo (REYNOLDS, 1963) sono state osservate e fotografate per mezzo di un microscopio elettronico Siemens Elmiskop 1 A, presso il Centro di Studi di Microscopia Elettronica della Facoltà di Scienze dell'Università di Napoli.

#### OSSERVAZIONI

Dall'esame delle microfotografie abbiamo potuto rilevare un quadro d'insieme abbastanza particolareggiato dell'organizzazione a livello ultrastrutturale dei cenociti di *Bryopsis duplex*, tuttavia riteniamo che questo lavoro costituisca la premessa per lo studio approfondito, soprattutto per quanto concerne i meccanismi del differenziamento, di quelle strutture cellulari che presentano gli aspetti morfologici più critici.

I cenociti hanno forma cilindrica, con diametri di circa 1 mm e possono raggiungere alcuni cm di lunghezza; essi presentano all'interno un unico grande vacuolo centrale, delimitato dalla massa citoplasmatica polinucleata, lo spessore della quale, fra vacuolo e parete, è relativamente costante, generalmente non inferiore a  $10\mu$  lungo i lati del sifone, mentre è maggiore nella porzione apicale.

La parete dei cenociti ha uno spessore variabile e la sua superficie esterna non è uniformemente piana ma leggermente crenulata. Essa è delimitata verso l'esterno da una sottile cuticola di circa 300 A, costituita da due zone opache agli elettroni separate da una più chiara a struttura omogenea. La parte rimanente della parete, il cui spessore può variare da poco più di  $1\mu$  fino a  $8\mu$  in certe zone, appare variamente stratificata ed è costituita da materiale finemente granulare e da fibrille di vario aspetto. La stratificazione sembra sia semplicemente da mettere in rapporto col fatto che il materiale granulare e principalmente quello fibrillare, non ha una distribuzione omogenea ma è disposto in strati dove è più addensato ed in altri dove lo è di meno. Inoltre si osservano qua e là formazioni cilindriche o fusiformi, talora biforcute, disposte in posizione ortogonale alla superficie, costituite da materiale molto denso, il cui diametro, nella parte mediana generalmente un po' rigonfia, può raggiungere  $0,5\mu$ , mentre la loro lunghezza corrisponde allo spessore della parete (Tav. I: A).

La superficie esterna del protoplasto, a livello del plasmalemma, è sempre molto sinuosa, con piccole invaginazioni. Il citoplasma appare in alcune zone molto omogeneo, privo di

organelli e, soprattutto nella porzione apicale, molto ricco di ribosomi: in quest'ultima, anche il reticolo endoplasmatico è molto sviluppato e sono presenti numerosi mitocondri, globuli osmiofili, piccoli vacuoli e vescicole di vario diametro. I nuclei hanno una posizione mediana fra plasmalemma e tonoplasto, mentre i cloroplasti sono sempre disposti nella parte più interna, a stretto contatto col tonoplasto e molto spesso sporgono nel grande vacuolo centrale. Inoltre, sia in vacuoli citoplasmatici che nel grande vacuolo centrale si osservano normalmente particolari inclusioni a struttura filamentosa (Tav. I: C,D,E). Abbiamo notato spesso anche la presenza di batteri simbiotici, sia nel vacuolo centrale che nei piccoli vacuoli citoplasmatici.

I nuclei hanno forma rotondeggiante e i loro diametri variano da 2,5 a 4  $\mu$ . La struttura del citoplasma e la disposizione dei vari organelli si presenta piuttosto omogenea: non abbiamo riscontrato alcun segno di un'eventuale localizzazione o raggruppamento di strutture in rapporto a ciascuno di essi. I nuclei, inoltre, sono variamente distanziati, anche in relazione alla loro attività mitotica, particolarmente intensa nella porzione apicale del cenocita.

I mitocondri, parimenti più numerosi nella porzione apicale, hanno prevalentemente una forma rotondeggiante e i loro diametri variano da 0,4 a 0,6  $\mu$ . Il sistema lamellare interno ha sempre una conformazione a creste le quali, in certi casi, tendono ad assumere una posizione parallela alla membrana mitocondriale, mentre, più generalmente, in altri sono perpendicolari ad essa, ma non si estendono mai oltre la zona mediana dell'organello, dove le loro parti terminali si contrappongono a quelle delle creste che si estroflettono dal lato opposto del mitocondrio (Tav. I, B).

I dictiosomi sono costituiti da poche cisterne (4-5) dalle quali si staccano numerose vescicole di secrezione, isolate generalmente non dai loro margini, ma dalle loro superfici esterne.

I cloroplasti che, come si è detto, si trovano nella porzione di citoplasma più interna, sono distribuiti in un unico strato, spesso molto vicini gli uni agli altri, hanno forma lenticolare

o fusiforme e sono provvisti di uno o talora due pirenoidi disposti nella regione mediana; i loro diametri variano da 15 a 20  $\mu$ . Per quanto concerne l'organizzazione ultrastrutturale essi presentano il normale involucro plastidiale formato da due membrane unitarie e contengono numerosissimi tilacoidi, molto sviluppati in superficie, raggruppati in bande da due a quattro elementi. Inoltre, come avviene in molte altre alghe verdi, i tilacoidi esterni di una banda possono staccarsi ed entrare a far parte di una banda adiacente. Particolarmente interessante è il fatto che i tilacoidi non hanno una superficie piana ma, come appare molto evidente in certe sezioni, hanno una disposizione a spirale, decorrendo nella parte esterna parallelamente all'involucro plastidiale e convergendo, quindi, verso il pirenoide centrale (Tav. I: B). Quest'ultimo appare molto denso agli elettroni, ha un aspetto finemente granulare ed è attraversato da un numero limitato di tilacoidi, di solito riuniti in fascetti di due, che ne suddividono la matrice in porzioni diverse per forma e dimensioni (Tav. II: A). Nella regione del pirenoide questi presentano una modificazione morfologica caratterizzata da una serie di rigonfiamenti che in certi casi possono assumere l'aspetto di vescicole ordinate in serie, per cui lo spessore totale dei due tilacoidi e dello spazio fra di essi può raggiungere in media i 700 - 800 A (Tav. II: B). I granuli di amido sono disposti prevalentemente intorno al pirenoide, dove sono sempre delimitati da tilacoidi, ma possono anche trovarsi in zone più periferiche del cloroplasto, nel qual caso, tuttavia, hanno sempre dimensioni più piccole. Lo stroma plastidiale contiene molti globuli osmiofili.

Accanto ai normali cloroplasti differenziati, nella zona apicale dei sifoni, abbiamo riscontrato numerosi organelli che presentano le caratteristiche morfologiche di plastidi giovani in via di differenziamento. I più piccoli, di forma sferica, hanno il diametro di circa 1  $\mu$  e sono delimitati da un involucro formato da due membrane, delle quali l'interna si introflette, dando luogo a formazioni lamellari non molto sviluppate. Nella parte centrale sono presenti uno o più fascetti di tubuli, il cui diametro è di circa 200 A (Tav. III: A, B; Tav. IV: A). Dalla superficie di ciascun fascetto di tubuli si dipartono sottili fibrille a decorso radiale, le quali costituiscono una trama reticolare che occupa

la gran parte dello stroma dell'organello e nelle cui maglie sono contenute granulazioni di vario aspetto. L'insieme di tali fibrille e granulazioni ricorda, per il suo aspetto morfologico, il nucleoplasma dei procarioti (Tav. III: B; Tav. IV: A). Altri organelli simili ai precedenti si presentano maggiormente differenziati nella struttura interna, con un maggiore sviluppo delle formazioni lamellari, le quali, disposte parallelamente, si estendono per tutta la loro lunghezza, pur mantenendo rapporti di continuità con la membrana interna dell'involucro (Tav. IV: B). In relazione a questa maggiore differenziazione sembra che il numero dei tubuli costituenti i fascetti diminuisca; tuttavia non abbiamo riscontrato alcun rapporto morfologico fra detti tubuli e le formazioni lamellari. Man mano che la differenziazione di questi organelli progredisce, si nota la comparsa di globuli osmiofili, molto simili nell'aspetto a quelli dei normali plastidi, mentre le formazioni lamellari tendono a staccarsi dalla membrana interna dell'involucro, costituendo strutture molto simili ai tilacoidi (Tav. IV: B; Tav. V).

In alcuni vacuoli citoplasmatici e nel grande vacuolo centrale si osservano infine strutture filamentose disposte in fasci. Sono costituite da filamenti del diametro di circa  $0,1 \mu$ , nel cui interno decorre un tubulo del diametro di circa 250 A. Esse sono particolarmente abbondanti nel vacuolo centrale dove formano ammassi più o meno compatti (Tav. I: C, D, E).

#### DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Mentre nelle nostre prime osservazioni sull'ultrastruttura dei cenociti di *Bryopsis* (CASTALDO, SANTISI & HONSELL, 1968) avevamo posto particolare attenzione, oltre che all'organizzazione generale, al sistema vacuolare e ai suoi inclusi, nelle presenti ricerche abbiamo voluto approfondire altri aspetti morfologici che ci sono sembrati di particolare interesse.

La parete dei sifoni di *Bryopsis duplex* è delimitata da una « cuticola » sottile (300 A circa) che riteniamo corrisponda alle formazioni cuticolari ad alto contenuto proteico descritte da

HANIC & CRAIGIE (1969) per diverse specie di alghe verdi, fra le quali *Cladophora*, *Chaetomorpha*, *Enteromorpha*, alcune alghe brune (*Laminaria*, *Padina*) e, fra le alghe rosse, *Porphyra*. Tale cuticola presenta la stessa conformazione morfologica, data da tre strati, ed ha uno spessore corrispondente. La sua superficie è finemente sinuosa, riveste con continuità la parete, come avviene per le altre specie nelle quali è stata descritta e sembra rappresenti una struttura molto diffusa nelle alghe. La sua presenza è stata riscontrata anche in *Bangia* (HONSELL, 1964).

Al di sotto della cuticola, la parete di *Bryopsis*, piuttosto spessa e variamente stratificata, presenta in sezione un aspetto fibrillare e granulare che potrebbe essere dovuto al diverso orientamento delle fibrille di xilano, le quali, secondo IRIKI, SUZUKI, NISIZAWA & MIWA (1960) ne sono il costituente principale e sarebbero disposte in senso longitudinale rispetto all'asse del sifone ma anche, in certi casi, in senso circolare (GREEN, 1962). In altre Siphonales (Codiaceae e Dasycladaceae) tuttavia, FREI & PRESTON (1968) hanno rilevato che le fibrille, in questo caso costituite da mannani, sono disposte in due strati con orientamento parallelo fra di loro in ciascuno di essi, ma ortogonale rispetto all'altro.

Nella parete di *Bryopsis* si notano inoltre formazioni cilindrico-fusiformi disposte perpendicolarmente all'asse del sifone, che decorrono dalla sua superficie interna fino alla cuticola e che talora possono presentarsi ramificate. Esse hanno una struttura non omogenea, con la porzione interna talora più chiara, ma comunque sono molto più opache agli elettroni che non gli altri costituenti della parete. È difficile dare un'interpretazione della loro natura e funzione, tuttavia in certe fotografie abbiamo notato che in corrispondenza della loro parte terminale, al di là della cuticola, possono essere presenti delle masserelle di sostanza densa omogenea. Pensiamo che possano esistere dei rapporti fra queste formazioni ed i meccanismi di adesione dei sifoni al substrato; infatti, coltivando in laboratorio sifoni di *Bryopsis*, è possibile osservare che questi, se vengono a contatto con le pareti dei recipienti, aderiscono ad esse per mezzo di mucillagini secrete attraverso la parete.

I cloroplasti di *Bryopsis duplex* hanno una struttura interna molto simile a quella delle altre Clorophyceae, con tilacoidi molto grandi riuniti fra di loro in gruppi da due a quattro; questi ultimi, tuttavia, hanno una disposizione non ancora descritta in altre alghe verdi, in quanto decorrono in senso spiraleto, dalla prossimità dell'involucro plastidiale, al quale nel primo tratto sono paralleli, fino al pirenoide che occupa una posizione centrale. Quest'ultimo è del tipo polipiramidale (HORI & UEDA, 1967), poiché è suddiviso da alcuni tilacoidi che l'attraversano, in porzioni differenti, sia per forma che per volume. I tilacoidi che penetrano nello stroma non sono isolati, come nelle altre Siphonales studiate da HORI & UEDA (1967), ma sono sempre appaiati e le loro membrane assumono un aspetto sinuoso, risolvendosi talora in formazioni vescicolari.

Gli organelli citoplasmatici più interessanti che abbiamo osservato in *Bryopsis* e che, a nostro avviso, sarebbero da considerare come stadi giovanili di cloroplasti in fase di differenziamento, sono rappresentati da strutture finora mai descritte in alghe verdi. Questa nostra interpretazione deriva esclusivamente dai risultati dell'analisi morfologica ultrastrutturale ed ovviamente richiede un'ulteriore conferma in base ai risultati di ricerche sperimentali su cenociti tenuti in coltura, e di carattere biochimico sugli organelli isolati. È comunque da escludere che questi organelli possano venir considerati come ezioplasti in quanto, a parte le loro dimensioni molto ridotte, essi coesistono con gli altri cloroplasti ben differenziati ed in piena attività fotosintetica, ricchi di granuli di amido. Inoltre il materiale da noi studiato, fissato poco dopo il prelievo, in pieno giorno, proviene sempre da ambienti naturali fortemente illuminati. Le stesse considerazioni valgono anche per il materiale prelevato da colture.

Abbiamo anche pensato ad una eventuale loro derivazione da mitocondri, dei quali, tuttavia, anche negli stadi meno differenziati, sono circa il doppio più grandi, ma riteniamo di poter escludere questa ipotesi per il fatto che contengono strutture che non compaiono mai nei mitocondri, quali i fascetti centrali di tubuli e i globuli osmiofili.

Questi organelli appaiono in fasi diverse di differenziamento e, man mano che questo procede, aumenta anche il loro volume. Essi sono avvolti da due membrane unitarie e da quella interna si formano invaginazioni, allo stesso modo di quanto avviene per i proplastidi nelle piante superiori (VON WETTSTEIN, 1959) e, tra le alghe, nella Rodoficea *Lomentaria baileyana* (BOUCK, 1962). Da queste invaginazioni si staccano in seguito formazioni lamellari molto simili a tilacoidi. In *Bryopsis*, tuttavia tali organelli presentano nel loro interno fascetti di tubuli i quali, pur avendo diametri non molto dissimili da quelli che costituiscono il corpo prolamellare delle piante superiori (GUNNING & JAGOE, 1967), non hanno una struttura a reticolo. Strutture tubulari simili a queste di *Bryopsis* sono state invece già descritte nei cloroplasti di *Oedogonium* (HOFFMANN, 1967) e in quelli di *Chara* e *Volvox* (PICKETT-HEAPS, 1968): tali formazioni però si trovano sempre in cloroplasti adulti e con sistema fotosintetico evoluto. Anche in *Caulerpa* (DAWES & RHAMSTINE, 1967) sono state osservate, sia pure piuttosto raramente, formazioni tubulari in plastidi diversi da quelli normali, cioè più piccoli, ma già ben differenziati. Le formazioni tubulari dei proplastidi di *Bryopsis* tendono invece a scomparire man mano che si sviluppa il sistema dei tilacoidi, contemporaneamente al distacco delle invaginazioni dalla membrana interna dell'involucro.

A questo livello del differenziamento compaiono anche i globuli osmiofili caratteristici dei cloroplasti completamente sviluppati, mentre ancora non si ha traccia del pirenoide. Purtroppo non siamo ancora riusciti a trovare ulteriori stadi intermedi che ci permettano di ricostruire tutta la serie delle trasformazioni morfologiche attraverso le quali, se la nostra interpretazione è esatta, dovrebbe aver luogo il differenziamento del cloroplasto.

Dai fascetti di tubuli si irradiano strutture fibrillari che si estendono, formando una sorta di reticolo, in tutta la regione centrale stromatica, che è priva di lamelle e appare più trasparente agli elettroni. Non è improbabile che si tratti di fibrille di DNA, dato il loro aspetto molto caratteristico. Formazioni fibrillari di questo tipo, che BISALPUTRA & BISALPUTRA (1967 a, 1967b) ritengono costituite da DNA, sono state osservate da

questi AA. in *Egregia* e *Laurencia* in aree chiare all'interno di pirenoidi in via di formazione e, secondo RIS & PLAUT (1962), in molte specie di alghe esisterebbero stretti rapporti fra queste strutture e il differenziamento dei pirenoidi. Del resto, anche in *Bryopsis*, come in *Dictyota* e *Padina*, STEFFENSEN & SHERIDAN (1965) hanno dimostrato che nei cloroplasti il DNA plastidiale è sempre strettamente associato al pirenoide. Questi fatti potrebbero far pensare che i fascetti di tubuli in questi organelli abbiano qualche rapporto con l'eventuale formazione del pirenoide e ciò potrebbe essere un altro elemento a favore dell'interpretazione che essi siano da considerare come dei veri e propri proplastidi.

Nel vacuolo centrale ed in vacuoli dello strato citoplasmatico abbiamo rilevato infine ammassi di strutture filamentose che riteniamo possano corrispondere agli inclusi vacuolari descritti da KÜSTER (1933) e da BECKEROWA (1935) in *Byopsis plumosa* e che da questi AA. sono stati indicati come precipitati amorfi di natura albuminoide. Si tratta di filamenti dello spessore di  $0,1 \mu$ , con un tubulo centrale cilindrico del diametro di circa 250 A, che li percorre per tutta la loro lunghezza e che non sono stati ancora descritti, da un punto di vista ultrastrutturale, per altre Siphonales. Sembra che questi filamenti si formino in piccoli vacuoli citoplasmatici, dai quali passerebbero nel grande vacuolo centrale. Per comprendere la natura e la funzione di queste strutture filamentose i dati morfologici sono ovviamente insufficienti ed anche in questo caso è necessaria un'ulteriore ricerca di carattere biochimico.

Concludendo, le indicazioni che abbiamo potuto rilevare dallo studio ultrastrutturale di *Bryopsis duplex* ci dimostrano che, nel complesso, la morfologia dei cenociti e dei loro costituenti presenta molte affinità, a parte l'organizzazione apociziale, con quella già descritta per altre alghe verdi; tuttavia sono emersi alcuni aspetti, che riteniamo di particolare interesse e che potranno essere chiariti con ulteriori ricerche, oltre che morfologiche, soprattutto di carattere funzionale.

RIASSUNTO

Ricerche a livello morfologico ultrastrutturale dei cenociti di *Bryopsis duplex* De Not. (Chlorophyceae, Siphonales) hanno messo in rilievo alcuni aspetti del tutto particolari e mai ancora descritti, almeno in gran parte, per altre alghe verdi.

Di questi i più interessanti sono:

a) La parete dei sifoni, il cui spessore può variare da 1 a 8  $\mu$ , presenta un rivestimento esterno dato da una cuticola spessa circa 300 A e costituita da due strati opachi agli elettroni separati da un trasparente. Inoltre in essa sono presenti formazioni cilindrico-fusiformi, talora biforcate, del diametro massimo di 0,5  $\mu$  e disposte in senso perpendicolare alla superficie della parete stessa che attraversano tutta. Viene prospettata l'ipotesi che queste formazioni siano in rapporto con i processi di adesione dei sifoni al substrato, consistenti in secrezioni di mucillagini attraverso la parete.

b) I cloroplasti hanno tilacoidi molto grandi, riuniti a gruppi di 3 o 4 e con un decorso parzialmente spiralato in quanto, nella regione più periferica, decorrono quasi paralleli all'involucro plastidiale per curvarsi quindi verso la regione centrale occupata dal pirenoide: questo è di tipo polipiramidale ed è attraversato da pochi tilacoidi generalmente appaiati che assumono l'aspetto di una serie di piccole vescicole collegate fra di loro.

c) Nelle porzioni apicali dei sifoni sono presenti numerosi organelli di forma più o meno sferica od ellissoidale, i più piccoli dei quali hanno diametri non inferiori a 2  $\mu$ . Essi sono costituiti da un involucro formato da due membrane unitarie, delle quali l'interna si introflette dando origine a formazioni lamellari molto simili a tilacoidi. Nella regione centrale sono costantemente presenti fascetti di tubuli dai quali si irradiano sottili fibrille collegate con granulazioni più dense. Essi contengono inoltre globuli osmiofili non molto dissimili da quelli presenti nei cloroplasti. Pur presentando molte affinità con l'organizzazione dei proplastidi non è ancora possibile, in base a questi soli elementi, stabilire la loro natura.

d) In piccoli vacuoli citoplasmatici e nel grande vacuolo centrale si trovano, infine, ammassi di formazioni filamentose del diametro di circa 0,1  $\mu$  che contengono all'interno un tubulo assiale del diametro di 250 A.

### SUMMARY

Researches at ultrastructural morphological level of the coenocyte of *Bryopsis duplex* De Not. (Chlorophyceae, Siphonales), have pointed out some peculiar aspects which are quite undescribed in other green algae.

The most interesting of these aspects are:

a) The wall of the siphons, whose thickness may vary from 1 to 8  $\mu$ , does present an outer envelope which consists of a cuticle 300 A thick, and of two electron-dense layers between which we can see a third layer transparent to the electron beam.

Moreover the wall presents spindle-shaped structures whose diameter reaches 0,5  $\mu$ ; they are sometimes bifucated and arranged perpendicularly to the wall which they cross in its whole thickness.

We think these structures may be related to the adhesion processes of the siphons to the substrate, these processes consisting of mucilaginous secretions through the wall.

b) The chloroplasts present very large thylakoids arranged in groups of three or four and running partially spiralled. That is to say that in the peripheric regions the thylakoids run almost parallel to the plastidial envelope and bend then towards the central region: this is filled by a polypyramidal pyrenoid crossed by a few thylakoids generally paired and in correspondence of which we can observe electron-transparent and seriated vesicles.

c) Several organelles appear in the tips of the siphons. Their form is approximately spherical or elliptical.

They present an envelope consisting of two unit-membranes, of which the inner intrudes giving rise to lamellar thylakoid-like structures.

Small stacks of tubules are always present in the central region. Thin fibrils, connected with electron-dense granules, radiate from the stacks.

The fibrils contain also osmiophylic globules closely resembling those of the chloroplasts.

On the basis of these elements it is not yet possible to state the nature of the organelles, even if they present a lot of affinities with the organization of the proplastids.

d) Finally, in small vacuoles, and in the large central vacuole, we can find clusters of filamentous structures: each of these has a diameter of about 0,1  $\mu$  and contains an axial tubule 250 A in diameter.

BIBLIOGRAFIA

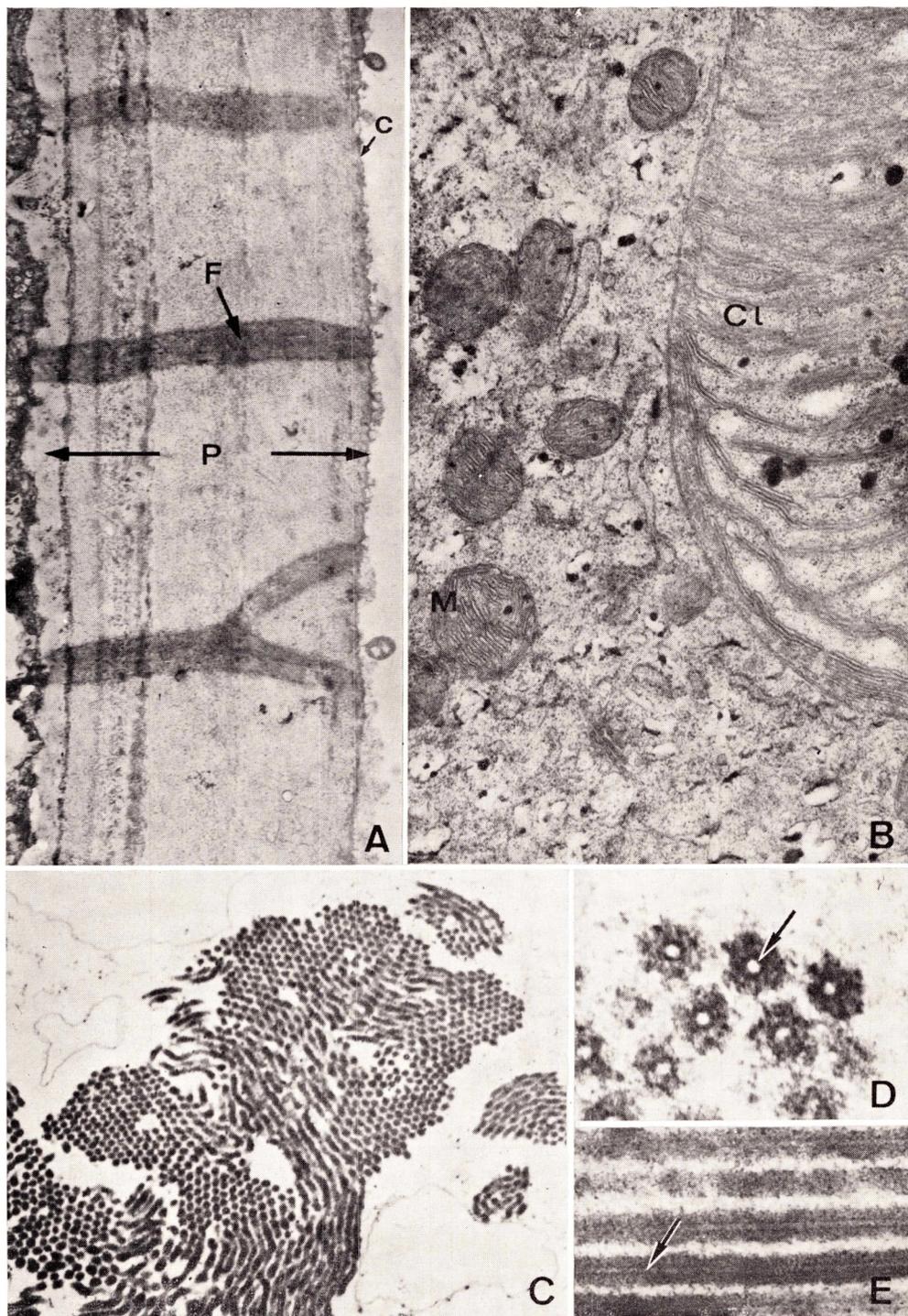
- BECKEROWA, Z., 1935. *Über Zellsaft und tonoplasten von Bryopsis*. Protoplasma, **23**: 384-391.
- BISALPUTRA, T. & A. BISALPUTRA, 1967 a. *The occurrence of DNA fibrils in chloroplasts of Laurencia spectabilis*. J. Ultrastr. Res., **17**: 14-22.
- — & A. BISALPUTRA, 1967 b. *Chloroplast and mitochondrial DNA in a brown alga, Egregia menziesii*. J. Cell Biol., **33**: 511-520.
- BOUCK, G. B., 1962. *Chromatophore development, pits and other fine structure in the red alga, Lomentaria baileyana (Harv.) Farlow*. J. Cell Biol., **12**: 553-569.
- CASTALDO, R., SANTISI, S. & E. HONSELL, 1968. *Prime osservazioni ultrastrutturali sull'organizzazione dei cenociti di Bryopsis*. Giorn. Bot. Ital., **102** (6): 550.
- DAWES, C. J. & E. L. RHAMSTINE, 1967. *An ultrastructural study of the giant green algal coenocyte, Caulerpa prolifera*. J. Phycol., **3** (3): 117-126.
- DESCOMPS, S., 1965. *Observations sur l'infrastructure des plastes de Caulerpales (Chlorophycées)*. C. R. Acad. Sci., D, **261**: 1061-1063.
- FREI, E. & R. D. PRESTON, 1961. *Variants in the structural polysaccharides in algal cell walls*. Nature, **192**: 939-943.
- — & R. D. PRESTON, 1968. *Non cellulosic structural polysaccharides in algal cell walls. III. Mannan in siphonous green algae*. Proc. r. Soc., B, **169** (1015): 127-145.
- GIRAUD, G., 1962. *Les infrastructures de quelques algues et leur physiologie*. J. Micr., **1**: 251-274.
- GREEN, P. B., 1962. *Mechanism for plant cellular morphogenesis*. Science, **138**: 1404-1405.
- GREENWOOD, A. D., 1959. *Observations on the structure of the Zoospores of Vaucheria. II*. J. Exptl. Bot., **10**: 55-68.
- —, MANTON, J. & B. CLARKE, 1956. *Observations on the structure of the zoospores of Vaucheria*. J. Exptl. Bot., **8**: 71-86.
- GUNNING, B. E. S. & M. P. JAGOE, 1967. *The prolamellar body*. In: GOODWIN, T. W. (ed.). *Biochemistry of chloroplasts. II*. Acad. Press, New York and London, 1967.
- HANIC, L. A. & J. S. CRAIGIE, 1969. *Studies on the algal cuticle*. J. Phycol., **5**: 89-102.
- HEITZ, E., 1960. *Das lamellare Dünn-Dick-Muster der Chloroplasten von Chlamydomonas, Euglena, Fucus, Vaucheria*. Zeitschr. Zellforsch., **53**: 444-448.

- HOFFMANN, L. R., 1967. *Observations on the fine structure of Oedogonium. III. Microtubular elements in the chloroplasts of Oe. cardiacum.* J. Phycol., **3** (4): 212-220.
- HONSELL, E., 1962. *Sulla natura dell'accumulo plasmatico in vivo di alcuni diacromi e fluorocromi basici e neutri in Bryopsis e Derbesia.* Protoplasma, **55**: 632-655.
- —, 1964. *Prime osservazioni ultrastrutturali sulle cellule di Bangia fuscopurpurea (Dillw.) Lyngb.* Delpinoa, n.s., **5**: 139-155.
- HORI, T. & R. UEDA, 1967. *Electron microscope studies on the fine structure of plastids in siphonous green algae with special reference to their phylogenetic relationships.* Sci. Rep. Tokyo Kyoiku Daigaku, Sec. B., **12**: 225-244.
- IRIKI, Y., SUZUKI, T., NISIZAWA, K. & T. MIWA, 1960. *Xylan of siphonaceous green algae.* Nature, **187**: 82-83.
- KÜSTER, E., 1933. *Über Zellsaft, Protoplasma und Membran von Bryopsis.* Ber. dtsh. bot. Ges., **51**: 526-536.
- —, 1956. *Die Pflanzenzelle.* Fischer Verlag, Jena.
- LUFT, J. H., 1961. *Improvements in epoxy resin embedding method.* J. Biophys. Biochem. Cytol., **9**: 409-414.
- MACKIE, W. & R. D. PRESTON, 1968. *The occurrence of mannan microfibrils in the green algae Codium fragile and Acetabularia crenulata.* Planta, **79**: 249-253.
- MILLONIG, G., 1961. *Advantages of a phosphate buffer for OsO<sub>4</sub> solution in fixation.* J. Appl. Phys., **32**: 1637.
- PARKER, B. C., PRESTON, R. D. & G. E. FOGG, 1963. *Studies on the structure and chemical composition of the cell walls of Vaucheriaceae and Saprolegniaceae.* Proc. r. Soc., B, **158**: 435-445.
- PICKETT-HEAPS, J. D., 1968. *Microtubule-like structures in the growing plastids or chloroplasts of two algae.* Planta, **81**: 193-200.
- PIGNATTI, S., 1962. *Le specie mediterranee del genere Bryopsis (Chlorophyceae-Siphonales).* Atti Ist. Veneto Scienze, Lettere, Arti, **120**: 31-56.
- REYNOLDS, E. S., 1963. *The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy.* J. Cell Biol., **17**: 208-213.
- RIS, H. & W. PLAUT, 1962. *Ultrastructure of DNA-containing areas in the chloroplast of Chlamydomonas.* J. Cell Biol., **13**: 383-391.
- SABNIS, D. D. & W. P. JACOBS, 1967. *Cytoplasmic streaming and microtubules in the coenocytic marine alga Caulerpa prolifera.* J. Cell Sci., **2**: 465-472.
- SCHULTE, H., 1964. *Beiträge zur Cytologie von Vaucheria D. C.* Protoplasma, **58**: 227-249.
- STEFFENSEN, D. M. & W. F. SHERIDAN, 1965. *Incorporation of H<sup>3</sup>-thymidine into chloroplast DNA of marine algae.* J. Cell Biol., **25**: 619-626.
- WETTSTEIN (von), D., 1959. *The effect of genetic factors on the submicroscopic structures of the chloroplast.* J. Ultrastr. Res., **3**: 235-237.

**T A V O L E**

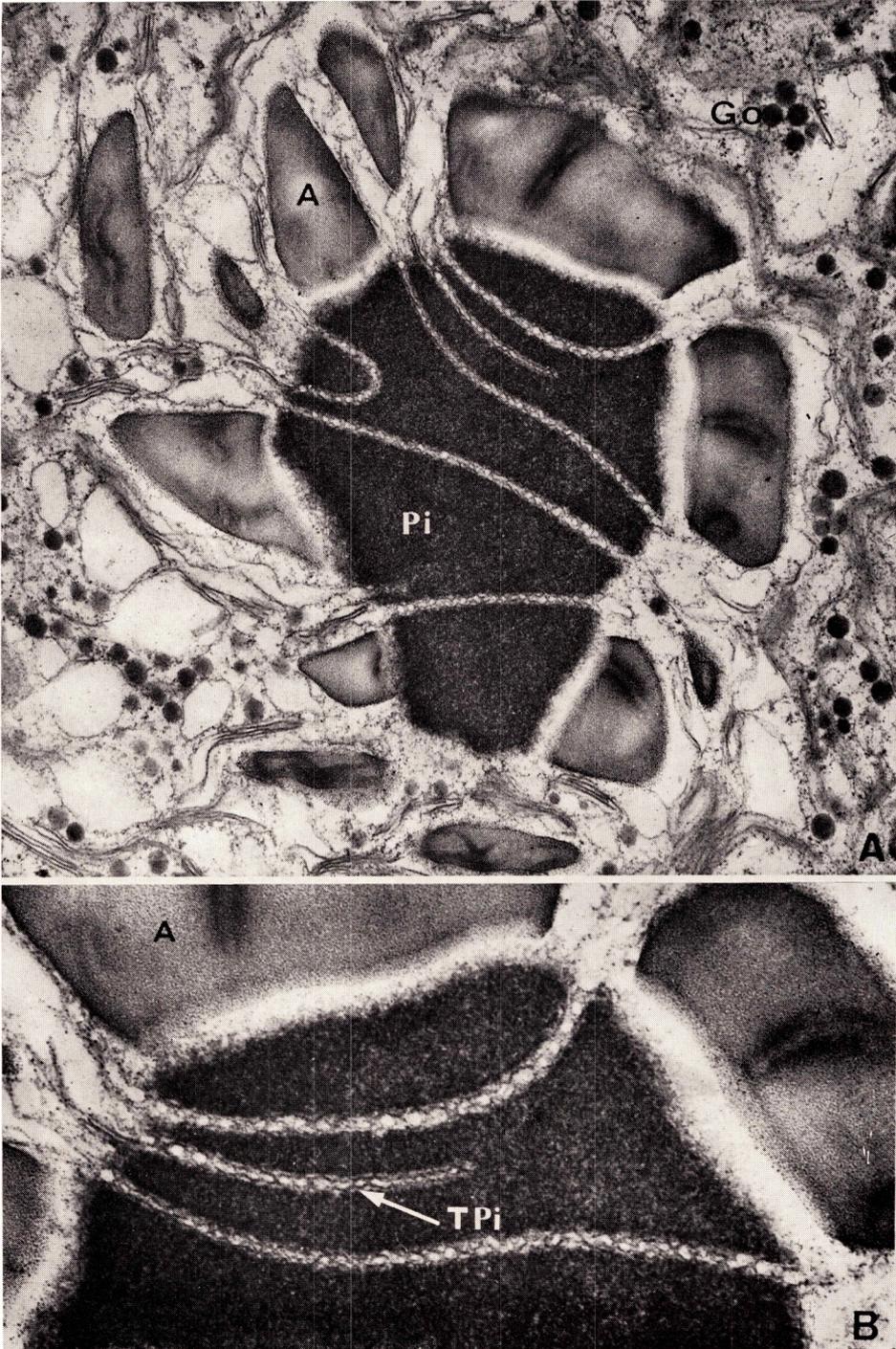
TAV. I

- A: Sezione della parete di *Bryopsis duplex* con la sottile cuticola esterna e le formazioni cilindrico-fusiformi che l'attraversano perpendicolarmente alla superficie (x 7.500).
- B: Parte di un cloroplasto e mitocondri (x 34.000).
- C: Ammasso di formazioni filamentose in seno al vacuolo centrale del cenocita (x 7.000).
- D: Sezione trasversale delle formazioni filamentose vacuolari, costituite da una massa periferica granulare e un tubulo centrale (x 100.000).
- E: Sezione longitudinale delle stesse formazioni filamentose vacuolari (x 50.000).
- C: Cuticola; Cl: Cloroplasto; F: Formazioni fusiformi; M: Mitocondri; P: Parete.



TAV. II

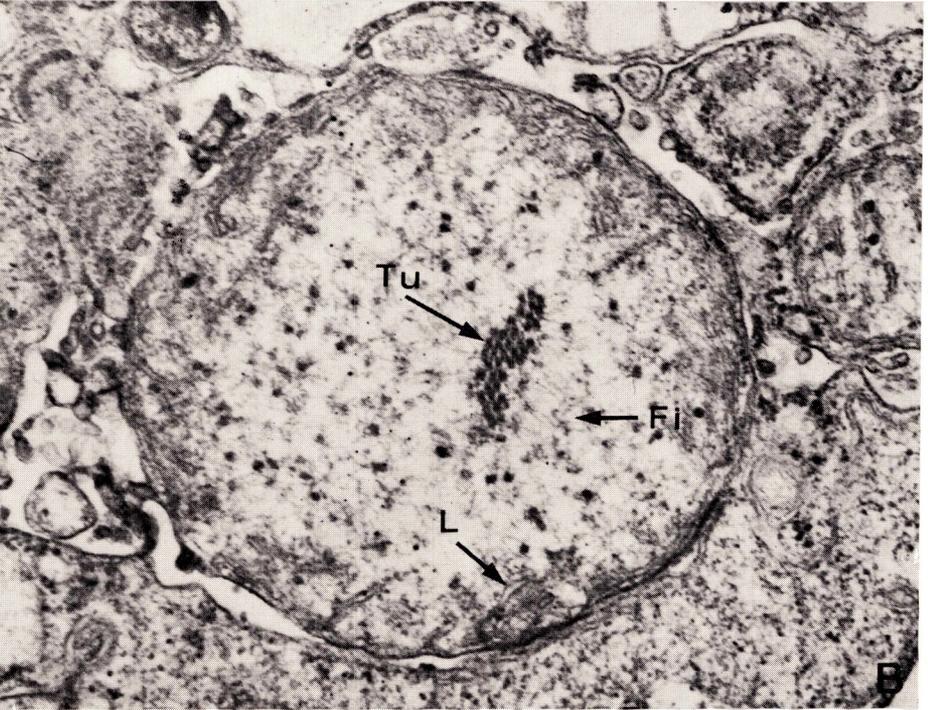
- A: Corpo pirenoideale di un cloroplasto adulto di *Bryopsis duplex* circondato da granuli di amido (x 23.000).
- B: Particolare ingrandito della sezione precedente, con tilacoidi a struttura vescicolare che attraversano il pirenoide (x 45.000).
- A: Amido; Go: Globuli osmiofilii; Pi: Pirenoide; TPi: Tilacoidi del pirenoide.



TAV. III

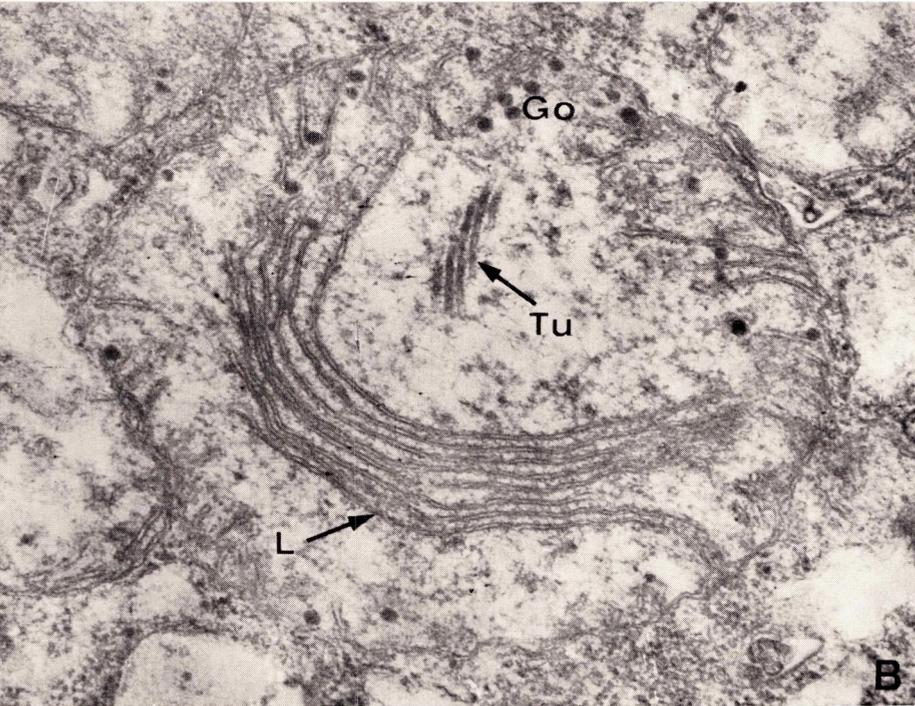
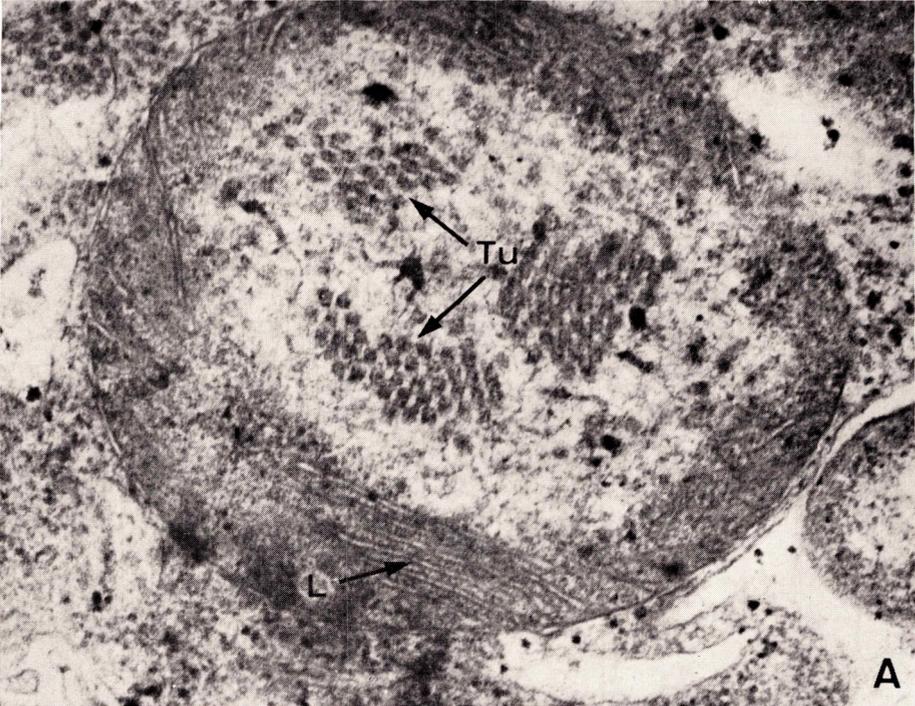
- A: Organello di tipo proplastidiale della regione apicale del cenocita di *Bryopsis duplex*. Fascetto di tubuli in sezione longitudinale (x 23.000).
- B: Lo stesso, ma con il fascetto di tubuli sezionato trasversalmente. Intorno a questo si notano fibrille che si irradiano verso la periferia. Dalla membrana interna dell'involucro si staccano formazioni lamellari (x 45.000).

Fi: Fibrille; L: Formazioni lamellari; Tu: Fascetto di tubuli.



TAV. IV

- A: Organello di tipo proplastidiale della regione apicale del cenocita di *Bryopsis duplex* in uno stadio più differenziato di quelli illustrati nella Tav. III. Si osservano tre fascetti di tubuli e un maggiore sviluppo delle strutture lamellari (x 60.000).
- B: Stadio ancora più differenziato, con riduzione delle strutture tubulari e considerevole aumento di quelle lamellari che tendono a staccarsi dalla membrana interna dell'involucro. Si notano anche globuli osmiofilo (x 60.000).
- Go: Globuli osmiofilo; L: Formazioni lamellari; Tu: Fascetto di tubuli.



TAV. V

Organello di tipo proplastidiale in uno stadio di ulteriore differenziazione rispetto a quelli illustrati nelle Tavv. III e IV. Il fascetto di tubuli è molto ridotto mentre il sistema lamellare, più sviluppato, comprende elementi collegati con la membrana interna dell'involucro ed altri liberi. Sono presenti anche globuli osmiofilici (x 60.000).

L: Formazioni lamellari; Tu: Fascetto di tubuli.

