

CARACTERÍSTIQUES ULTRASTRUCTURALS DEL TEGUMENT DE LERNANTHROPUS KROYERI VAN BENEDEN (CRUSTACEA: COPEPODA) *

Montserrat Poquet **

Rebut: juliol 1981

SUMMARY

Ultrastructural features of the integument of *Lernanthropus kroyeri* Van Beneden (Crustacea: Copepoda)

Lernanthropus kroyeri Van Beneden is an ectoparasite of *Dicentrarchus labrax* which is found attached to the gill filaments. Due to this fact, it shows morphological modifications at different levels, which are studied through Electronic Transmission and Scanning Microscopy.

On the dorsal surface, the body shows two types of epicuticular formations: very abundant ones with a tubular or filamentous aspect, which provides the copepod with a considerable increase of cuticular surface in order to a better oxygen utilization, and so improving respiratory processes through the integument; the other type of cuticular formation consists of longer and more ramified expansions less abundant than the other ones, and they have mainly a sensory function.

The cuticle, 13 μm thick, shows three markedly different zones: epicuticle, exocuticle, and endocuticle. It is crossed by a great number of canalicles, which allow the passage of substances from the underlying epithelium.

Epithelial cells have the typical morphology of this integumentary tissue, and the two main features are: a great number of septate junctions and mitochondria with very developed and abundant cristae, which means an intense respiratory and metabolic activity, due to their oxygen-poor habitat as well as to the immobility showed by *L. kroyeri*.

INTRODUCCIÓ

En línies generals, la composició química i l'estructura fonamental del tegument dels artròpodes presenta grans similituds.

Els estudis més exhaustius sobre el tema varen començar a realitzar-se en el grup dels insectes (LOCKE, 1964; RUDALL, 1965; HACKMANN, 1971). Posteriorment l'aportació de noves dades de tipus ultraestructural

* Aquest treball va ésser exposat a la sessió ordinària de la ICHN del maig de 1981.

** Departament de Morfologia Microscòpica. Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona. Avgda. Diagonal, 645. Barcelona, 28.

i histoquímic ha posat de manifest les variacions que l'estructura tegumentària presenta en d'altres grups d'artròpodes. Particularment dins de la classe dels crustacis, aquestes diferències es manifesten de forma més palesa entre els diferents ordres, essent un dels més estudiats el dels decàpodes (DRACH, 1976, 1979).

Les característiques ultraestructurals del tegument dels copèpodes han estat estudiades exhaustivament per BOULIGAND (1966, 1973) a nivell de les diferents regions que formen la cutícula, i s'ha establert la teoria de l'estructura trenada com a forma d'ordenació dels components que formen els estrats.

L'observació ultraestructural de l'epiteli tegumentari ha estat també objecte d'estudi en els treballs esmentats de BOULIGAND sobre copèpodes lliures i per DURFORT (1976) en un copèpode endoparàsit del músculo, *Mytilicola intestinalis*; s'han observat així, diferències en l'organització cel·lular motivades pels respectius règims de vida, donat que l'existència de formes lliures i paràsites dins l'ordre dels copèpodes comporta unes característiques morfològiques i ultraestructurals ben peculiars, segons quin sigui l'hàbitat de les espècies estudiades.

L'objectiu del present treball consisteix en l'estudi morfològic de les diferents capes que formen la cutícula de *Lernanthropus kroyeri* i, especialment, de les estructures que es localitzen a nivell de la capa més externa o epicutícula. Així mateix, es posaran de manifest les característiques ultraestructurals de l'epiteli tegumentari, per tal de veure les possibles implicacions que pot tenir el règim parasitari del copèpode en les seves cèl·lules.

MATERIAL I MÈTODES

Lernanthropus kroyeri Van Beneden, de la família *Lernanthropidae*, es troba com a ectoparàsit de *Dicentrarchus labrax*, adherit als filaments branquials i presenta una marcada cripsi cromàtica. Els llobarros parasitats provenen, en la major part, del litoral català, i el grau d'infestació per *L. kroyeri* és d'un 65 %.

Els exemplars estudiats eren tots adults, predominant les femelles. Una vegada separats del filament branquial al qual es trobaven adherits per mitjà del segon parell d'antenes i del tercer parell de potes,

s'ha procedit a la fixació de cada un d'ells, essent en alguns casos, prèviament anestesiats i fragmentats.

Els exemplars destinats a ésser observats amb microscòpia fotogràfica han estat fixats amb líquid de Bouin, Zenker i líquid de Pampel, aquest darrer molt adient per a la preservació de la cutícula. Posteriorment, han estat inclosos en parafina i s'han obtingut talls de 7 μ m. Les tècniques de tinció aplicades han estat les clàssiques de la hematoxilina-eosina, la tricròmica de Mallory i la tinció amb solució alcohòlica de negre de clorazol, específica per a la quitina. Estem duent a terme diferents tècniques histoquímiques que aportin noves dades sobre la naturalesa d'aquesta cutícula.

El material a observar amb microscòpia electrònica ha estat fixat amb paraformaldehid-glutaraldehid (3 %) tamponat amb tampó Sørensen o bé tampó cacodilat 0,1 N, ajustant el pH a 7,3. Després d'una segona fixació amb tetròxid d'osmi (1,5 %) s'ha procedit a la deshidratació del material utilitzant etanol o bé acetona de gradacions creixents. Posteriorment, s'ha efectuat la inclusió amb Araldita-Epon i s'han obtingut talls mitjançant un ultramicrotòm Reichert, model OmU-2. El contrastat dels talls ha estat fet amb acetat d'uranil i citrat de plom segons la tècnica



FIG. 1. Visió latero-ventral de *L. kroyeri*. Pot observar-se l'atròfia dels darrers parells de potes, així com la carcassa que recobreix tot el cos (28 X).

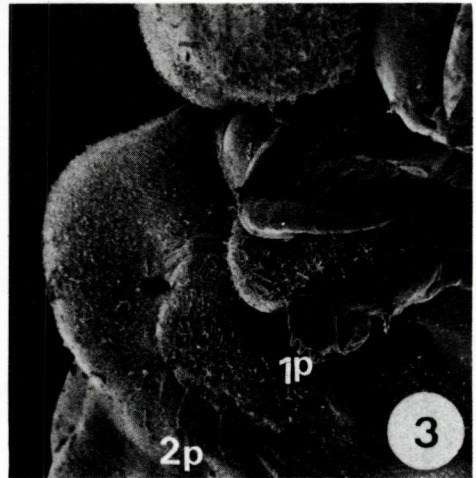
Ventral lateral view of *L. kroyeri*. Note the atrophy of the last pairs of legs, as well as the framework which covers the whole body (28 x).

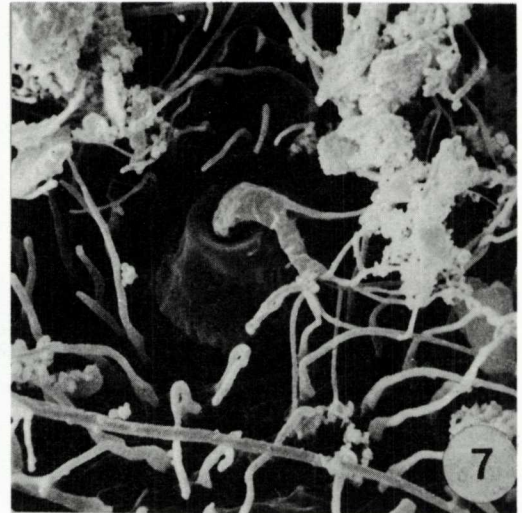
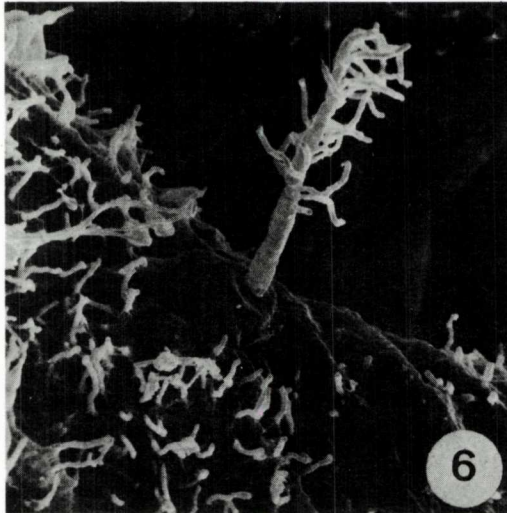
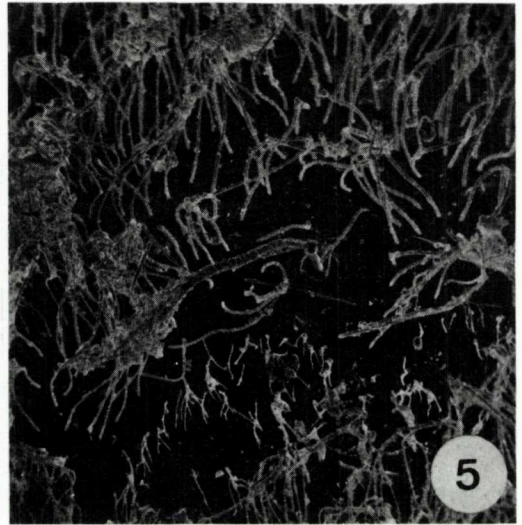
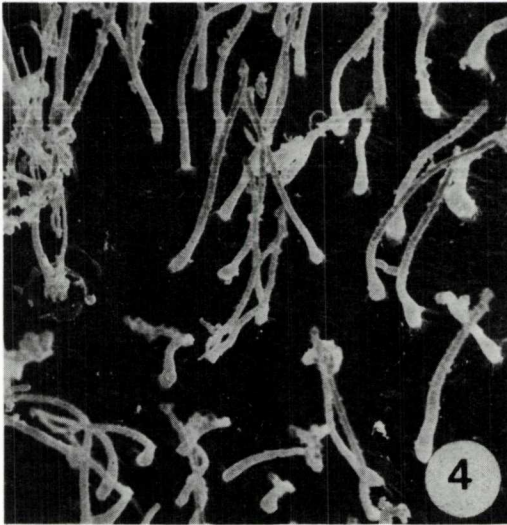
FIG. 2. Detall de la regió cefàlica amb les antenes (a) molt desenvolupades. A la base de les antenúles s'observa el flagell parabasal (f). La cutícula presenta l'aspecte filamentos característic (fletxes) (30 X).

Cephalic region detail, with very developed antenna (a). On the basis of the antennules the parbasal flagellum (f) can be observed. The cuticle shows the typical filamentous aspect (arrows) (30 x).

FIG. 3. Detall de la regió ventral. A l'extrem del primer i segon parell de potes (1p, 2p) poden observar-se espines (57 X).

Ventral region detail. On the tip of the first and second pair of legs (1p, 2p) some thorns can be seen (57 x).





FIGS. 4, 5, 6, 7. Formacions epicuticulars. A les figs. 6 i 7 poden observar-se els filaments ramificats i la base d'implantació en forma de cràter.
Epicuticular formations. In figures 6 and 7 ramified filaments and the implantation base in the shape of a crater can be observed.

de Reynolds, i l'observació s'ha realitzat amb un microscopi electrònic de transmissió Phillips 200, del Servei de Microscòpia Electrònica de la Universitat de Barcelona.

El procés inicial per al material a observar amb microscòpia d'escombratge (*scanning*) ha estat el mateix, procedint-se a una dessecació del material mitjançant la tèc-

nica del punt crític. Finalment les mostres han estat metallitzades amb vapors d'or pel mètode de l'*sputtering*. El microscopi utilitzat per a l'observació d'aquestes mostres ha estat un microscopi d'escombratge Cambridge, model Stereoscan S-4, del Servei de Microscòpia Electrònica anteriorment esmentat.

OBSERVACIONS

Cutícula

Les característiques morfològiques externes de *Lernanthropus kroyeri* han estat ja descrites en els darrers treballs de sistemàtica de RAIBAUT (1900) i de KABATA (1979). Les observacions realitzades amb microscòpia d'escombratge no fan més que confirmar els detalls d'aquesta morfologia (POQUET, 1979).

Cal assenyalar l'existència de formacions cuticulars filamentoses (figures 2, 3) que recobreixen la superfície dorsal del cos i els apèndixs de *L. kroyeri*, i constitueixen, amb freqüència, l'hàbitat de diverses colònies de bacteris, així com de ciliats sèssils. La regió ventral presenta una menor densitat de distribució d'aquests filaments, a causa, possiblement, del continu fregament d'aquesta regió del cos amb el filament branquial al qual es troba adherit.

Hi ha dos tipus diferents de filaments: els més nombrosos corresponen a unes formacions de l'epicutícula, d'estructura tubular, que tenen uns 10 μm de llargada i un diàmetre d'uns 0,5 μm (figs. 4, 5, 6, 7). Donada la seva magnitud poden visualitzar-se amb el microscopi òptic, un cop teinyits amb la tècnica del Mallory de color blau, característic d'estructures de naturalesa mucopolisacaroidea. Un segon tipus de formacions, també filamentoses, tenen uns 50 μm de llarg i uns 3,5 μm de diàmetre, i són més escasses que les anteriors. Llur regió apical es troba ramificada i la base del filament es troba dins d'una protuberància de la cutícula en forma de cràter (fig. 7). Sembla que el sistema d'implantació d'aquests filaments possibilita una certa flexibilitat i mobilitat. Aquestes estructures són en vies d'observació amb microscòpia electrònica de transmissió.

Ja en l'observació dels talls amb el microscopi òptic es visualitzen clarament tres de les quatre capes que constitueixen la cutícula dels artròpodes: una capa més externa o epicutícula d'uns 0,2 μm de gruix amb una elevada densitat als electrons, deguda possiblement a la seva naturalesa lipoproteica, una exocutícula de 8 μm de gruix i una endocutícula d'uns 5 μm que presenta més densitat electrònica que l'anterior, a la vegada que les diferents capes que la formen es troben més compactades. En les seccions obliqües, les diferents capes quitinoproteiques presenten la típica

ordenació «en arcades», característica de la cutícula dels crustacis (fig. 10). L'endocutícula presenta, a la vegada, gran nombre de canalicles que la travessen perpendicularment amb un contingut d'una elevada densitat electrònica. Pot observar-se la comunicació entre algunes cèl·lules de l'epiteli subjacent a la cutícula i alguns d'aquests canalicles (fig. 8). Aquests canalicles són visibles també en els talls observats amb microscòpia fotogràfica.

Epiteli

En contacte amb la regió més interna de l'endocutícula pot observar-se l'epiteli tegumentari format per una sola filera de cèl·lules allargades, d'uns 3 μm d'alçada per uns 11 μm de llargada, disposades amb l'eix més llarg paral·lel a la cutícula.

Entre les membranes de cèl·lules adjacents es troben un considerable nombre d'unions septades d'uns 230 nm de llarg, essent l'espai intercellular a nivell d'aquestes unions d'uns 200 Å. També s'observen gran nombre d'interdigitacions entre membranes, la qual cosa implica un increment important de l'adherència entre les diferents cèl·lules de l'epiteli (fig. 9).

El citoplasma presenta escasses vesícules de reticle endoplasmàtic rugós i algun dictiosoma, i la característica més destacable és la gran abundància de mitocondris, principalment a la regió cel·lular més propera a l'endocutícula. Si bé llur morfologia i mida no presenten alteracions, cal destacar la densitat electrònica de la matriu mitocondrial, així com les nombroses crestes que presenten (fig. 10).

El nucli té uns 2,4 μm de diàmetre i està situat a la regió central. Posseeix un sol nuclèol i una densificació bastant intensa de la cromatina.

Aquest epiteli monoestratificat està separat dels feixos musculars, dels teixits glandulars o de les cavitats, segons els diferents nivells del cos, per una làmina basal de 0,13 μm de gruix.

DISCUSSIÓ

Els apèndixs i les expansions caudals dels copèpodes presenten les formacions cuticulars que són comunes als altres ordres de crustacis (sedes, sèdules, espines). Llur importància sistemàtica és ben evi-

dent, tant per als individus adults com per als diferents estadis larvaris (RAIBAUT, 1900; KABATA, 1979). Existeixen, també, altres estructures (denticles, espines i espinules) que constitueixen l'ornamentació de diferents òrgans i presenten importants variacions quantitatives entre les espècies lliures i paràsites.

Quant a les formacions epicuticulars, cal destacar las microvellositats que té el copèpode lliure *Aleutha depressa*, les quals representen un considerable increment de la superfície cuticular per a la retenció d'aigua en períodes de baixamar (GHARGOZLOU, 1976).

Encara que els filaments cuticulars més primis que posseeix *L. kroyeri* difereixen respecte d'aquestes vellositats pel que fa a nombre i mida, el fet de tractar-se de formacions epicuticulars distribuïdes regularment per tota la superfície del cos, impliquen, també en aquest cas, un augment de la superfície del tegument, la qual cosa comportaria un millor aprofitament de l'oxigen que, es troba de forma escassament disponible a la zona on està ubicat *L. kroyeri*. Aquest factor és ben important, donat el sistema de respiració a través del tegument que presenten els copèpodes (FAHRENBACH, 1948). Així mateix, l'existència d'una coberta de mucopolisacàrids en aquests filaments implica una possible funció de defensa enfront de l'acció lítica d'alguns enzims de l'hoste (KANNUPANDI, 1976).

El segon tipus de filaments que hem localitzat a la cutícula de *L. kroyeri* tenen unes característiques morfològiques i distribuïcionals comparables a les del sistema microsedal descrit per DRAQH (1979) en diferents espècies de crustacis decàpodes. A diferència de les macrosedes que actuen com a efectors mecànics, les microsedes tenen una funció mecano-químio-receptora. Aquesta funció sensorial dels filaments ramificats de *L. kroyeri* vindrà confirmada per les observacions que estem duent a terme actualment amb microscòpia electrònica de transmissió.

Pel que fa referència al gruix de la cutícula dels diferents gèneres de copèpodes, sembla ser que el medi on habiten influeix en gran manera aquesta característica morfològica. El copèpode lliure *Calanus finmarchicus* té una cutícula d'uns 5 µm de gruix (RAYMOND *et al.*, 1974), mentre que la de *Mytilicola intestinalis* no sobrepassa els 2 µm (DURFORT, 1976). *Caligus savala*,

copèpode ectoparàsit d'alguns gàdids, presenta una cutícula que, en determinades regions del cos, arriba a fer els 30 µm (KANNUPANDI, 1976). Sembla lògic, doncs, que el grau de parasitisme, i les modificacions que això comporta en l'estructura externa i la immobilitat de *L. kroyeri* influïen també en els 13 µm de gruix que té la seva cutícula.

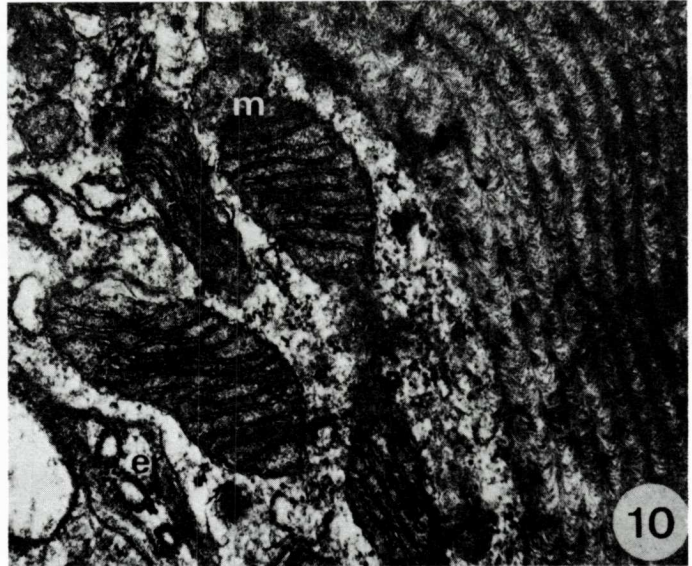
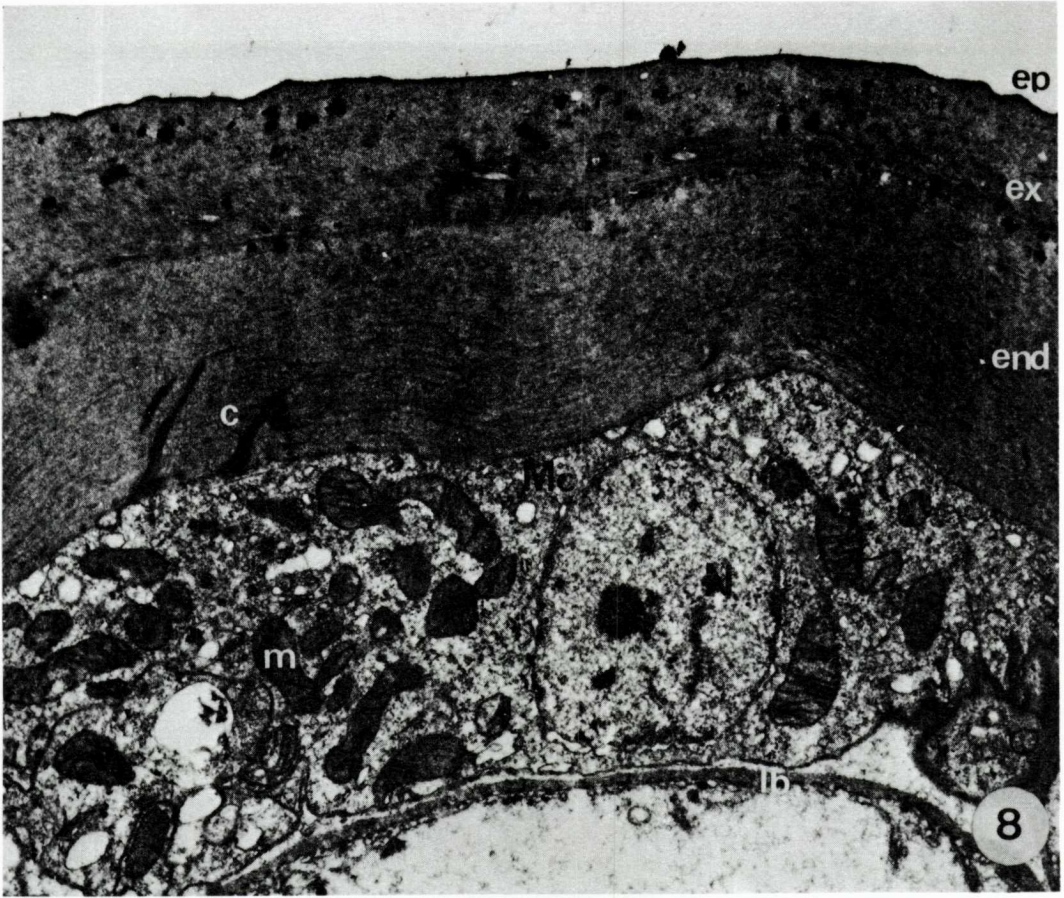
L'existència dels canalicles transversals que travessen l'endocutícula, han estat descrits en crustacis superiors (*pore canals*). En copèpodes, en canvi, han estat observats més rarament. Només hem trobat referències d'aquestes estructures en *Aleutha depressa* i en dos copèpodes paràsits, *Pennella elegans* (KANNUPANDI, 1976) i *Limnaressia mamillifera* (BOULIGAND, 1966), el qual manca d'aparell digestiu, i l'absorció de nodriments, la realitza per mitjà d'aquests canalicles. Aquest no és el cas de *L. kroyeri* que posseeix un aparell digestiu ben desenvolupat, la ultraestructura del qual estem estudiant. Pel gruix de la seva cutícula i l'aspecte d'aquests canalicles, obliterats per quitina i altres substàncies, és probable que tinguin, com en la major part dels crustacis, una funció de conducció de diferents components procedents de les cèl·lules epitelials que intervenen en la formació d'aquesta regió del tegument (DENNELL, 1960).



FIG. 8. En aquesta secció lleugerament obliqua de la cutícula poden observar-se les tres capes: epicutícula (ep), exocutícula (ex) i endocutícula (end). S'observen alguns canalicles (c) transversals. A la cèl·lula epitelial s'observen gran nombre de mitocondris (m). N: nucli; M: membrana cel·lular; lb: làmina basal (14.500 X).
In this slightly oblique section three layers can be observed: epicuticle (ep), exocuticle (ex) and endocuticle (end). Note some cross canalicles (c). A great number of mitochondria (m) can be observed in the epithelial cell. N: nucleus; M: cellular membrane; lb: basal plasma membrane (14.500 x).

FIG. 9. Interdigitacions de la membrana cel·lular. Les fletxes indiquen dues unions septades (59.000 X).
Cellular membrane interdigitations. The arrows show two septate junctions (59.000 x).

FIG. 10. S'observa la disposició «en arcades» dels estrats de la cutícula. Er: ergastoplasma; m: mitocondris (39.000 X).
Cuticle layers placed in arc. Er: ergastoplasm; m: mitochondria (39.000 x).



La presència en les cèl·lules epitelials d'unions septades és un fet comú en aquesta categoria cel·lular de la majoria d'invertebrats (NOIROT-TIMOTHÉE, 1980). Aquest tipus de contactes, així com el gran nombre d'interdigitacions comporta una gran cohesió cel·lular, característica dels epitelis tegumentaris de tota l'escala animal.

L'escassetat d'òrgànuls citoplasmàtics fa pensar en una fase de les cèl·lules de poca activitat, si bé l'existència de petites zones de reticle endoplasmàtic, així com d'algun dictiosoma, indiquen estadis cel·lulars anteriors en els quals pot haver existit un important increment d'òrgànuls implicats en la secreció de determinats components de la cutícula. Cal assenyalar que els exemplars estudiats són en fase postexuvial i, per tant, la propera muda és més o menys llunyana i la cutícula estudiada és de formació relativament recent. Aquest fet ve confirmat amb les dades obtingudes de l'estudi de l'intestí de *L. kroyeri*, en el qual es pot observar l'inici de formació de concrecions calcàries que posteriorment intervindran en el procés de consolidació de la cutícula, després de l'exuviació.

L'elevat nombre de mitocondris en les cèl·lules de l'epiteli tegumentari va ésser ja assenyalat per DURFORT (1976) en *Mytilicola intestinalis*. En el cas de *L. kroyeri*, l'increment de crestes mitocondrials indica una activitat respiratòria molt intensa, per tal de compensar la relativa escassetat d'oxigen que pot absorbir pel tegument, a causa del gruix que presenta aquest i de la pobresa en oxigen del medi on habita el copèpode.

BIBLIOGRAFIA

- BOULIGAND, Y. 1966. Le tégument de quelques copépodes et ses dépendances musculaires et sensorielles. *Mém. Muséum Natl. Hist. Nat. (Paris)*, A, XL (4): 189-206.
- DENNELL, R. 1960. Integument and exoskeleton. In: *The Physiology of Crustacea, Vol. 1. Metabolism and Growth*. Academic Press. London.
- DRACH, P. 1976. Système sétifère des Crustacés Décapodes. Insertion des soies sur l'exosquelette et données générales sur leur structure cuticulaire. *C. R. Acad. Sc. Paris*, 282 (D): 1869-1871.
- DRACH, P. & JACQUES, F. 1979. Système sétifère des Crustacés Décapodes. Le système microsétal. *C. R. Acad. Sc. Paris*, 288 (D): 1103.
- DURFORT, M. 1976. Estructura y ultraestructura del tegumento de *Mytilicola intestinalis* Steuer Crustacea, Copepoda). *Miscelánea Zoológica*, III (5): 69-77.
- FAHRENBAACH, M. 1962. The biology of a harpacticoid copepod. *La Cellule*, LXII: 303-376.
- GHRAGOZLOU-VAN GINNEKEN, I. D. & BOULIGAND, Y. 1973. Ultrastructures tegumentaires chez un crustacé copépode *Cletocaptus retrogressus*. *Tissue & Cell*, 5 (3): 413-439.
- GHRAGOZLOU-VAN GINNEKEN, I. D. 1976. Particularités morphologiques du tégument des peltidiidae (Crustacés Copépodes). *Arch. Zool. exp. gén.*, 117: 411-422.
- HACKMANN, R. H. 1971. The integument of Arthropoda. In: *Chemical Zoology*, VI (B). Academic Press. London.
- KABATA, T. 1979. *Parasitic Copepoda of British Fishes*. The Ray Society. London.
- KANNUPANDI, T. 1976. Cuticular adaptations in two parasitic copepods in relation to their modes of life. *J. exp. mar. Biol. Ecol.*, 22: 235-248.
- LOCKE, M. 1964. The structure and formation of the integument in insects. In: *Physiology of Insecta*. Rockstein, ed., Academic Press.
- NOIROT-TIMOTHÉE, C. 1980. Septate and scalariform junctions in Arthropods. *Int. Rev. of Cytology*, 63: 97-140.
- POQUET, M. 1979. Aportaciones al estudio morfológico de algunas especies de copépodos parásitos de peces del litoral mediterráneo. *Miscelánea Zoológica*, 5: 161-171.
- RAIBAUT, J. 1977. Les copépodes parasites des Muges en Méditerranée. *Bull. Mus. natn. Hist. nat.*, 3e. sér., 472 (329): 848-933.
- RAYMOND, J. E. G., KRISHNASWAMY, S. WOODHOUSE, M. A. & GRIFFIN, R. L. 1974. Studies on the fine structure of Copepoda. Observations on *Calanus finmarchicus* Gunnerus. *Proc. R. Soc. Lond.*, B. 185: 409-424.
- RUDALL, K. M. 1965. Skeletal Structure in Insects. In: *Aspects of Insect Biochemistry*. Ed. T. W. Goodwin, pp. 83-92. Academic Press. London.