

S. DE LUCCHINI (*), L. VITELLI (*), R. BATISTONI (*)

BANDEGGIO CROMOSOMICO IN ALCUNE SPECIE DI ANFIBI ANURI. I. « C-BANDING »

Riassunto — I cromosomi di due specie di Anfibi Anuri primitivi, *Ascaphus truei* (Ascaphidae), ed *Alytes obstetricans* (Discoglossidae), sono stati sottoposti alla tecnica del « C-banding ». E' stato così possibile studiare la distribuzione dell'eterocromatina costitutiva in cariotipi che presentano caratteristiche di primitività, quali l'alto numero cromosomico e diversi piccoli cromosomi e microcromosomi. Questa analisi ha permesso di stabilire che l'eterocromatina costitutiva è preferenzialmente localizzata a livello delle regioni centromeriche di tutti i cromosomi: in particolare i microcromosomi risultano eucromatici, ad eccezione della loro regione centromerica. Questi dati sono discussi in rapporto alle attuali ipotesi sulla evoluzione cariológica degli Anfibi.

Abstract — *Chromosome banding in some species of Anuran Amphibians. I. C-banding.* The chromosomes of two primitive anuran amphibian species, *Ascaphus truei* (Ascaphidae) and *Alytes obstetricans* (Discoglossidae), have been examined by the C-banding method. The karyotypes of these species are considered to possess primitive characteristics, such as a high chromosome number and many small chromosomes and microchromosomes. The constitutive heterochromatin, as revealed by the appearance of the C-bands, is preferentially located at, or close to the centromeres in both species. The microchromosomes appear to be euchromatic, except for their centromeric region. The results are discussed in relation to current ideas on the karyological evolution within Amphibia.

Key words — C-banding; constitutive heterochromatin; primitive Anura.

INTRODUZIONE

Le tecniche di bandeggio cromosomico sviluppatasi nel corso dell'ultimo decennio, consentono di ottenere una differenziazione lineare dei diversi elementi di un corredo, la cui struttura apparirebbe altrimenti omogenea ad una analisi di microscopia ottica

(*) Istituto di Istologia ed Embriologia dell'Università di Pisa.

(cfr. BOSTOK e SUMNER, 1978). Metodi diversi producono « patterns » specifici di bandeggio, permettendo in taluni casi di correlare regioni differenzialmente colorate con la loro costituzione molecolare. Così, ad esempio, il « C-banding » colora preferenzialmente regioni di eterocromatina costitutiva, mentre l'« N-banding » e l'« Ag-staining » mettono in evidenza le regioni nucleolo-organizzatrici di un corredo (ARRIGHI e HSU, 1971; MATSUI e SASAKI, 1973; GOODPASTURE e BLOOM, 1975).

I metodi di bandeggio sono stati utilmente impiegati a scopo citotassonomico, in quanto permettono un confronto più fine tra cariotipi di specie a diverso grado di parentela. Per quanto riguarda gli Anfibi, il metodo più largamente usato è il « C-banding », anche se i cromosomi di alcune specie sono stati esaminati con l'« N-banding » e l'« Ag-staining » (FUNAKI et al., 1975; RAGGHIANI et al., 1977; NARDI et al., 1978).

Negli Anfibi esistono notevoli differenze nella struttura dei cariotipi di specie primitive e di specie evolute. I corredi di specie primitive sono in genere caratterizzati da un alto numero cromosomico, a cui contribuiscono elementi acrocentrici e numerosi piccoli cromosomi e microcromosomi. Al contrario i cariotipi di specie più evolute sono formati da un numero minore di elementi per lo più metacentrici e mancano di microcromosomi. L'evoluzione cariologica degli Anfibi avrebbe quindi comportato la riduzione del numero cromosomico, la sostituzione dei cromosomi acrocentrici con elementi dibrachiali e l'apparente scomparsa dei microcromosomi.

I meccanismi attraverso cui sarebbero avvenute queste modificazioni cariologiche sono stati ampiamente discussi (cfr. MORESCALCHI, 1973, 1980; MANCINO et al., 1977; VITELLI et al., 1981). In particolare, è stato ipotizzato che la scomparsa dei microcromosomi non sia dovuta ad una loro reale perdita, ma che essi siano stati incorporati, mediante traslocazioni e/o fusioni centriche, nei grandi cromosomi dibrachiali delle specie più evolute.

Mentre la distribuzione dell'eterocromatina costitutiva è stata studiata recentemente in un discreto numero di specie appartenenti a famiglie evolute (MANCINO et al., 1977; KEZER e SESSION, 1979; RAGGHIANI et al., 1978; SCHMID, 1978 *a, b*; SCHMID, 1980) sono invece praticamente assenti dati sulla distribuzione dell'eterocromatina costitutiva in specie appartenenti a famiglie primitive di Anfibi. L'unica eccezione è rappresentata da osservazioni com-

piute in *Hynobius keyserlingii* e *Andrias japonicus*, urodeli primitivi appartenenti rispettivamente alle famiglie Hynobidae e Criptobranchidae (MORESCALCHI et al., 1977; BATISTONI et al., 1980).

L'interesse dell'applicazione del C-banding a cariotipi di specie primitive di Anfibi è correlato alla esigenza di stabilire se i microcromosomi, ed i piccoli cromosomi, abbiano natura eu- od eterocromatica; ciò potrebbe contribuire a rafforzare, o meno, l'ipotesi di una loro perdita solo apparente. Infatti, se il contenuto dei microcromosomi fosse eucromatico, la loro perdita dovrebbe comportare la scomparsa di funzioni geniche utili od essenziali; al contrario un contenuto eterocromatico potrebbe essere compatibile con una effettiva perdita dei microcromosomi, verificatasi nel corso dell'evoluzione cariologica degli Anfibi. Ci è sembrato pertanto interessante applicare il metodo del « C-banding » a due specie primitive di Anfibi, appartenenti all'ordine degli Anuri: *Ascaphus truei* (Ascaphidae) ed *Alytes obstetricans* (Discoglossidae), i cui cariotipi rispecchiano i canoni di primitività prima enunciati. Infatti *Ascaphus truei* ha $2n = 46$; questa formula è costituita da 5 coppie di cromosomi grandi, meta- o submetacentrici, 4 coppie di elementi medio/piccoli acrocentrici o submetacentrici, e da 14 coppie di microcromosomi, acrocentrici (MORESCALCHI, 1967). *Alytes obstetricans* ha $2n = 38$, con 14 coppie di piccoli cromosomi; in questa specie l'unica coppia residua di veri acrocentrici è rappresentata dalla coppia X. (MORESCALCHI, 1966).

MATERIALI E METODI

Preparati citologici. Sono stati esaminati, mediante « C-banding », due individui di *Ascaphus truei* (Stejneger) (fam. Ascaphidae), provenienti da Eugene, Oregon, USA; tre individui di *Alytes obstetricans* (Laurenti) (fam. Discoglossidae) provenienti da Scheeze (Francia).

Tutti gli animali hanno ricevuto due iniezioni intraperitoneali di colchicina (Sigma) allo 0,3%, rispettivamente 24 e 12 ore prima di essere sacrificati. Il volume di colchicina iniettata variava da 0,2 a 0,5 ml. a seconda del peso dell'animale. Da ogni individuo è stato prelevato l'intestino (se femmina), o intestino e testicoli (se maschio).

Dopo un trattamento di 20 minuti in acqua distillata, i pezzi

prelevati sono stati trasferiti in fissativo di Carnoy (alcol etilico assoluto/acido acetico glaciale 3:1) per 30 minuti. Frammenti dei tessuti fissati sono stati quindi immersi in una goccia di acido acetico al 45% posta su un vetrino coprioggetto ricoperto di silicone, e dissociati quanto possibile con pinze da orologeria al microscopio binoculare. I preparati citologici sono stati allestiti per schiacciamento, usando vetrini portaoggetto ricoperti di gelatina e resi stabili mediante congelamento su ghiaccio secco (CONGER e FAIRCHILD, 1953).

C-banding. I preparati citologici sono stati sottoposti a « C-banding » entro quattro settimane dal loro allestimento. La tecnica usata per ottenere le C-bande è descritta da GALL e PARDUE (1971). Il metodo consiste essenzialmente nel trattamento dei preparati con NaOH 0,07 N per due minuti, seguito da incubazione in $2 \times$ SSC (0,3 M NaCl, 0,03 M sodio citrato) a 65°C per alcune ore. I preparati vengono infine colorati con Giemsa (diluito 1:20 in 1/100 M tampone fosfato, pH 7) e montati in Permount.

Le migliori metafasi mitotiche osservate durante lo studio dei preparati sono state usate per la costruzione dei cariotipi. I cariotipi di *Ascaphus truei* e di *Alytes obstetricans* sono stati costruiti in accordo a precedenti analisi carilogiche (cfr. MORESCALCHI, 1973).

RISULTATI

I risultati ottenuti vengono descritti separatamente per ciascuna specie.

a) *Ascaphus truei*. L'induzione delle C-bande nei cromosomi mitotici di *Ascaphus truei* dimostra che l'eterocromatina costitutiva è prevalentemente localizzata nelle regioni centromeriche di tutti gli elementi del corredo. Inoltre, in alcuni cromosomi più grandi anche i telomeri appaiono spesso più intensamente colorati. Per quanto riguarda i microcromosomi, questi risultano completamente eucromatici, ad eccezione delle regioni centromeriche, che presentano C-bande (Fig. 1).

b) *Alytes obstetricans*. In *Alytes obstetricans* sono stati sottoposti a « C-banding » preparati contenenti sia cromosomi mitotici che figure meiotiche. Anche in questa specie quasi tutte le regioni

centromeriche contengono eterocromatina costitutiva, ad eccezione di quelli delle coppie V, VII e XVI. Occorre inoltre rilevare che, analogamente a quanto osservato in *Ascaphus truei*, anche in *Alytes obstetricans* i più piccoli elementi del corredo appaiono eucromatici, ad eccezione dei loro centromeri (Fig. 2).

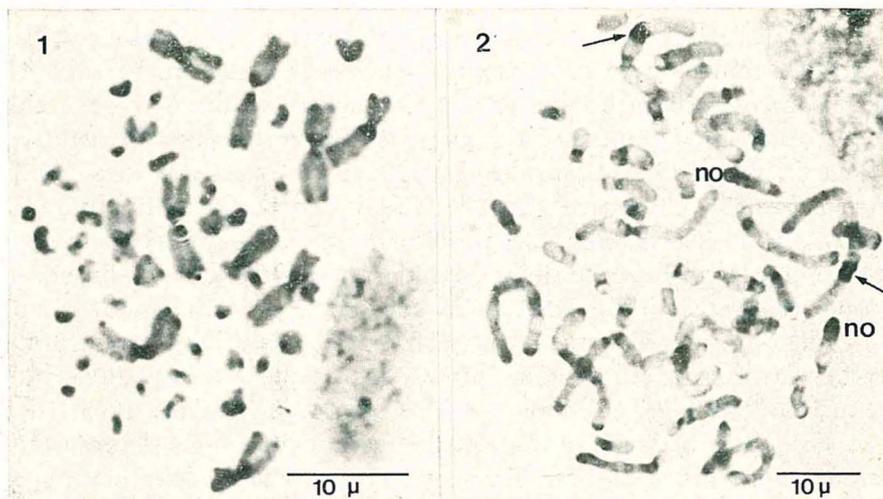


Fig. 1 - Metafase di cellula intestinale di *Ascaphus truei* dopo C-banding: C-bande sono presenti a livello di tutte le regioni centromeriche e dei telomeri di alcuni tra gli elementi più grandi del corredo.

Fig. 2 - Metafase di cellula intestinale di *Alytes obstetricans* dopo C-banding: le regioni centromeriche di quasi tutti i cromosomi mostrano C-bande. Le frecce indicano la cospicua C-banda localizzata in posizione intercalare nel braccio corto della coppia I. NO = regione nucleolo-organizzatrice, più intensamente colorata, presente nella coppia X.

Per quanto riguarda altre C-bande, nella coppia I è evidente, specialmente in alcune metafasi mitotiche, una cospicua banda C-positiva posta in una posizione intercalare del braccio corto. Un'altra banda intercalare, meno rilevante, è presente sul braccio corto di entrambi gli omologhi della coppia V. Bande pericentriche e telomeri più intensamente colorati sono spesso visibili, specialmente negli elementi più grandi del corredo. Infine, nella coppia X, in posizione subterminale del braccio lungo, è presente un piccolo tratto C-positivo: questo è posto a livello di una costrizione secondaria che contiene i geni per il 18S + 28S rRNA (VITELLI et al., 1981) (Fig. 2).

Lo studio dei bivalenti della 1^a metafase meiotica e delle diadi della 2^a metafase meiotica ha confermato i risultati ottenuti nei preparati mitotici.

DISCUSSIONE

La procedura del « C-banding », applicata a preparati citologici mette in evidenza nei cromosomi eucariotici bande trasversali più intensamente colorate rispetto alle rimanenti regioni. Si ritiene che le C-bande corrispondano a regioni di eterocromatina costitutiva (GALL e PARDUE, 1971; ARRIGHI e HSU, 1971; YUNIS e YASMINEH, 1972), ricche in DNA ripetitivo (COOPER e HSU, 1972). Recenti studi, riguardanti i meccanismi che producono il « C-banding », suggeriscono che la produzione delle C-bande possa dipendere dalla rimozione preferenziale del DNA della eucromatina: la maggior quantità di DNA residuo nella eterocromatina sarebbe responsabile della più intensa colorazione con Giemsa delle C-bande (COMINGS et al., 1973; PATHAK e ARRIGHI, 1973; COMINGS e AVELINO, 1975).

I risultati ottenuti in questo lavoro indicano, per le specie esaminate, una localizzazione preferenziale dell'eterocromatina costitutiva a livello dei centromeri. Questa non è tuttavia la localizzazione esclusiva della eterocromatina costitutiva, in quanto C-bande intercalari, telomeriche e subterminali sono talora presenti, specialmente nei cromosomi più grandi del corredo.

Un particolare interesse è rivolto ai microcromosomi di *Ascapus truei* ed ai piccoli cromosomi di *Alytes obstetricans*. Infatti, fra i tetrapodi, informazioni circa la natura ed il contenuto genetico dei microcromosomi sono ancora scarse.

Indagini condotte in varie specie di uccelli mediante C-banding hanno messo in evidenza che i microcromosomi possono avere un contenuto variabile di eterocromatina costitutiva (STEPHOS e ARRIGHI, 1971). Un DNA ripetitivo è essenzialmente localizzato a livello dei microcromosomi nel serpente *Ptyas mucosus* (SINGH et al., 1976) e nella quaglia *Coturnix coturnix* (BROWN e JONES, 1972); analogamente i microcromosomi di *Gallus domesticus* hanno un contenuto in DNA ripetitivo superiore ai macrocromosomi (STEPHOS e ARRIGHI, 1974). Su base citologica, si ritiene inoltre che i microcromosomi della quaglia e del pollo siano responsabili dell'organizzazione del nucleolo (COMINGS e MATTOCCIA, 1970; OHNO et al., 1962).

Dopo C-banding i microcromosomi di *Ascaphus truei* ed i piccoli cromosomi di *Alytes obstetricans* appaiono essere prevalentemente eucromatici, ad eccezione dei loro centromeri. Questi risultati sono in accordo con quanto trovato negli urodeli primitivi *Hynobius keyserlingii* (Hynobidae) ed *Andrias japonicus* (Cryptobranchidae) dopo C-banding (BATISTONI et al., 1980; MORESCALCHI et al., 1977). Anche in queste specie, infatti, i microcromosomi appaiono prevalentemente eucromatici eccetto alcune regioni centromeriche.

Mediante esperimenti di ibridazione *in situ* è stato recentemente dimostrato che alcune coppie di microcromosomi (in *H. keyserlingii* ed in *A. truei*) e di piccoli cromosomi (in *A. obstetricans*) contengono cospicui gruppi di geni per il 5S rRNA (BATISTONI et al., 1980; VITELLI et al., 1981). In queste stesse specie, microcromosomi e piccoli cromosomi non contengono invece gruppi di geni per il 18S + 28S rRNA.

L'insieme di questi dati implica che i microcromosomi ed i piccoli cromosomi degli Anfibi primitivi possono avere un contenuto genetico di rilievo la cui perdita potrebbe non essere conciliabile con la sopravvivenza e l'evoluzione delle specie. Le osservazioni sopra esposte sembrano perciò favorire l'idea che questi elementi siano andati incorporandosi entro i cromosomi più grandi dei cariotipi di specie più evolute.

Occorre tuttavia rilevare l'esistenza di un caso, finora unico, non facilmente inquadrabile nell'ambito di questo concetto: nell'anuro primitivo *Leiopelma hochstetteri* (fam. Ascaphidae) i cariotipi individuali possiedono numeri diversi di microcromosomi, che sembrano perciò comportarsi come elementi accessori e non essenziali (MORESCALCHI, 1968; STEPHENSON et al., 1972, 1974). Riteniamo tuttavia, che sarebbe interessante cercare di verificare se nel caso di *Leiopelma* sia avvenuta una reale perdita dei microcromosomi in parte degli individui, o se si tratti di un processo di integrazione dei microcromosomi in altri elementi del corredo, analogo a quello che si è ipotizzato avvenire in tempi evolutivi negli Anfibi.

BIBLIOGRAFIA

- ARRIGHI F. E., HSU T. C. (1971) - Localization of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetics*, **10**, 81-86.
- BATISTONI R., DE LUCCHINI S., VITELLI L., ANDRONICO F., NARDI I., BARSACCHI-PILONE G. (1980) - Karyological analysis and distribution of ribosomal genes in *Hynobius*

- keyserlingii* (Amphibia Urodela) and *Alytes obstetricans*. *Atti Assoc. Genet. Ital. XXV Riun. Sci.*, **25**, 31-35.
- BOSTOCK C. J., SUMMER A. T. (1978) - Substructure of chromosome and the banding phenomena. In: *The Eukaryotic Chromosomes*. Elsevier, North-Holland Biomedical Press. pp. 375-405.
- BROWN J. E., JONES K. W. (1972) - Localization of satellite DNA in the microchromosomes of the Japanese quail by in situ hybridization. *Chromosoma (Berl.)*, **38**, 313-318.
- COMINGS D. E., AVELINO E., OKADA T. A., WYANDT H. E. (1973) - The mechanism of C- and G-banding of chromosomes. *Exp. Cell Res.*, **77**, 469-493.
- COMINGS D. E., AVELINO E. (1975) - Mechanisms of chromosome banding. Interaction of methylene blue with DNA and chromatin. *Chromosoma (Berl.)*, **51**, 365-379.
- COMINGS D. E., MATTOCCIA E. V. (1970) - Studies of microchromosomes and a G-C rich DNA satellite in the quail. *Chromosoma (Berl.)*, **30**, 202-214.
- CONGER A. D., FAIRCHILD L. M. (1953) - A quick-freeze method for making smear slides permanent. *Stain technol.*, **28**, 281-283.
- COOPER J. E. K., HSU T. C. (1972) - The C-band and G-band patterns of *Microtus agrestis* chromosomes. *Cytogenetics*, **11**, 295-304.
- FUNAKI K., MATSUI S., SASAKI M. (1975) - Location of nucleolar organizers in animal and plant chromosomes by means of an improved N-banding technique. *Chromosoma (Berl.)*, **49**, 357-370.
- GOODPASTURE C., BLOOM S. E. (1975) - Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma (Berl.)*, **53**, 37-50.
- GALL J. G., PARDUE M. L. (1971) - Nucleic acid hybridization in cytological preparations. In: *Methods in enzymol., Nucleic acids pt D*, **21**, 470-480. (L. Grossman and K. Moldave, eds.) Academic Press, New York.
- KEZER J., SESSIONS S. K. (1979) - Chromosome variation in the *Plethodontid* Salamander, *Aneides ferreus*. *Chromosoma (Berl.)*, **71**, 65-80.
- MANCINO G., RAGGHIANI M., BUCCI-INNOCENTI S. (1977) - Cytotaxonomy and cytogenetics in European newt species. In: *the reproductive biology of Amphibians*, D.H. Taylor and S.I. Guttman eds., Plenum publ. Corp., New York, pp. 411-447.
- MATSUI S., SASAKI M. (1973) - Differential staining of nucleolus organizers in mammalian chromosomes. *Nature (Lond.)*, **246**, 148-150.
- MORESCALCHI A. (1966) - Cariologia comparata di *Alytes obstetricans* (Laurenti) e dei Discoglossidae europei. *Riv. Biol.*, **59**, 1-40.
- MORESCALCHI A. (1967) - Note citotassonomiche su *Ascaphus truei* Stejn. (Amphibia salientia). *Atti Soc. Peloritana, Ac. fis. mat. nat.*, **13**, 23-30.
- MORESCALCHI A. (1968) - The karyotype of two specimens of *Leiopelma hochstetteri* (Fitz) (Amphibia, salientia). *Caryologia*, **21**, 37-46.
- MORESCALCHI A. (1973) - Amphibia. In: *Cytotaxonomy and Vertebrate evolution*, A.B. Chiarelli and E. Capanna eds. Acad. Press, London and New York, pp. 233-248.
- MORESCALCHI A. (1980) - Evolution and karyology of the amphibians. *Boll. Zool.*, **47**, (suppl.), 113-126.
- MORESCALCHI A., ODIERNA G., OLMO E. (1977) - Karyological relationships between the Cryptobranchial salamanders. *Experientia (Basel)*, **33**, 1579-1581.
- NARDI I., DE LUCCHINI S., BARSACCHI PILONE G., ANDRONICO F. (1978) - Chromosome location of the ribosomal RNA genes in *Triturus vulgaris meridionalis* (Amphibia, Urodela). IV. Comparison between in situ hybridization with ³H 18S + 28S rRNA and AS-SAT staining. *Chromosoma (Berl.)*, **70**, 91-99.

- OHNO S., CHRISTIAN L. C., STEINIES C. (1962) - Nucleolus-organizing microchromosomes of *Gallus domesticus*. *Exp. Cell Res.*, **27**, 612-614.
- PATHAK S., ARRIGHI F. (1973) - Loss of DNA following C-band procedures. *Cytogenet. Cell Genet.*, **12**, 414-422.
- RAGGHIANI M., BUCCI INNOCENTI S., MANCINO G. (1977) - An ammoniacal silver staining technique for mitotic chromosomes of *Triturus* (Urodela: Salamandridae). *Experientia (Basel)*, **33**, 1319-1321.
- RAGGHIANI M., BUCCI INNOCENTI S., MANCINO G. (1978) - Karyology of the Carpathian newt *Triturus montandoni* and cytotaxonomic considerations on the species group *T. vulgaris* (Urodela: Salamandridae). *Caryologia (Firenze)*, **31**, 243-256.
- SCHMID M. (1978a) - Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in Bufo and Hyla. *Chromosoma (Berl.)*, **66**, 361-388.
- SCHMID M. (1978b) - Chromosome banding in Amphibia. II. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in Ranidae, Microhylidae and Rhacophoridae. *Chromosoma (Berl.)*, **68**, 131-148.
- SCHMID M. (1980) - Chromosome banding in Amphibia. IV. Differentiation of GC and AT-rich chromosome regions in Anura. *Chromosoma (Berl.)*, **77**, 83-103.
- SINGH L., PURDOM I. F., JONES K. W. (1976) - Satellite DNA and the evolution of sex chromosomes. *Chromosoma (Berl.)*, **59**, 43-62.
- STEPHENSON E. M., ROBINSON E. S., STEPHENSON N. G. (1972) - Karyotypic variation within the genus *Leiopelma* (Amphibia, Anura). *Can. J. Genet. Cytol.*, **14**, 691-702.
- STEPHENSON E. M., ROBINSON E. S., STEPHENSON N. G. (1974) - Interspecific relationships of *Leiopelma* (Amphibia: Anura) further karyological evidence. *Experientia (Basel)*, **30**, 1248-1250.
- STEPHOS K., ARRIGHI F. E. (1971) - Heterochromatic nature of W Chromosome in birds. *Exp. Cell Res.*, **68**, 228-250.
- STEPHOS K., ARRIGHI F. E. (1974) - Repetitive DNA of *Gallus domesticus* and its cytological locations. *Exp. Cell Res.*, **83**, 9-14.
- VITELLI L., BATISTONI R., ANDRONICO F., NARDI I., BARSACCHI PILONE G. (1981) - Chromosomal localization of 18S + 28S and 5S ribosomal RNA genes in evolutionarily diverse anuran amphibians. *Chromosoma*, in press.
- YUNIS J. J., YASMINEH W. G. (1972) - Model for mammalian constitutive heterochromatin. In: *Advances in cell and molecular biology* (F.J. Du Praw, ed.), vol. **2**, 1-46. New York: Academic Press.

(ms. pres. il 18 ottobre 1981; ult. bozze il 15 dicembre 1981)