

G. MANCINO (*), M. RAGGHIANI (*), S. BUCCI (*),
L. BERGER (**), H. HOTZ (***), T. UZZELL (****)

RANA ESCULENTA COMPLEX: UN MODELLO PER STUDI CITOGEOGRAFICI? (1)

Riassunto — È stata studiata la citotassonomia di *Rana lessonae*, *R. ridibunda* e *R. esculenta* su parecchi esemplari provenienti dai dintorni di Poznan (Polonia). Sono stati analizzati i cromosomi mitotici di cellule somatiche e germinali, C-bandegeggiati o trattati con actinomomicina D e Hoechst 33258. Di queste stesse specie sono stati anche studiati i bivalenti spermatocitari e sono state rilevate le caratteristiche morfo-strutturali dei *lampbrush chromosomes*.

I cariotipi dei cromosomi mitotici e *lampbrush* di *R. lessonae* e *R. ridibunda* presentano marcatori citogenetici specifici. Nel corredo somatico di *R. esculenta* è invece possibile distinguere cromosomi con i caratteri di *R. lessonae* e cromosomi con i caratteri di *R. ridibunda*: ciò conferma che *R. esculenta* della stessa area geografica è un ibrido tra *R. lessonae* e *R. ridibunda*.

L'analisi dei bivalenti spermatocitari e *lampbrush* di alcuni esemplari di *R. esculenta* ha messo in luce la presenza, nella prima divisione meiotica, di autobivalenti con i caratteri citogenetici di *R. ridibunda*: questi esemplari ibridi si riproducono quindi per via ibridogenetica. L'ibridazione prevede infatti l'espulsione del genoma di *R. lessonae* seguita da endoreduplicazione del genoma di *R. ridibunda* prima dell'inizio della meiosi. La fecondazione con un gamete di *R. lessonae* ripristinerebbe quindi il carattere ibrido di *R. esculenta*. Altri esemplari tuttavia possono comportarsi da veri ibridi sfuggendo alla sequenza espulsione-endoreduplicazione e andando perciò incontro a scompensi ed aberrazioni meiotiche (come parziale o totale asinapsi e riduzione del crossing over) simili a quelli segnalati in ibridi di tritone. Alcune volte queste difficoltà citologiche sono aggravate dalla parziale inosservanza del meccani-

(*) Istituto di Istologia e Embriologia, Università di Pisa, Via A. Volta 4, I-56100 Pisa.

(**) Zakład Biologii Rolnej, Instytut Ekologii Polskiej Akademii Nauk, Swierc-zewskiego 19, PL-60-809 Poznan, Poland.

(***) Zoologisches Museum der Universität Zürich, Switzerland.

(****) The Academy of Natural Sciences, 19th and the Parkway, Philadelphia, Pennsylvania 19103, USA.

(1) Lavoro eseguito con i contributi del C.N.R. e del Ministero della Pubblica Istruzione.

simo ibridogenetico, potendo le cellule germinali sottostare all'uno o all'altro stadio di tale sequenza. Alcuni individui inoltre presentano una condizione di ibridazione associata a poliploidia. Il meccanismo ibridogenetico sembra perciò acquisito anche dai singoli esemplari alloploidici seppure in modo non rigido. Così un ibrido triploide (RRL) ha mostrato cellule germinali capaci di regolarizzarsi qualitativamente e quantitativamente ricorrendo alla sola espulsione del genoma di *R. lessonae*, mentre altre cellule si ricorrono ordinatamente alla sequenza ibridogenetica completa, producendo spermatogoni tetraploidi con cromosomi appartenenti totalmente a *R. ridibunda*.

Lo studio citotassonomico e citogenetico di ibridi F_1 tra *R. ridibunda* proveniente dall'area sud-occidentale adriatica della Jugoslavia e *R. lessonae* polacca sia di ibridi F_1 tra la prima specie della Polonia ed una forma jugoslava non ancora definita, ma sicuramente affine a *R. lessonae*, ha permesso di supporre che l'assenza di ibridogenesi possa essere dovuta o a inefficacia, in certe regioni, dei presunti fattori di *R. ridibunda* che inducono l'espulsione genomica di *R. lessonae*; oppure che possa esistere, nel genoma di *R. lessonae* e nelle forme ad essa simili, una sorta di resistenza all'espulsione d'intensità variabile nelle diverse aree geografiche.

Abstract — *Rana esculenta* complex: a model for cytogeographic studies? Cytotaxonomic studies were performed in *Rana lessonae*, *R. ridibunda* and *R. esculenta* collected in Poland. Somatic and spermatogonial mitotic chromosomes and spermatocyte I bivalents were submitted to a C-banding technique or treated with actinomycin D in combination with 33258 Hoechst. Besides, lampbrush chromosomes from ovarian oocytes of the same three forms were analyzed on unfixed and fixed preparations.

Mitotic and lampbrush karyotypes of *R. lessonae* and *R. ridibunda* are differentiated by specific cytogenetic markers. The somatic chromosome constitution of *R. esculenta* is mixed, showing chromosomes with the specific features of *R. lessonae* together with chromosomes with the specific features of *R. ridibunda*: this can be assumed as a cytotaxonomic evidence confirming that *R. esculenta* is a hybrid between *R. lessonae* and *R. ridibunda*.

Spermatocyte I bivalents and oocyte I lampbrush chromosomes of several hybrid specimens can be properly defined as autobivalents since their chromosome partners are perfectly symmetric showing the markers of *R. ridibunda* and a high rate of genetic recombination. This is in line with a hybridogenetic gametogenesis postulated for *R. esculenta*, which implies the exclusion of the *lessonae* genome from the hybrid complement and subsequent endoreduplication of the *ridibunda* genome prior to meiosis. Fertilization with a gamete with a *lessonae* genome would restore the hybrid constitution of *R. esculenta*.

Differently, few hybrid specimens are not able to overcome their hybrid constitution by submitting all their germ cells to emiclonal reproduction; consequently they are mosaics of meiotic cells, some with a haploid number of hybrid bivalents with heterozygous features and reduced number of chiasmata; some others with more or less serious deficiencies such as partial or total asynapsis and lower rate of recombination as noted, for instance in ♀ 10 a/82. Sometimes, there is evidence that the hybridogenetic mechanism can be accomplished only partially in hybrids, some cells undergoing endoreduplication without previously excluding the *ridibunda* genome. The constitution of allotriploid F_1 (RRL), for instance, is made of a mosaics of germ cells, some of which are numerically and qualitatively balanced, having excluded the

lessonae genome without subsequent endoreduplication and some others which accomplish both genome exclusion and endoreduplication, giving rise to germ cells with a 4n *ridibunda* genome.

Cytotaxonomic and cytogenetic studies done on hybrids F₁ between *R. ridibunda* from Adriatic SW Yugoslavia and Polish *R. lessonae* and on hybrids F₁ between Polish *R. ridibunda* and a unnamed Yugoslavian taxon allied to *R. lessonae* show that emiclonal gametogenesis can be absent in certain areas. The results suggest that hybridogenesis may be not a generalized reproductive modality for *R. esculenta*: *R. ridibunda* genome may contain putative factors inducing exclusion of the *lessonae* genome the strength of which can vary geographically; alternatively, the *lessonae* genome could present a sort of resistance to the exclusion stronger or weaker according to different geographic areas.

Key words — Hybridization / hybridogenesis / karyotype / lampbrush chromosomes

INTRODUZIONE

Basandosi sull'analisi morfologica di campioni raccolti nei dintorni di Poznan, BERGER (1966) distinse le Rane verdi paleoartiche in: *Rana lessonae* Camerano, 1882; *Rana ridibunda* Pallas, 1771 e *Rana esculenta* Linnaeus, 1758. Operando incroci secondo i criteri ibridologici, BERGER (1966, 1967) ritenne che *Rana esculenta* risultasse dalla ibridazione, tuttora in atto, tra *Rana lessonae* e *Rana ridibunda*. Nell'Europa centrale, tali ibridi presentano spesso una riproduzione che si può definire emiclonale (KALLMAN, in VRIJENHOEK et al., 1977) in quanto seguono una strategia riproduttiva, detta ibridogenesi, scoperta per la prima volta nei pesci ibridi del genere *Poeciliopsis* (SCHULTZ, 1966, 1969). Questo meccanismo si attua quando ibridi interspecifici escludono uno dei genomi parentali prima dell'inizio della gametogenesi; quindi endoreduplicano il genoma trattenuto producendo in tal modo gameti con un solo genoma parentale che così viene trasmesso alla discendenza secondo un'eredità emiclonale. Furono TUNNER (1973, 1974) e UZZELL, HOTZ e BERGER (1980) e TUNNER e HEPPICH (1981) a confermare i dati sulla condizione ibrida di *Rana esculenta*, ed a proporre la modalità di riproduzione ibridogenetica: essi videro infatti che la linea germinale presentava inizialmente i caratteri di eterozigosi tipica di ibridi, successivamente i caratteri di omozigosi per una sola specie parentale.

A fronte di molte ricerche condotte con le tecniche più disparate, relativamente scarsi sono stati finora gli studi citotassonomici nel *Rana esculenta* complex: GALGANO (1930) definì il numero cromo-

somico del corredo di *R. esculenta*, mentre MORESCALCHI (1962) ne descrisse il catiotipo mitotico e rilevò i dati citogenetici essenziali studiandone la spermatogenesi. I *lampbrush chromosomes* furono dapprima studiati da MORESCALCHI e FILOSA (1965), poi furono ordinati in mappe da GIORGI e GALLEN (1972) i quali, tuttavia, nella scelta del loro materiale di studio, non avevano potuto tenere nella giusta considerazione la precedente opinione di Berger circa la diversità delle forme rappresentate nel gruppo. Anche GRAF e MÜLLER (1979) esaminarono i *lampbrush chromosomes* di *Rana esculenta*, ma non poterono trarne conclusioni di tipo citotassonomico, non disponendo di mappe specifiche contenenti le caratteristiche distintive. HEPPICH (1978) e HEPPICH e TUNNER (1979), invece, posero correttamente il problema citotassonomico operando a livello di cromosomi mitotici sottoposti a tecniche di bandeggio e di fluorescenza. Questo studio ha rappresentato per noi un riferimento, guidandoci nell'approccio citotassonomico degli esemplari di *Rana* provenienti dall'Europa centro-orientale ed oggetto del nostro studio. Abbiamo così rianalizzato i cariotipi mitotici e i bivalenti spermatocitari di *Rana lessonae*, *R. ridibunda* e *R. esculenta* sottoposti a C-bandeggio e alla fluorescenza e soprattutto abbiamo compilato le mappe dei cromosomi giganti oocitari, *lampbrush chromosomes*, delle tre forme ottenendo una visione completa della costituzione cromosomica di ciascuno esemplare, ma anche un'indicazione della modalità citologica del processo gametogenetico da esso seguito.

MATERIALE E TECNICA

Lo studio è stato effettuato su individui di *Rana lessonae*, *R. ridibunda* e *R. esculenta* raccolti nei dintorni di Poznan (Polonia): a Naramowice, Zurawiniec e Turew 18 esemplari (8 ♀♀ e 10 ♂♂) della prima specie; a Dymaczewo e Fabianowo 14 esemplari (6 ♀♀ e 8 ♂♂) di *R. ridibunda* e a Turew, Edwardowo, Pozybystowice e Nowe Miasto 11 esemplari (6 ♀♀ e 5 ♂♂) di *R. esculenta*. Le analisi cromosomiche sono state anche compiute su ibridi tra ♀ *R. lessonae* (Poznan) e ♂ *R. ridibunda* (Ulciny, Jugoslavia) protocollati come 9/82 e 10 a/82. Infine sono stati esaminati 3 maschi triploidi raccolti a Zakryewo (Poznan) ed allevati in laboratorio a partire dalla metamorfosi.

Gli esemplari venivano iniettati intracelomicamente con 3⁰/₀₀ colchicina 48 h e 24 h prima della biopsia del testicolo, dell'intesti-

no e della milza. Tutto il materiale era trattato con H₂O distillata per 10 min., fissato in una soluzione di 3:1 alcool etilico assoluto acido acetico glaciale per 20 min. e dissociato in acido acetico al 45%. Le preparazioni citologiche, allestite secondo il metodo «dry ice», venivano o bandeggiate con il colorante Giemsa in accordo ad ARRIGHI e HSU (1971); oppure erano sottoposte alla tecnica di fluorescenza (SCHWEIZER, 1976; HEPPICH et al., 1982) in cui l'actinomicina D è usata in associazione con Hoechst 33258. La tecnica di preparazione dei *lampbrush chromosomes* è descritta da GALL (1966) per i cromosomi dei Salamandridi: frammenti di ovario erano posti in 0,1 M K/NaCl aventi un rapporto molare di K:Na di 5:1 (CALLAN e LLOYD, 1960). Le vescicole germinali erano aperte in 1/4 di 5:1 più PO₄ contenente lo 0,1% di paraformaldeide.

OSSERVAZIONI E DISCUSSIONE

Le principali caratteristiche strutturali di interesse citotassonomico sono le seguenti: i cromosomi mitotici di *R. lessonae* non presentano centromeri ben rilevabili dopo C-bandeggio né fluorescenti dopo actinomicina D e Hoechst 33258; i centromeri non sono rilevabili neppure sui *lampbrush chromosomes* studiati *in vivo* che tuttavia presentano una certa ricchezza di *loops* giganti di tipo GFL e di strutture laterali di notevole entità. *Rana ridibunda* presenta invece cromosomi mitotici con centromeri ben marcati dopo C-bandeggio e fluorescenti; anche i *lampbrush chromosomes* di questa specie sono caratterizzati da evidenti centromeri mentre i *loops* giganti sono meno numerosi e di proporzioni meno cospicue che in *R. lessonae*. Gli esemplari di *R. esculenta* esaminati presentano, nella linea somatica, cellule in cui era possibile riconoscere cromosomi mitotici di *R. lessonae* e di *R. ridibunda*. Questo dato ci ha così permesso di ottenere una prova convincente che *R. esculenta* è un vero ibrido tra *R. lessonae* e *R. ridibunda*. Con questa importante premessa citogenetica abbiamo esaminato la metafase I meiotica dei maschi ibridi diploidi ed abbiamo notato che per lo più gli spermatoцитi I presentano bivalenti con centromeri evidenti su entrambi i partners; per cui abbiamo ritenuto di considerare questi bivalenti come autobivalenti, prodotti cioè dall'appaiamento di cromosomi fratelli; tali cromosomi identici tra loro sarebbero derivati da endoreduplicazione premeiotica del solo genoma di *R. ridibunda*, essendo stato espulso quello di *R. lessonae* secondo l'ipotesi ibridogenetica.

Anche in linea femminile, i cromosomi *lampbrush* del tipo *R. lessonae* sono assenti negli ovociti I ovarici di alcuni ibridi *R. esculenta*: i bivalenti sono perfettamente simmetrici, la frequenza dei chiasmi è alta, i centromeri sono ben visibili su entrambi i partners, mentre i *loops* giganti sono scarsi. Ciò ha permesso di trarre la conclusione che gli esemplari di *R. esculenta* da noi studiati sono ibridi diploidi F_1 i quali mantengono l'evidenza citologica di tale condizione nella linea somatica. La maggior parte di questi ibridi si riproducono ibridogeneticamente dando origine a gameti aploidi con il genoma di *R. ridibunda* trasmesso emiclonalmente.

Altri esemplari (9/82, 10 a/82), invece, non riescono a superare la condizione ibrida facendo ricorso alla strategia della ibridogenesi; essi vanno così incontro a situazioni riportabili alle anomalie e alle aberrazioni meiotiche notate e descritte in altri ibridi animali, come negli ibridi di tritone (MANCINO et al., 1979).

La sinapsi può tuttavia essere totale e i bivalenti mostrano i markers di *R. lessonae* su un partner e di *R. ridibunda* sull'altro: in tal caso si ha abbassamento del numero dei chiasmi; altre volte la sinapsi è parziale (presenza di bivalenti e univalenti) o si verifica asinapsi totale (presenza di soli univalenti), per cui è facile prevedere gli scompensi che si producono nelle successive fasi del processo gametogenetico. Frequentemente nello stesso ovario ibrido si possono verificare situazioni diverse ed ogni ovocita sembra seguire un comportamento autonomo ed avere un esito singolare.

Un individuo ibrido (σ 3RRL, Zakryewo) è risultato triploide con due genomi di *R. ridibunda* ed uno di *R. lessonae* (RRL): le sue mitosi somatiche presentano infatti circa 39 cromosomi ripartiti in due gruppi di $2n$ cromosomi di *R. ridibunda* più n cromosomi di *R. lessonae*. Il testicolo di questo maschio ha presentato almeno due linee cellulari: una costituita da spermatogoni diploidi con tutti i cromosomi identificabili come appartenenti a *R. ridibunda*; questa linea cellulare evidentemente riesce a conseguire la regolarizzazione quantitativa e qualitativa, utilizzando la fase dell'ibridogenesi durante la quale avviene l'eliminazione del genoma aploide di *R. lessonae* ma evitando di sottoporsi alla successiva endoreduplicazione. È evidente che in tal caso si formano veri bivalenti con incremento della ricombinazione genetica. La seconda linea cellulare è rappresentata da cellule con $4n$ cromosomi di *R. ridibunda* che, evidentemente, hanno reduplicato successivamente alla esclusione del genoma di *R. lessonae*. Risulta chiaro quindi che la dinamica ibridogenetica è stabilmente acquisita nella struttura genetica della riprodu-

zione di questo ibrido e che la sequenza eliminazione-raddoppiamento non è una successione rigida di due diversi fenomeni citologici, ma la sequenza può essere dissociata e pesare diversamente su linee cellulari diverse.

Tutti i dati qui presentati sembrano indicare l'assenza, nel genoma di *R. lessonae*, di resistenza ai fattori che inducono l'ibridogenesi e la sua esclusione dalla linea germinale degli ibridi. Ma la citologia di esemplari derivati da incroci tra *R. ridibunda* proveniente dalla Jugoslavia Adriatica sud-occidentale e *R. lessonae* polacca (incroci 9/82 e 10 a/82) sembra indicare che esistono aree geografiche in cui gli ibridi non seguono il meccanismo riproduttivo ibridogenetico nella sua interezza e sequenzialità sottoponendosi perciò alle difficoltà della gametogenesi ibrida. Potrebbe quindi essere avanzata l'ipotesi che il genoma di *R. ridibunda* della Jugoslavia sud-occidentale non contenga fattori capaci di indurre l'esclusione del genoma di *R. lessonae* e che perciò la capacità *R. ridibunda* di indurre gametogenesi ibridogenetica negli ibridi possa variare geograficamente. Di contro, si potrebbe anche supporre che il genoma di *R. lessonae* e di specie ad essa affini possieda forze di «resistenza» all'esclusione premeiotica, d'intensità variabile nelle diverse aree geografiche che impedirebbero lo svolgersi di una gametogenesi emiclonale.

Se ciò risulterà confermato, il complesso *Rana esculenta* potrà rappresentare un modello per studi citogeografici in accordo con quanto prospettato da Horz et al. (1985).

BIBLIOGRAFIA

- ARRIGHI F.E., HSU T.C. (1971) - Localization of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetics*, **10**, 81-86.
- BERGER L. (1966) - Biometrical studies on the population of green frogs from the environs of Poznan. *Annales Zoologici*, **23**, 303-324.
- BERGER L. (1967) - Embryonal and larval development of F₁ generation of green frogs different combinations. *Acta Zool. Cracov*, **12**, 123-160.
- CALLAN H.G., LLOYD L. (1960) - Lampbrush chromosomes of crested newts *Triturus cristatus* (Laurenti). *Philos. Trans. royal Soc. London*, (B) **243** (702), 135-219.
- GALGANO M. (1930) - Il numero e la forma dei cromosomi nel processo spermatogenetico di *Rana esculenta*. *L. Monit. Zool. It.*, Suppl., **41**, 224-227.
- GALL J.G. (1966) - Techniques for the study of lampbrush chromosomes. In: Prescott D. (ed.): *Methods in cell physiology*, vol. 2. New York, Academic Press, p. 37.
- GIORGI F., GALLEN L. (1972) - The lampbrush chromosomes of *Rana esculenta* L. (Amphibia-Anura). *Caryologia*, **25**, 107-123.

- GRAF J.D., MÜLLER W.P. (1979) - Experimental gynogenesis provides evidence of hybridogenetic reproduction in the *Rana esculenta* complex. *Experientia*, **35**, 1574-1576.
- HEPPICH S. (1978) - Hybridogenesis in *Rana esculenta*: C-band karyotypes of *Rana ridibunda*, *Rana lessonae* and *Rana esculenta*. *Z. zool. Syst. Evolut.-forsch.*, **16**, 27-39.
- HEPPICH S., TUNNER H.G. (1979) - Chromosomal constitution and C-banding in homotypic *Rana esculenta* crosses. *Mitt. Zool. Mus. Berlin*, **55** (1), 111-114.
- HEPPICH S., TUNNER H.G., GREILHUBER J. (1982) - Premeiotic chromosome doubling after genome elimination during spermatogenesis of the species hybrid *Rana esculenta*. *Theor. Appl. Genet.*, **61**, 101-104.
- HOTZ H., MANCINO G., BUCCI-INNOCENTI S., RAGGHIANI M., BERGER L., UZZELL T. (1985) - *Rana ridibunda* varies geographically in inducing clonal gametogenesis in interspecies hybrids. *J. Expt. Zool.* (in press).
- MANCINO G., RAGGHIANI M., BUCCI-INNOCENTI S. (1979) - Experimental hybridization within the genus *Triturus* (Urodela: Salamandridae): III. Evidence for crossing-over, true chiasmata and chromosomal homologies in the spermatogenesis of F₁ species hybrids. *T. cristatus carnifex* ♀ x *T. marmoratus* ♂. *Chromosoma* (Berl.), **73**, 207-229.
- MORESCALCHI A. (1962) - Osservazioni sul corredo cromosomico di *Rana esculenta*. *Boll. Zool.*, **29**, 601-609.
- MORESCALCHI A., FILOSA S. (1965) - Osservazioni sui cromosomi piumosi di *Rana esculenta*. *Atti Soc. Pelor. Sc. Fis. Mat. Nat.*, **11**, 211-219.
- SCHULTZ R.J. (1966) - Hybridization experiments with an all-female fish of the genus *Poeciliopsis*. *Biol. Bull.*, **130**, 415-429.
- SCHULTZ R.J. (1969) - Hybridization, unisexuality, and polyploidy in the teleost *Poeciliopsis* (Poeciliidae) and other vertebrates. *Amer. Nat.*, **103** (934), 605-619.
- SCHWEIZER D. (1976) - Dapi fluorescence of plant chromosomes prestained with actinomycin. *D. Exp. Cell Res.*, **102**, 408-413.
- TUNNER H.G. (1973) - Des Albumin und andere Bluteiweisse bei *Rana ridibunda* Pallas, *Rana lessonae* Camerano, *Rana esculenta* Linné und deren Hybriden. *Z. Zool. Syst. Evol. Forsch.*, **11** (3), 219-233.
- TUNNER H.G. (1974) - Die klonale Struktur einer Wasserfroschpopulation. *Z. Zool. Syst. Evol. Forsch.*, **12** (4), 309-314.
- TUNNER H.G., HEPPICH S. (1981) - Premeiotic genome exclusion during oogenesis in the common edible frog, *Rana esculenta*. *Naturwissenschaften*, **68**, (4), 207-208.
- TUNNER H.G., HEPPICH S. (1982) - A genetic analysis of water frogs from Greece: evidence for the existence of a cryptic species. *Z. Zool. Syst. Evol. Forsch.*, **20** (3), 209-223.
- UZZELL T., HOTZ H., BERGER L. (1980) - Genome exclusion in gametogenesis by an interspecific *Rana* hybrid: evidence from electrophoresis of individual oocytes. *J. Expt. Zool.*, **214** (3), 251-259.
- VRIJENHOEK R.S., ANGUS R.A., SCHULTZ R.J. (1977) - Variation and heterozygosity in sexually vs. clonally reproducing populations of *Poeciliopsis*. *Evolution*, **31** (4), 767-781.