

ESTRATTO
DAL
Monitore Zoologico Italiano

Anno LV, N. 1-6 — Firenze 1946.

G. CEI

Note citologiche sulle cellule germinali maschili di « *Rana graeca* Blg. », di « *Rana arvalis* Nils. » e di *Rana dalmatina* « Bonap. ».

(Con 6 figure nel testo).



FIRENZE
DITTA EDITRICE LUIGI NICCOLAI
1946

ISTITUTO DI ZOOLOGIA DELL'UNIVERSITÀ DI FIRENZE

Note citologiche sulle cellule germinali maschili di «*Rana graeca* Blg. », di «*Rana arvalis* Nils. » e di «*Rana dalmatina* Bonap. ».

(Con 6 figure nel testo).

G. CEI

È vietata la riproduzione.

Sulla base dell'ultima « Check-List » di OGUMA e MAKINO (1937) (1) e attenendosi alla scarsa bibliografia successiva, per le specie suddette si debbono registrare: o un'assenza totale di dati citologici sull'evoluzione gametogena delle cellule germinali maschili, come nel caso di *Rana graeca*, oppure delle notizie incidentali e talora poco convincenti, quali ad esempio quelle su *Rana arvalis*. Il materiale utilizzato per le mie osservazioni provenne quasi tutto da esemplari presi in libertà e subito sacrificati e fissati, in parte da altri esemplari in perfette condizioni, sacrificati durante precedenti ricerche comparative sul determinismo del ciclo sessuale nelle Rane rosse: ricerche cui rimando pertanto il lettore per maggiori dettagli sul complesso andamento del ciclo sessuale annuo in natura e in particolare del ciclo spermatogenetico (2).

I testicoli esaminati vennero fissati in liquido del Sanfelice, preparato al momento dell'uso (160 cc. di Acido Cromico 1%, 80 cc. di Formalina, 10 cc. di Acido Acetico), inclusi in paraffina, affettati in sezioni di 10-12 μ e le sezioni colorate quindi con emallume, saffranina, orange.

La colorazione rosso intenso della saffranina è specialmente indicata per le meiosi e permette nel loro studio una maggior trasparenza e un ottimo dettaglio delle tetradi, consentendone l'osservazione in più piani successivi, con fette di un certo spessore, e dimostrandosi dunque preferibile anche all'ematossilina ferrica nel conteggio dei cromosomi.

La misura della grandezza approssimata delle cellule germinali ma-

(1) A New List of the Chromosome Numbers in Vertebrata (March 1937). *J. of the Fac. Sc. Hokk. Imp. Univ.*, S. VI, Vol. V, 4, 1937.

(2) G. CEI, Analisi biogeografica e ricerche biologiche e sperimentali sul ciclo sessuale annuo delle Rane rosse d'Europa. *Suppl. Monit. Zool. It.*, A. LIV, 1944.

schili, nei loro stadi successivi di evoluzione (1), porta a disporre le varie specie di *Rana* esaminate secondo un ordine di grandezza decrescente, espresso dalla seguente serie: *Rana graeca*, *Rana latastei*, *Rana esculenta*, *Rana dalmatina*, *Rana arvalis*, *Rana temporaria*.

Infatti le cellule germinali di *Rana graeca* risultano tra tutte le più grandi: le loro dimensioni superano in certi stadi (spermatogonio, spermatocita I al termine del periodo di accrescimento) di circa un quarto o un terzo quelle di *R. arvalis* o di *R. dalmatina*, di circa un sesto quelle di *R. esculenta* e di circa un terzo quelle di *R. temporaria*, avendo aggiunto nella serie anche le misure di queste ultime due specie per un più completo quadro di confronto. La *Rana latastei*, di cui non ho potuto esaminare altro che protogoni e spermatogoni, parrebbe invece tra le forme congeneri quella che maggiormente s'avvicina per dimensioni delle cellule germinali alla *Rana graeca*, i cui elementi corrispondenti sembrano superare quelli di *R. latastei* soltanto di un decimo. Simili correlazioni tuttavia non si mantengono per gli spermici rappresentati in ordine di grandezza crescente nella fig. 1 e relativamente diversi tra di loro anche per aspetto. Il confronto tra gli spermici permette così di distinguervi un primo gruppo, vicino dal punto di vista morfologico a *Rana esculenta* e a cui appartengono *Rana graeca* e *R. latastei* (testa dello spermio a bastoncino corto e fusiforme), e un secondo gruppo, dai gameti sensibilmente differenziati rispetto a quelli del precedente, cui si debbono invece riferire *Rana temporaria* e *R. dalmatina* (testa dello spermio a filamento lungo e appuntito). *Rana arvalis* possiede infine degli spermici di lunghezza intermedia, ma analoghi per forma a quelli del gruppo *esculenta*.

La morfologia comparata degli spermici sembra seguire in definitiva le numerose altre differenze, istologiche e fisiologiche, che ci consentono lo smistamento delle Rane rosse in due gruppi biologici geneticamente contrapposti, probabilmente per lontane cause filetiche e in accordo con la sistematica del genere.

Poche osservazioni possono esser fatte sulla forma dei cromosomi, tanto nelle mitosi proto- e spermatogoniali, quanto nelle divisioni riduzionali degli spermatociti I e nelle divisioni degli spermatociti II. Si tratta dei soliti cromosomi a V, a bastoncino, ad uncino, a biscotto, nodosi o puntiformi. Della forma e del numero, diploide ed aploide, in *Rana graeca*, in *Rana dalmatina* e in *Rana arvalis*, danno sufficiente idea le figg. 2, 3, 4. Nelle tre specie il numero aploide corrisponde al-

(1) Vedi la terminologia proposta dal BECCARI: BECCARI N., A proposito di nomenclatura nello studio delle cellule genitali negli Anfibi. *Monit. Zool. It., Suppl. Vol. XLII, 1932.*

la formula $N = 13$ e quello diploide alla formula $2N = 26$, formule abituali e presso che costanti nella totalità delle specie di *Rana* sottoposte a recenti e attendibili conteggi (OGUMA e MAKINO, 1937, lav.

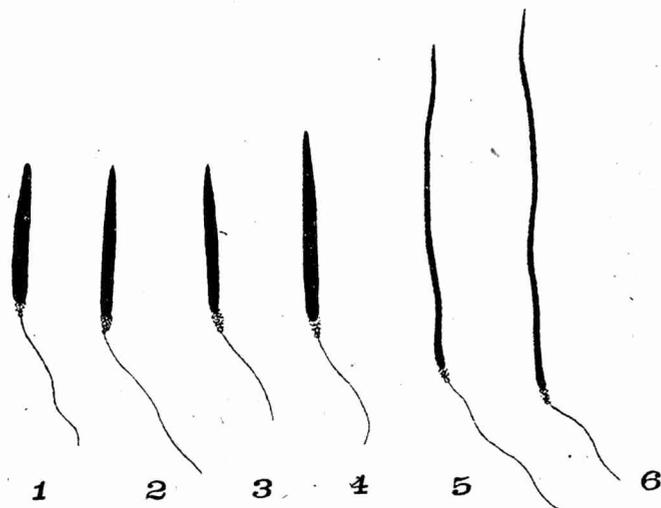


Fig. 1. — Spermatozoi di alcune specie di *Rana* fortemente ingranditi (sono appena accennati i lunghi filamenti caudali, per necessità di spazio); 1. *Rana esculenta*; 2. *R. graeca*; 3. *R. latastei*; 4. *R. arvalis*; 5. *R. temporaria*; 6. *R. dalmatina* (circa $1650 \times$).

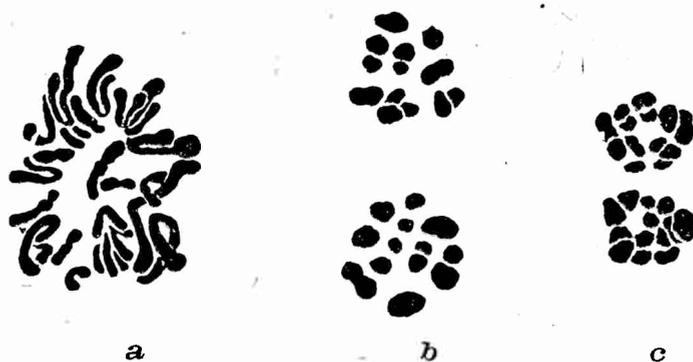


Fig. 2. — Spermatogenesi di *Rana graeca*: a) piastra equatoriale di protozoozite ($2N=26$); b) idem di spermatociti I ($N=13$); c) idem di spermatociti II ($N=13$). (circa $1750 \times$).

cit.). Sopra 9 specie esaminate (*Rana catesbiana*, *R. esculenta*, *R. limnocharis*, *R. nigromaculata*, *R. palustris*, *R. pipiens*, *R. rugosa*, *R. tigrina*, *R. temporaria*) gli Autori moderni sono infatti concordi sulle formule $N=13$ e $2N=26$, fatta eccezione della *Rana catesbiana* ma-

schio, per i cui testicoli larvali lo SWINGLE (1921) riporta i valori $2N=28$ e $N=14$ (1).

Il nostro conteggio è nuovo per la *Rana graeca* (endemica nell'Italia centro-meridionale e nei Balcani), nè mi fu altresì possibile aver no-

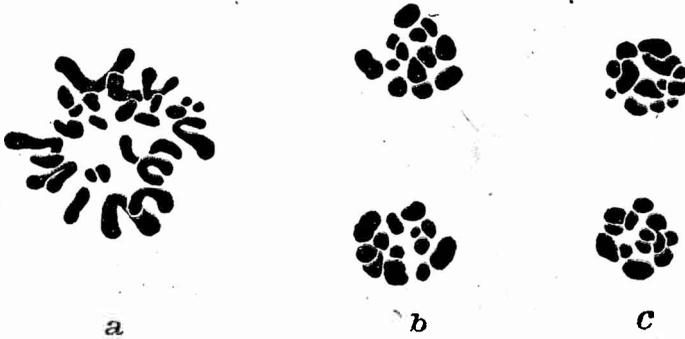


Fig. 3. — Spermatogenesi di *Rana dalmatina*: a) piastra equatoriale di protogonio ($2N=26$); b) idem di spermatociti I ($N=13$); c) idem di spermatociti II ($N=13$). (circa $1750 \times$).

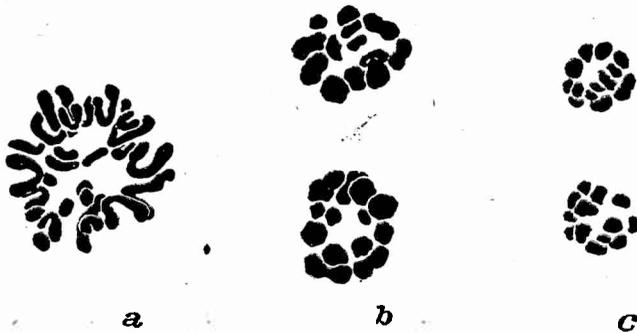


Fig. 4. — Spermatogenesi di *Rana arvalis*: a) piastra equatoriale di protogonio ($2N=26$); b) idem di spermatociti I ($N=13$); c) idem di spermatociti II ($N=13$). (circa $1750 \times$).

tie di precedenti conteggi per la *Rana dalmatina*, oggetto di frequenti ricerche sperimentali. Per la *Rana arvalis*, in un lavoro sugli ibridi interspecifici (*Rana arvalis* ♀ X *Rana temporaria* ♂), viene ammessa dal DÜRKEN (1938) la formula diploide $2N=22$ nelle cellule germinali maschili e la formula $2N=24$ nelle piastre spermatogoniali

(1) The germ cells of anurans. I. The male sexual cycle of *Rana cataphiana* larvae. *J. Exp. Zool.*, 32, 1921.

degli ibridi F_1 (1). Anche nella *Rana arvalis* tuttavia il numero diploide è per noi $2N=26$ e non $2N=22$ e l'aploide, controllo molto più sicuro, $N=13$. Oltre che dalla fig. 4 è utile rendersene conto dal

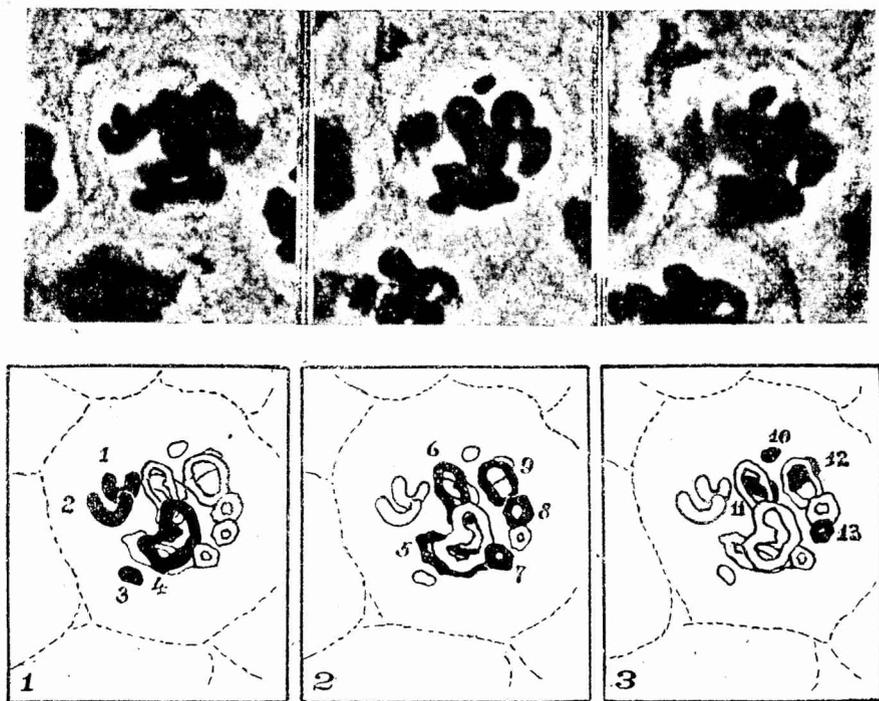


Fig. 5. — Conteggio microfotografico dei cromosomi in uno spermatocita I (diacinesi) di *Rana arvalis*.

Le tredici tetradi ($N=13$) di questa diacinesi compaiono a fuoco in tre gruppi, in tre piani successivi, secondo gli schemi delle figure diagrammatiche, in basso, che l'accompagnano. La stessa diacinesi è riprodotta, a maggiore ingrandimento, nella fig. 6-B. (circa $1800\times$).

conteggio microfotografico della fig. 5, rappresentante le tredici tetradi di una diacinesi di spermatocita I, poste ognuna individualmente a fuoco, in tre gruppi successivi, secondo tre diversi piani di profondità.

Tanto in *Rana graeca* che in *R. arvalis* e in *Rana dalmatina* appaiono evidenti nelle varie fasi della divisione riduzionale degli spermatociti I quelle particolari modalità di variazione dei chiasmi nelle

(1) DÜRKEN B., Ueber die Keimdrüsen und die Chromosomen der Artbastarde *Rana arvalis* ♀ X *Rana fusca* ♂, *Zeitsch. Ind. Abstammg.*, 74, 1938 (*R. fusca* = *R. temporaria*).

tetradi cromosomiche che indussero dapprima il WITSCHI in *Rana temporaria* e in seguito altri AA. in altre forme a formulare l'ipotesi dell'esistenza di un cromosoma del sesso negli Anfibi (1), ma che vennero invece interpretate dal GALGANO in *Rana esculenta* (1933) quali comuni tetradi possedenti un solo chiasma terminale invece di due, come

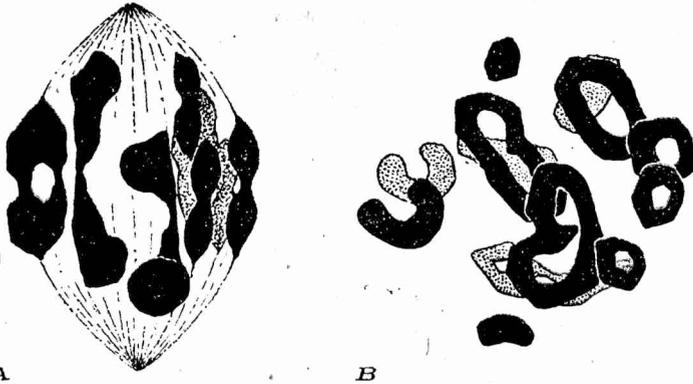


Fig. 6-A. — Giovane anafase di spermatocita I di *Rana graeca*: notare nel centro, dopo la grande tetrade ad anello (estrema sinistra), le tipiche variazioni dei chiasmi terminali in due tetradi distinte (nella tetrade più centrale una delle diadi, in basso, è rivolta verso l'osservatore) (4000 \times).

Fig. 6-B. — Diacinesi di spermatocita I di *Rana arvalis*: undici delle tredici tetradi sono di aspetto normale, le due tetradi a sinistra presentano invece la variazione terminale dei chiasmi (cromosomi pseudosessuali). (4000 \times).

di solito (2). Si tratta infatti di una precoce separazione (diacinesi) di una delle due estremità accoppiate delle diadi di ogni singola tetrade, separazione che conduce quindi le diadi stesse, una volta poste al fuso,

(1) Del tipo XY δ secondo il WITSCHI (Chromosomen und Geschlecht bei *Rana temporaria*, *Zeitsch. Ind. Abst. Vererb.*, 27, 1922; Die Entwicklung der Keimzellen der *Rana temporaria* L. I. *Urkeimzellen und Spermatogenese*, *Zeitsch. Zellf. Mikr. Anat.*, I, 1924); del tipo XX δ (*Rana nigromaculata*, *Rana rugosa*) secondo l'IRIPI (The chromosomes of Amphibia, *Zool. Mag. Jap.*, 41, 1928; On the chromosomes of *Rana rugosa* und *R. nigromaculata*, *Sc. Rep. Tokyo Bur. Dig.*, B, 1, 1932).

(2) GALGANO M., Studi intorno al comportamento della cromatina nella spermatogenesi di *Rana esculenta* L. I. Il numero e la forma dei cromosomi nel processo normale, *Arch. It. Anat. Embr.*, XXXI, 1, 1933; idem, Evoluzione degli spermatociti di I ordine e cromosomi pseudosessuali in alcune specie di Anfibi. *Arch. It. Anat. Embr.*, XXXVII, 1, 1933; idem, La variazione dei chiasmi nei maschi e negli intersessuati di *Rana esculenta* L., *Arch. It. Anat. Embr.*, XLVI, 2, 1941.

a divergere e ad allontanarsi secondo particolari modalità di stiramento, fino a simulare nel corso della meta- ed anafase la presenza di un cromosoma particolare, che sarebbe stato appunto descritto quale cromosoma del sesso. Tale variazione dei chiasmi non si limita inoltre ad interessare una sola tetrade per ciascuna cellula germinale, ma in parecchi casi può riscontrarsi in due, in tre e perfino in quattro tetradi: constatazione di per se stessa in evidente contrasto con l'ipotesi del cromosoma sessuale. Come in *Rana esculenta* anche in *Rana graeca* compare un sol chiasma in una sola tetrade in circa il 41% dei casi (250 conteggi su spermatoцити I in metafase o in giovane anafase); un solo chiasma in due tetradi fu visto invece nel 9% dei casi (nello stesso conteggio); un sol chiasma in tre tetradi nell'1,67% e in quattro tetradi nel 0,33% dei casi.

Nella stessa *Rana dalmatina* e *Rana arvalis* fu possibile riscontrare — quantunque meno frequente, come del resto in *Rana temporaria* — la presenza di tetradi (una, due e fino tre) con un sol chiasma terminale.

I conteggi eseguiti sopra un centinaio di elementi per ciascuna di tali specie (metafasi e giovani anafasi di spermatoцита I) darebbero per la prima il 40% di variazioni in una sola tetrade e il 2% in due, mentre nella seconda le medesime variazioni discenderebbero rispettivamente al 26% e al 5%. Nelle tre specie esaminate (*R. graeca*, *R. dalmatina* e *R. arvalis*) i casi in cui nessuna delle tetradi sembra presentarsi con variazioni dei chiasmi terminali salirebbero al 48%, al 58% e al 69%: da rilevare che in *Rana esculenta*, sopra un totale di 450 osservazioni (diacinesi, metafase e anafase) furono segnalati dal GALGANO il 49% dei casi senza alcuna variazione dei chiasmi, il 42,1% con un sol chiasma in una sola tetrade, il 6,3% con un sol chiasma in due tetradi, il 2,(2)% con un sol chiasma in tre tetradi e lo 0,(2)% in quattro.

Dell'aspetto generale dei cromosomi pseudosessuali in *Rana graeca* e in *Rana arvalis* rende finalmente conto la fig. 6 (A e B), rappresentante in entrambe l'esistenza di due tetradi con la variazione terminale dei chiasmi tanto nella diacinesi (*Rana arvalis*) che in uno stadio giovanissimo della anafase (*Rana graeca*).

CONCLUSIONI.

1) Tra le varie specie di Rane rosse esaminate le cellule germinali maschili sono comparativamente più grandi in *Rana graeca*: poco diverse tra di loro nelle altre forme. Gli spermii di *R. graeca*, di *R. la-*

tastei e di *R. arvalis* sono prossimi per dimensioni e per aspetto della testa agli spermatozoi di *R. esculenta* e si rassomigliano tra di loro; gli spermatozoi di *R. dalmatina* e di *R. temporaria* costituiscono invece un tipo morfologico completamente diverso.

2) Nelle tre specie il numero dei cromosomi è $2N=26$ per la formula diploide e $N=13$ per la formula aploide.

3) In tutte e tre le specie si riconoscono nelle diacinesi, nelle metafasi e nelle anafasi della divisione riduzionale i caratteristici cromosomi pseudosessuali, non omologabili ai veri cromosomi del sesso. Tali cromosomi, da interpretare quali normali variazioni dei chiasmi terminali delle diadi nelle tetradi ad anello, compaiono in numero di uno, di due, di tre e persino di quattro in uno stesso elemento cellulare, significando dunque che la variazione del chiasma vi ha rispettivamente interessato una, due e fino tre e quattro tetradi. La frequenza di tali variazioni dei chiasmi assume in *Rana graeca* proporzioni perfettamente analoghe a quelle segnalate in *R. esculenta*; tali proporzioni sarebbero minori in *R. arvalis* e in *R. dalmatina*, a somiglianza di *R. temporaria*.