
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

MARIO COLUZZI

Osservazioni comparative sul cromosoma X nelle specie A e B del complesso *Anopheles gambiae*

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 40 (1966), n.4, p. 671–678.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1966_8_40_4_671_0>

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

Citologia. — *Osservazioni comparative sul cromosoma X nelle specie A e B del complesso Anopheles gambiae*^(*). Nota di MARIO COLUZZI, presentata ^(**) dal Socio G. MONTALENTI.

SUMMARY. — A comparative study of the X chromosome has been carried out on the cryptic species A and B of the *Anopheles gambiae* complex. The examination of the X chromosome in mitotic, meiotic and salivary gland preparations has revealed remarkable differences in the length of the euchromatic part and in the banding pattern. The map of the two salivary X chromosomes shows many non-homologous regions having an obvious diagnostic value. An almost complete asynapsis has been observed in the X chromosome of the female hybrids.

Il complesso *Anopheles gambiae* Giles comprende attualmente cinque specie criptiche il cui studio oltre ad essere di notevole interesse biologico è di grande importanza in entomologia medica. L'esistenza di barriere di sterilità tra i membri del complesso ha costituito uno dei criteri determinanti di separazione a partire dall'importante lavoro di Davidson e Jackson [1]. Di regola la sterilità risulta limitata agli ibridi maschi nei quali si osservano gradi diversi di atrofia dei testicoli, mentre le femmine sono da considerare apparentemente normali [2]. Uno scambio genico attraverso le femmine ibride è possibile in laboratorio ma i casi di simpatrismo studiati in natura fanno ritenere che l'isolamento riproduttivo sia completo [3].

Vengono distinte nel complesso tre specie di acqua dolce note provvisoriamente come *A. gambiae A*, *A. gambiae B* e *A. gambiae C* e due di acqua salata indicate con i nomi *A. melas* Theobald e *A. merus* Dönitz. Queste due specie sono tra loro allopatriche occupando rispettivamente la costa occidentale ed orientale dell'Africa e sono le sole che risultino differenziabili morfologicamente con sufficiente attendibilità [4]. *A. gambiae C*, segnalato in Africa sud-orientale, mostrerebbe un comportamento zoofilo ed esofilo ed una scarsa capacità vettrice nella trasmissione della malaria [5].

A. gambiae A e *A. gambiae B* hanno la maggiore importanza medica ed una larga diffusione nella regione etiopica dove sono stati trovati in diverse località in stretta associazione. Le divergenze ecotipiche tra queste due specie restano in larga parte imprecisate. In base ai pochi dati biogeografici disponibili, *A. gambiae A* dovrebbe prevalere in quelle zone umide le cui caratteristiche climatiche permettono alla zanzara uno sviluppo subcontinuo, mentre *A. gambiae B* è da supporre meglio adattato all'occupazione

(*) Lavoro svolto presso l'Istituto di Malariologia « Ettore Marchiafava », Stazione Sperimentale di Monticelli (Frosinone) con contributi del Ministero della Sanità e dell'Organizzazione Mondiale della Sanità.

(**) Nella seduta del 16 aprile 1966.

di aree di savana, predesertiche o montagnose, dove lo sviluppo della specie è soggetto a pause stagionali più o meno lunghe.

Lo studio citogenetico delle specie *A* e *B* e dei loro ibridi ha un evidente interesse scientifico e pratico ma i progressi in questo campo sono stati relativamente lenti in parte per le difficoltà incontrate nell'ottenere buoni preparati di cromosomi politenici salivari. Una mappa di *A. gambiae* è stata pubblicata fin dal 1956 da Frizzi e Holstein [6] in base all'esame di un ceppo proveniente da Lagos (Nigeria) ed oggi riferibile alla specie *A*. Un confronto tra *A. gambiae A* e *A. gambiae B* è stato eseguito da Mason [7] il quale ha utilizzato i ceppi Lagos e Kano (Nigeria) descrivendo negli ibridi alcune asinapsi tra gli omologhi e una traslocazione tra IIS e IIID la cui esatta posizione non risulta localizzata. Secondo Mason tuttavia le aberrazioni interesserebbero gli autosomi mentre il cromosoma X si dimostrerebbe in sinapsi normale per tutta la sua lunghezza.

I dati oggetto della presente Nota indicano invece differenze evidenti nel cromosoma X di alcune popolazioni di laboratorio di *A. gambiae A* e *A. gambiae B* e l'asinapsi quasi completa dello stesso cromosoma negli ibridi femmine.

MATERIALE E METODO.

Le osservazioni sono state condotte su colonie di laboratorio mantenute negli insettari della Stazione Sperimentale di Monticelli e gentilmente fornite dal dott. G. Davidson del Ross Institute, Londra. Sono stati impiegati cinque ceppi di *A. gambiae A* aventi le seguenti origini geografiche: Diggi (Nigeria), Lagos (Nigeria), Man (Costa d'Avorio), Nkolmekok (Cameroun) e Muheza (Tanzania). Le colonie di *A. gambiae B* esaminate sono quattro e provengono dalle seguenti zone: Makhzan (Aden), Mogadiscio (Somalia), Pare (Tanzania) e Kano (Nigeria). I ceppi Lagos e Kano dovrebbero essere gli stessi usati da Mason [7].

Osservazioni citogenetiche dettagliate basate sull'esame dei cromosomi salivari mitotici e meiotici, sono state eseguite su *A. gambiae A* Man, Nkolmekok e Muheza, su *A. gambiae B* Makhzan e Mogadiscio e sugli ibridi ♂ Makhzan × ♀ Man, ♂ Man × ♀ Makhzan, ♂ Diggi × ♀ Mogadiscio e ♂ Mogadiscio × ♀ Muheza. L'esame degli altri ceppi è stato limitato alla lettura di alcuni preparati (in qualche caso vecchi preparati) al fine di confermare la morfologia del cromosoma X.

Gli allevamenti sono stati eseguiti secondo un metodo già descritto [8]. Diversi accorgimenti sono stati usati per favorire la preparazione dei cromosomi salivari e tra quelli apparsi utili segnaliamo: temperature dell'ambiente larvale piuttosto basse (22-24°C), basse densità larvali (200-300 larve in circa 3 litri di acqua) e un accurato dosaggio delle sostanze nutritive.

Gli incroci sono stati eseguiti con relativa facilità in gabbie di cm. 25 × 25 e solo in un caso (♂ Man × ♀ Makhzan) è stata usata per controllo la tecnica della copulazione indotta.

Le preparazioni di cromosomi salivari sono state ottenute da larve all'inizio del IV stadio con il metodo riportato da Nicoletti [9] e adottando le modifiche proposte da French, Baker e Kitzmiller [10]. Anche per i cromosomi mitotici e meiotici è stato usato il metodo descritto da French e coll. [10]. I preparati di cervello e delle gonadi delle pupe sono stati ottenuti senza particolari pretrattamenti se si eccettua una serie di allevamenti a bassa temperatura (15–18°C) che si sono dimostrati di qualche utilità per una migliore differenziazione delle zone eucromatiche ed eterocromatiche dei cromosomi sessuali.

RISULTATI DELLE OSSERVAZIONI CITOGENETICHE.

Sono stati studiati in dettaglio circa 260 preparati di *A. gambiae* A, *A. gambiae* B e dei loro ibridi. I risultati completi di queste osservazioni verranno pubblicati per esteso in altra rivista mentre vengono riportati in questa Nota i dati relativi al confronto tra il cromosoma X delle due specie. La difficoltà di ottenere buoni preparati di cromosomi salivari, notata sia da Frizzi e Holstein [6] che da Mason [7], è stata riscontrata anche nel corso di questo lavoro e i vetrini scartati nella fase preliminare assommano complessivamente a più di 500. Tuttavia ambedue le specie (particolarmente *A. gambiae* B) posseggono cromosomi politenici con bande nitide molto più adatti a studi citogenetici di quelli di altre specie di *Anopheles*. Le dimensioni dei cromosomi salivari sono piuttosto variabili e le misure menzionate nel testo vanno riferite alle cellule più grandi.

Il cromosoma X in A. gambiae A. – Il corredo cromosomico della specie A nella femmina comprende due paia di autosomi metacentrici ed un paio di eterocromosomi subtelocentrici. Nelle metafasi mitotiche il cromosoma X supera di poco in lunghezza il braccio più lungo degli autosomi (II D) raggiungendo 2,8 micron. Nelle profasi avanzate è possibile distinguere due regioni subeguali delle quali la prossimale, eteropicnotica, dovrebbe essere eterocromatica. Un'altra breve porzione di eterocromatina potrebbe essere presente all'estremità del cromosoma. Il braccio corto (X 2) è ridotto a meno di un sesto della lunghezza dell'altro e sembra costituito da eucromatina e da eterocromatina.

Questa distribuzione dell'eterocromatina appare in accordo con quanto si osserva nei cromosomi politenici salivari dove il cromosoma X ha un braccio (X 1) lungo poco meno della metà del II D ed un secondo (X 2) circa 6 volte più corto; quest'ultimo è generalmente ricurvo su se stesso a formare un piccolo semicerchio in contatto con la regione cromocentrica. La lunghezza di X 1 è di 100–110 micron quando i cromosomi sono ben sviluppati ma nelle nostre condizioni sperimentali sono state osservate più spesso dimensioni inferiori.

Il cromosoma Y mitotico e meiotico è più breve dell'X (per quanto la differenza non sia sempre evidente nelle metafasi) ed è completamente etero-

cromatico eccetto per un breve tratto omologo a X 2. Nei cromosomi salivari dei maschi il braccio corto dell'X (X 2) risulta infatti in sinapsi con il tratto omologo mentre X 1 è emizigote.

Una mappa del cromosoma X di *A. gambiae* A viene proposta nella figura 1 e comprende 6 regioni delle quali le prime 5 rappresentano X 1 e la sesta X 2. Questo è lo stesso schema di divisione adottato da Frizzi e Holstein (1956) ma ci è stato impossibile fissare una precisa corrispondenza con la loro mappa che, secondo quanto notano gli stessi Autori, rappresenta solamente le sequenze di bande principali dei cromosomi. Le divisioni e suddivisioni sono state fatte cercando di seguire le modalità usate per altre mappe di *Anopheles* e sono sostanzialmente soggettive.

Nei salivari della femmina il cromosoma X si presenta generalmente in sinapsi completa. Parziali asinapsi tra gli omologhi sono state osservate con frequenze significative solo nei settori 5 B, C, D e 6 C, D (Tav. I, fig. 5). Quest'ultimo settore, rigonfiato e formato da un'alternanza di bande ben marcate e poco definite, ha tendenza a scomparire in alcuni preparati ed al pari della zona 5 D è spesso confuso. Le parti restanti del cromosoma sono sufficientemente chiare quantunque meno degli autosomi. È caratteristica la presenza di un *puff* molto variabile nel settore 4 A e di un altro rigonfiamento più stabile nella zona 3 B. Ambedue le dilatazioni sono seguite da zone di larghezza minima nei settori 4 B e 3 C facili da localizzare per la presenza di piccole bande ben definite e costanti (Tav. I, figg. 1, 2 e 5). Utile dal punto di vista diagnostico è anche la sequenza nella regione 1 comprendente la banda molto spessa in 1 D, quella più sottile e larga al centro del rigonfiamento in 1 C e le tre-quattro bande accollate, strette e marcate in 1 B.

Il cromosoma X in A. gambiae B. - In *A. gambiae* B il corredo cromosomico è costituito da due paia di cromosomi a V e da una coppia di eterocromosomi simili a quelli descritti nella specie A. Un attento esame del cromosoma X (particolarmente nelle profasi avanzate) sembra indicare in X 1 una minore estensione del tratto eucromatico.

I cromosomi salivari di *A. gambiae* B sono quasi sempre ben sviluppati e il braccio lungo di X supera generalmente 90 micron. In base all'esame di diversi preparati si può ritenere che a parità di sviluppo X 1 sia di circa 10-15 micron più corto che in A.

La mappa proposta nella figura 1 permette di osservare facilmente le notevoli differenze strutturali del cromosoma sessuale nelle due specie. I settori d'interesse diagnostico sono anche in *A. gambiae* B numerosi ed i più utili nella regione 1. In 1 C si nota un *puff* in avanzato stato di sviluppo generalmente con aspetto ad «anello di Balbiani». In 1 B sono comprese due bande ben marcate abbastanza spesse e larghe; tra queste se ne osserva una sottile e poco definita. Caratteristica anche la sequenza in 1 D costituita da una banda chiara seguita da una ben marcata e da una terza colorata intensamente ma non quanto la precedente. Il braccio X 2 sembra omologo a quello di *A. gambiae* A ma la asinapsi parziale del settore 6 C D è stata

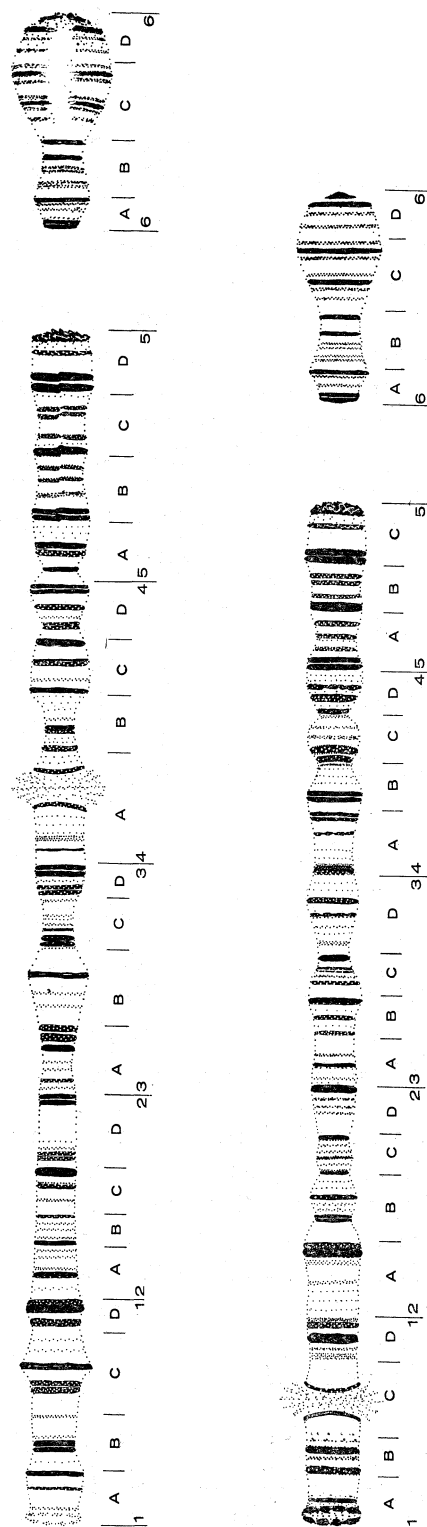


Fig. 1. — Mappa del cromosoma X salivare di *A. gambiae* A (sopra) e *A. gambiae* B (sotto).

osservata molto più raramente. La stessa cosa si può ripetere per la regione 5. (Tav. I, figg. 3, 4 e 6).

Il cromosoma X negli ibridi. – Come era prevedibile le differenze esistenti tra i cromosomi X delle due specie determinano nelle femmine ibride una asinapsi più o meno completa. Le poche zone omologhe residue hanno localizzazioni generalmente non corrispondenti e sono separate da lunghi tratti con sequenze di bande non omologhe. I diversi tipi di sinapsi danno origine ad un comportamento estremamente variabile dei due cromosomi che possono apparire anche completamente separati tra loro. (Tav. 2, fig. 5). Di regola però essi entrano in contatto in una o più zone.

Frequentemente l'appaiamento si stabilisce tra 1 D–2 B della specie *A* e 2 AB della specie *B*; la sinapsi è soprattutto chiara al livello della grossa banda presente rispettivamente in 1 D e 2 A (Tav. II, figg. 6 e 7). Spesso l'attrazione si osserva anche tra i settori 4 CD di *A* e 4 AB di *B*. L'omologia delle regioni 5 e 6 sembra evidente ma la sinapsi è sempre incompleta o mancante. Altri rapporti si possono supporre tra i *puffs* delle regioni 5 e 1 (fig. 1).

Le due estremità mostrano un disegno simile ben marcato in *A. gambiae B* e non sempre visibile in *A. gambiae A*. In due cellule infine è stata osservata una sinapsi tra i settori 2 B di *A* e 2 D di *B* ottenuta attraverso l'appaiamento dei due cromosomi con disposizione invertita (Tav. II, fig. 4).

Anche l'esame delle profasi mitotiche mostra in maniera evidente le differenze esistenti tra i cromosomi X delle due specie e la mancanza di attrazione tra essi (Tav. II, figg. 2 e 3).

CONCLUSIONI.

Le osservazioni descritte dimostrano evidenti differenze tra i cromosomi X delle specie criptiche *A* e *B* del complesso *A. gambiae*. Negli ibridi femmine il cromosoma è caratterizzato da asinapsi quasi completa dovuta al numero rilevante di riordinamenti strutturali accumulatisi durante il processo di speciazione.

Questi dati hanno un considerevole interesse pratico in quanto le differenze tra i cromosomi X risultano altamente diagnostiche e facilmente osservabili. Si rende così disponibile un criterio di separazione applicabile a ricerche di ecologia che dovrebbe aprire la via allo studio sul campo delle differenze biologiche esistenti tra *A. gambiae A* e *A. gambiae B*. Fino ad ora, il solo mezzo per ottenere una identificazione sufficientemente attendibile delle due specie, è stato quello di procedere ad incroci con ceppi noti e questo metodo, già di per sé laborioso, è complicato dalle difficoltà che spesso si incontrano nell'allevamento.

Queste nostre osservazioni risultano in disaccordo con quanto pubblicato da Mason [7] ma resta la possibilità che lo studio citogenetico sia stato fatto su materiale diverso.

Ringraziamento. — L'autore desidera ringraziare il prof. G. Raffaele, Direttore dell'Istituto di Malariologia « Ettore Marchiafava », Roma e il dott. L. J. Bruce-Chwatt, O.M.S., Ginevra per aver concesso l'appoggio delle rispettive organizzazioni; il dott. A. Coluzzi e il personale della Stazione Sperimentale di Monticelli per l'indispensabile e continua collaborazione; il dott. G. Davidson, Ross Institute, Londra per aver fornito il materiale necessario a questo studio.

L'autore rivolge poi un particolare ringraziamento al prof. G. Montalenti, Direttore dell'Istituto di Genetica della Facoltà di Scienze, Università di Roma e al prof. B. Nicoletti dello stesso Istituto che hanno seguito e discusso questo lavoro.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] G. DAVIDSON e E. JACKSON, *Incipient speciation in Anopheles gambiae* Giles, « Bull. Wld. Hlth. Org. », 27, 203 (1962).
- [2] G. DAVIDSON, *The five mating types in the Anopheles gambiae complex*, « Riv. Malariol. », 43, 167-183 (1964).
- [3] H. E. PATERSON, *Direct evidence for the specific distinctness of forms A, B and C of the Anopheles gambiae complex*, « Riv. Malariol. », 43, 191-196 (1964).
- [4] M. COLUZZI, *Morphological divergences in the Anopheles gambiae complex*, « Riv. Malariol. », 43, 197-232 (1964).
- [5] H. E. PATERSON, G. S. PATERSON e G. S. VAN EEDEN, *A new member of the Anopheles gambiae complex*, « Medical Proceedings », 9, 414 (1963).
- [6] G. FRIZZI e M. HOLSTEIN, *Étude cytogenétique d'Anopheles gambiae*, « Bull. Wld. Hlth. Org. », 15, 425-435 (1956).
- [7] G. F. MASON, *The causes of males sterility in Anopheles gambiae A-B group crosses*, « Riv. malariol. », 43, 185-190 (1964).
- [8] M. COLUZZI, *Maintenance of laboratory colonies of Anopheles mosquitos*, « Bull. Wld. Hlth. Org. », 31, 441-443 (1964).
- [9] B. NICOLETTI, *An efficient method for salivary gland chromosome preparations*, « D.I.S. », 33, 181 (1960).
- [10] W. L. FRENCH, R. H. BAKER e J. B. KITZMILLER, *Preparation of mosquito chromosomes*, « Mosquito News », 22, 377-383 (1962).

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I E II

TAVOLA I.

Figg. 1-5. - Il cromosoma X salivare in *A. gambiae* A (1, 2 e 5) e *A. gambiae* B (3, 4 e 6). La fotografia n. 4 rappresenta il cromosoma X di un maschio mentre le altre preparazioni sono di femmine.

TAVOLA II.

Il cromosoma X nelle femmine ibride *A. gambiae* A $\times$ *A. gambiae* B.

Fig. 1. - Corredo cromosomico salivare completo in un ibrido. La sola zona rilevante di asinapsi è nel cromosoma X.

Figg. 2 e 3. - Profasi mitótiche ovariche che mostrano la diversa estensione della regione eucromatica sul cromosoma X.

Fig. 4. - Appaiamento con disposizione invertita dei cromosomi salivari.

Fig. 5. - Asinapsi completa dei cromosomi salivari.

Figg. 6 e 7. - Sinapsi parziale secondo i casi più frequenti nei cromosomi salivari.

