

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI  
**RENDICONTI**

---

VALERIO SCALI

**Osservazioni citologiche sullo sviluppo embrionale di  
Bacillus rossius (Insecta Phasmoidea)**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 46 (1969), n.4, p. 486–492.*  
Accademia Nazionale dei Lincei

<[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1969\\_8\\_46\\_4\\_486\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1969_8_46_4_486_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/>

**Zoologia** — *Osservazioni citologiche sullo sviluppo embrionale di Bacillus rossius (Insecta Phasmoidea)* (\*). Nota di VALERIO SCALI, presentata (\*\*) dal Corrisp. M. BENAZZI.

SUMMARY. — The stick insect *Bacillus rossius* (Rossi) reproduces by either amphigony or facultative telitokous parthenogenesis. Some females however, even if mated with males, produce only feminine offspring, so behaving as obligatory parthenogenetic. Cytological investigations on early embryonic stages of progeny of such females show that development begins with cells containing the haploid or near-haploid number of chromosomes. Later on, the chromosome complement is doubled through an anaphasic restitution mechanism and afterwards only diploid or near-diploid cells survive a massive degeneration process which takes place on about the 15th day of development.

Fertilized eggs of amphigonic females follow a normal developmental pattern, though blastoderm cells are mainly aneuploid.

Aneuploidy poses a problem in regard to the chromosome number in both somatic and germinal cells during further development.

#### INTRODUZIONE.

Recenti indagini sul fasmide *Bacillus rossius* (Rossi) hanno portato nuovi contributi alla conoscenza della biologia di questo insetto, che si riproduce con modalità diverse in differenti zone del suo areale. Infatti, mentre nella Francia meridionale la quasi totalità delle popolazioni è partenogenetica (Cappe de Baillon, Favrelle e Vichet 1937, 1938; Cappe de Baillon e Vichet 1939; Vichet 1944; Chopard 1951), nell'Italia centro-meridionale si trovano popolazioni anfigoniche (Montalenti e Fratini 1959; Bullini, comunicazione personale) analogamente a quelle del resto del suo areale.

Benazzi e Scali (1964) hanno messo in evidenza che nei dintorni di Pisa esistono ambedue le modalità riproduttive (anfigonia e partenogenesi) e Bullini (1968) in base ad estese raccolte ha dimostrato che in località spesso molto vicine della Toscana e Liguria possono esistere popolazioni anfigoniche e partenogenetiche ben distinte.

Occorre tener presente che in *B. rossius* anche le femmine delle popolazioni anfigoniche, se isolate dai maschi, depongono uova che in alta percentuale si sviluppano dando una discendenza femminile perfettamente normale; d'altro canto le femmine di popolazioni partenogenetiche se accoppiate con maschi di popolazioni anfigoniche possono venir fecondate e dare discendenza

(\*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Zoologia e Anatomia comparata dell'Università di Pisa col contributo del C.N.R.

(\*\*) Nella seduta del 19 aprile 1969.

bisessuata, come per primi constatarono Favrelle e Vichet (1937): si tratta quindi di una partenogenesi facoltativa telitoca.

Ma non tutte le femmine hanno tale comportamento facoltativo. Infatti nelle raccolte del 1962-63 che servirono per il primo esame delle modalità riproduttive nelle popolazioni di Pisa (Benazzi e Scali, 1964) ve ne erano alcune che, seppur accoppiate, davano una discendenza esclusivamente (o quasi) femminile, manifestando quindi partenogenesi obbligatoria. Ricerche successive (Scali, 1968) hanno confermato questo comportamento e messo in evidenza che esso si può mantenere per più generazioni. Pure il Bullini (1968) ha constatato che gli accoppiamenti tra femmine di popolazioni partenogenetiche e maschi di popolazioni bisessuate danno una discendenza con grande riduzione di maschi pur con variazioni notevoli da femmina a femmina. Ciò conferma il reperto delle coppie con discendenza esclusivamente (o quasi) femminile e lascia supporre un inizio di isolamento riproduttivo.

Pijnacker (1968) ha indagato citologicamente i primi stadi embrionali in uova partenogenetiche di esemplari dei dintorni di Pisa (fornitigli dal prof. Benazzi), rilevando che lo sviluppo incomincia con cellule aploidi e che solo dopo 15 giorni, quando sono presenti circa duecento cellule, inizia la diploidizzazione attraverso la comparsa di C-mitosi; ciò è in accordo con quanto osservato da Bergerard (1958) in *Clitumnus extradentatus*.

Mi è sembrato quindi opportuno studiare citologicamente lo sviluppo degli esemplari a partenogenesi « obbligatoria » potendo disporre di un ceppo (indicato come 671) ormai giunto alla quarta generazione. I reperti ottenuti sono stati confrontati con quelli riguardanti il ceppo anfigonico.

#### TECNICA.

Le uova vengono disopercolate, fissate in alcool-acido acetico 3 : 1 per 2-3 ore e quindi sgusciate completamente. La colorazione è compiuta con l'orceina acetica oppure con la reazione di Feulgen. Per la prima viene subito tagliata con un rasoio una calotta corrispondente all'area micropilare dell'uovo; tale frammento è poi colorato e, dopo una breve differenziazione in acido acetico al 45 %, schiacciato fra copri- e porta-oggetto. Per la reazione di Feulgen l'uovo è sottoposto intero all'idrolisi in HCl 1 N, per 8-10 minuti, a 58°C ed all'azione del liquido di Schiff per 2 ore; solo al momento dello schiacciamento la calotta micropilare viene tagliata nella maniera già ricordata.

#### ESPOSIZIONE DEI REPERTI.

Sono state studiate citologicamente 72 uova (36 per il ceppo 671 e 36 per il ceppo anfigonico) a vari tempi dalla deposizione.

La Tabella I illustra la modalità di sviluppo riscontrata nei due ceppi.

TABELLA I.

*Modalità di sviluppo mostrata da uova dei ceppi 67I ed anfigonico.*

	CEPPO 67I	CEPPO ANFIGONICO	
Giorni dalla deposizione . . . . .	3-18	6-18	75
Uova con sviluppo aploide . . . . .	33	4	
Uova con sviluppo diploide . . . . .	1	26	3 (*)
Uova senza sviluppo . . . . .	2	3	
Totale . . .	36	33	3

(\*) Per queste uova non è più possibile un accertamento diretto della modalità di sviluppo, ma è stata accettata la modalità più probabile.

#### A. - Sviluppo delle uova del ceppo 67I.

1) Lo sviluppo inizia con sole cellule aploidi o quasi-aploidi che si dividono con grande rapidità, come dimostra l'alto numero di cellule e di figure mitotiche osservabili in embrioni di soli 7 giorni.

I cromosomi sono molto contratti e mostrano tendenza alla «stickiness»; in ogni embrione il loro numero varia ed è più frequentemente inferiore a quello aploide (= 18). La Tabella II dà il risultato di un'indagine sulla variabilità numerica dei cromosomi in 77 cellule metafasiche prese a caso da diversi embrioni; la Tav. I, figg. 1-4 illustra alcune di queste cellule: ben riconoscibile è il grande metacentrico caratteristico della specie.

TABELLA II.

*Numeri cromosomici riscontrati in 77 cellule metafasiche di embrioni «aploidi» del ceppo 67I.*

Cromosomi per cellula. . . . .	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Numero delle cellule . . . . .	3	7	13	15	17	12	6	1	2	1

Numerose sono a questo stadio le anomalie cromosomiche come eliminazioni, asincronie di divisione, ineguale ripartizione ai poli ed agglutinazioni estese precludenti spesso alla degenerazione della cellula (Tav. II, figg. 5-7).

2) Dal 7° giorno compaiono le prime cellule a numero cromosomico raddoppiato in cui sono ben visibili i due grandi metacentrici (Tav. II, fig. 8 e Tav. V, fig. 19); in correlazione con la variabilità riscontrata nelle cellule

« aploidi » anche nelle « diploidi » il numero cromosomico è assai variabile [23-39]. A questo stadio sono frequenti cellule in cui alla telofase non si ha citodieresi (Tav. II, figg. 9 e 10) e, di conseguenza, cellule binucleate (Tav. II, fig. 11 e Tav. III, figg. 12-13). Sono presenti anche cellule in endomitosi che danno probabilmente origine a grosse cellule poliploidi (vitellofagi).

3) Nei giorni successivi le cellule « diploidi » divengono sempre più numerose; aumentano anche le degenerazioni, sia di cellule « aploidi » che « diploidi », fino a causare la degenerazione di gran parte del blastoderma costituito ormai da un migliaio di cellule circa. Embrioni di ovature diverse possono mostrare una diversa celerità nel completare questo processo, ma in media impiegano 15-18 giorni.

4) Dopo questa fase rimangono nell'area micropilare poche cellule « diploidi » (circa 50) a nucleo intercinetico, con numerose piccole zolle eterocromatiche. Nelle uova con diapausa (Scali, 1968) a questo stadio cessano le divisioni cellulari e lo sviluppo embrionale si arresta.

5) Un solo embrione su 36 si è sviluppato fin dall'inizio col numero « circa diploide » di cromosomi. Si potrebbe pensare ad un uovo normalmente fecondato, ma la taglia insolitamente grande delle cellule rispetto a quelle diploidi e la formazione di cellule binucleate (Tav. III, figg. 12 e 13) sembra suggerire piuttosto che si tratti di un uovo diploide derivante da un ovocita I tetraploide.

#### B. - *Sviluppo delle uova del ceppo anfigonico.*

1) La grande maggioranza delle uova (26 su 33) presenta sviluppo anfigonico; il corredo diploide non si riscontra però in tutte le cellule essendo anche in queste assai frequente l'aneuploidia (cromosomi da 28 a 39). La velocità di divisione cellulare sembra inferiore a quella degli embrioni del ceppo 671 dato che dopo 7-8 giorni sono presenti solo 10-30 cellule nell'area micropilare. Le mitosi sono quindi poco numerose ed anche le degenerazioni cellulari sono poco frequenti.

2) Non ci sono restituzioni anafasiche in quanto la citodieresi sembra seguire regolarmente la telofase e mancano quindi le cellule binucleate. Sono peraltro visibili figure di endomitosi probabilmente in relazione all'origine dei vitellofagi.

3) In embrioni di 18 giorni il numero delle cellule nell'area micropilare è di 50 circa e si mantiene pressoché invariato negli embrioni che iniziano la diapausa.

4) Embrioni di 75 giorni possono aver già terminato la diapausa; ricompaiono allora le mitosi ed il numero delle cellule aumenta rapidamente. Anche a questo stadio sono presenti cellule aneuploidi (27-32 cromosomi; Tav. IV, figg. 16 e 17) e si riscontrano numerose degenerazioni cellulari.

5) Dalla Tabella I risulta che 4 uova su 33 si sono sviluppate all'inizio con un numero aploide di cromosomi; questi embrioni hanno presentato tutte le caratteristiche già segnalate per il ceppo 671 (Tav. V, figg. 18 e 19).

## DISCUSSIONE DEI RISULTATI.

I risultati ottenuti permettono alcune considerazioni:

1° sullo sviluppo aploide del ceppo 671; 2° sullo sviluppo aploide di alcune uova deposte da femmine fecondate; 3° sull'aneuploidia degli embrioni dei due ceppi.

1) Il fatto che la discendenza di femmine del ceppo 671 costantemente in coppia col maschio sia esclusivamente femminile si spiega in base all'iniziale sviluppo aploide ed al successivo raddoppio dei cromosomi che portano alla costituzione  $2A + XX$  propria della femmina. Resta però da chiarire se lo sviluppo aploide sia dovuto a mancata penetrazione dello spermio nell'uovo od a mancata anfimissi dei pronuclei. La prima ipotesi sembra, al momento, più probabile per il fatto che in questa specie l'uovo non fecondato si sviluppa partenogeneticamente con modalità simili a quelle del ceppo 671. D'altra parte i casi di ginogenesi segnalati negli insetti sono assai rari ed in relazione per lo più con la poliploidia (Narbel-Hofstetter 1955; Moore, Woodroffe e Sanderson 1956; Sanderson 1960).

Nel ceppo 671 il meccanismo che realizza il raddoppiamento del numero cromosomico sembra essere una restituzione anafasica piuttosto che una C-mitosi: ho notato infatti che alla divisione nucleare può non seguire quella citoplasmatica. Le numerose cellule binucleate intercinetiche che compaiono negli embrioni aploidi possono essere interpretate perciò come una conseguenza di tale fatto; alla mitosi successiva, con la scomparsa della membrana nucleare, i cromosomi si mettono al fuso insieme portando a termine il raddoppiamento.

2) Nella discendenza di femmine anfigoniche costantemente accoppiate si nota talvolta una certa prevalenza di femmine (Scali, 1968): ciò può essere spiegato col fatto che, nonostante il grande numero di spermii presenti nella spermateca, alcune uova hanno sviluppo aploide. Si può inoltre supporre che in certe femmine (come nel ceppo 671) tale anomalia sia divenuta la regola per tutte o quasi tutte le uova. Tali femmine che possiamo considerare a partenogenesi obbligatoria, compaiono raramente nelle popolazioni anfigoniche, più frequentemente in quelle partenogenetiche. La presenza tuttavia di un certo numero di maschi nella loro discendenza prova che alcune uova possono venir fecondate e che quindi tale situazione non è del tutto irreversibile.

3) L'origine della aneuploidia, sia negli embrioni a sviluppo aploide (anche dopo il raddoppiamento del numero cromosomico), sia in quelli a sviluppo diploide sembra riconducibile a divisioni asincrone e ad ineguale ripartizione dei cromosomi, oppure ad eliminazioni cromosomiche.

È da segnalare che già Cappe de Baillon, Favrelle e Vichet (1934, 1935, 1937, 1938) avevano notato cellule aneuploidi in molte specie di fasmidi. Per *B. rossius* i suddetti autori nel 1937 non accennavano a variazioni nume-

riche mentre nel 1939 Cappe de Baillon e Vichet affermarono che la femmina può avere 34-36 cromosomi ed il maschio 32-36, con 16-18 elementi alla prima divisione meiotica. Tale variabilità non è stata confermata né da Montalenti e Fratini (1959) né da Pijnacker (1968); ora le mie ricerche dimostrano, almeno per i primi stadi embrionali, una estesa aneuploidia, suggerendo l'opportunità di altre indagini per stabilire se essa persista negli stadi ulteriori e soprattutto se interessi anche la linea germinale.

#### BIBLIOGRAFIA.

- [1] CAPPE DE BAILLON P., FAVRELLE M. e DE VICHET G., « Bull. Biol. Fr. Belg. », 71, 129 (1937).
- [2] CAPPE DE BAILLON P., FAVRELLE M. e DE VICHET G., « Bull. Biol. Fr. Belg. », 72, 1 (1938).
- [3] CAPPE DE BAILLON P. e DE VICHET G., « C. R. Acad. Sci. », 209, 525 (1939).
- [4] DE VICHET G., « Bull. Soc. Linn. Lyon », 13, 92 (1944).
- [5] CHOPARD L., ORTHOPTÉROIDES, Paris, Lechevalier 1951.
- [6] MONTALENTI G. e FRATINI L., Proceed. XVth Intern. Congr. of Zool., London, 749 (1959).
- [7] FAVRELLE M. e DE VICHET G., « C. R. Acad. Sci. », 204, 1899 (1937).
- [8] BENAZZI M. e SCALI V., « Acc. Naz. Lincei, Rend. Sc. fis. mat. e nat. », Ser. 8<sup>a</sup>, 36, 311 (1964).
- [9] BULLINI L., « La Ric. Sci. » (in corso di stampa, 1968).
- [10] SCALI V., « Atti Soc. Tosc. Sc. Nat., Mem. », Ser. B, 75, 108 (1968).
- [11] PIJNACKER L. P., « Genen an Phaenen », 12, 129 (1968).
- [12] BERGERARD J., « Bull. Biol. Fr. Belg. », 92, 87 (1958).
- [13] NARBEL-HOFSTETTER M., « Rev. Suisse Zool. », 2, 224 (1955).
- [14] MOORE B. P., WOODROFFE G. E. e SANDERSON A. R., « Nature », 117, 847 (1956).
- [15] SANDERSON A. R., « Proc. Roy. Soc. Edimburgh., Mem. », Sect. B, 67, 333 (1960).
- [16] CAPPE DE BAILLON P., FAVRELLE M. e DE VICHET G., « Bull. Biol. Fr. Belg. », 68, 109 (1934).
- [17] CAPPE DE BAILLON P., FAVRELLE M. e DE VICHET G., « Bull. Biol. Fr. Belg. », 69, 1 (1935).

#### SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-V

##### TAVOLA I.

- Fig. 1. - Ceppo 671. Cellula ipoaploide con 12 cromosomi. Il grande metacentrico in basso al centro ( $\times 1.300$ ).
- Fig. 2. - Ceppo 671. Cellula ipoaploide con 14 cromosomi. La freccia indica una « stickiness » fra due cromosomi ( $\times 1.300$ ).
- Fig. 3. - Ceppo 671. Cellula ipoaploide con 17 cromosomi ( $\times 1.300$ ).
- Fig. 4. - Ceppo 671. Lucido di cellula euaploide (18 cromosomi) ( $\times 2.800$ ).

##### TAVOLA II.

- Figg. 5-6. - Ceppo 671. Fotografia e lucido di cellula in ana-telofase, mostrante ineguale ripartizione cromosomica: 13 cromosomi a destra e 15 a sinistra. Da notare i grandi metacentrici di aspetto duplice e le gocce di materiale di riserva, sul piano equatoriale (Foto  $\times 1.300$ ; lucido  $\times 2.800$ ).

- Fig. 7. - Ceppo 671. Cellula « aploide » con eliminazioni ed agglutinazioni di molti cromosomi ( $\times 1.300$ ).
- Fig. 8. - Ceppo 671. Cellula con 38 cromosomi circa. Le frecce indicano i due grandi metacentrici ( $\times 1.300$ ).
- Fig. 9-10. - Ceppo 671. Cellule in telofase senza citodieresi ( $\times 1.300$ ).
- Fig. 11. - Ceppo 671. Cellula binucleata a nuclei interfasic; in ambedue è visibile un grosso nucleolo ( $\times 1.300$ ).

## TAVOLA III.

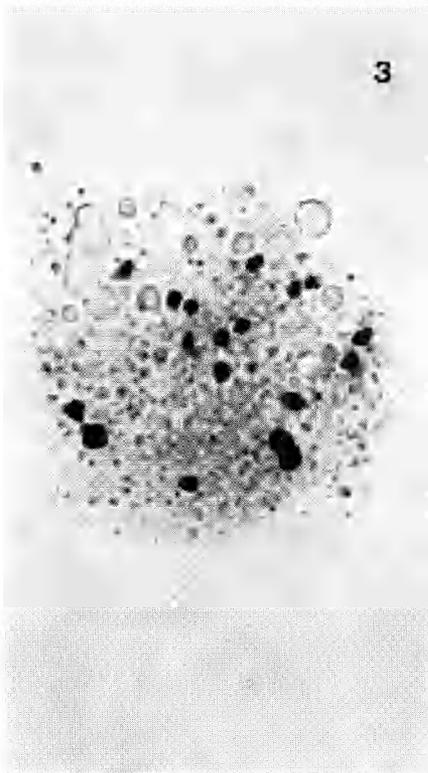
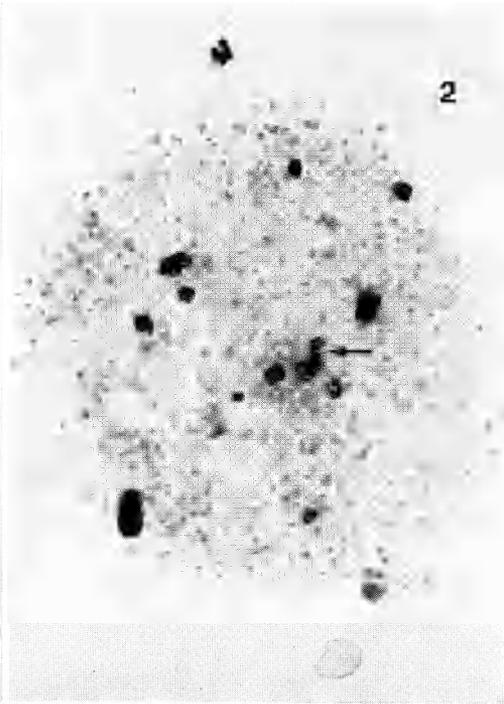
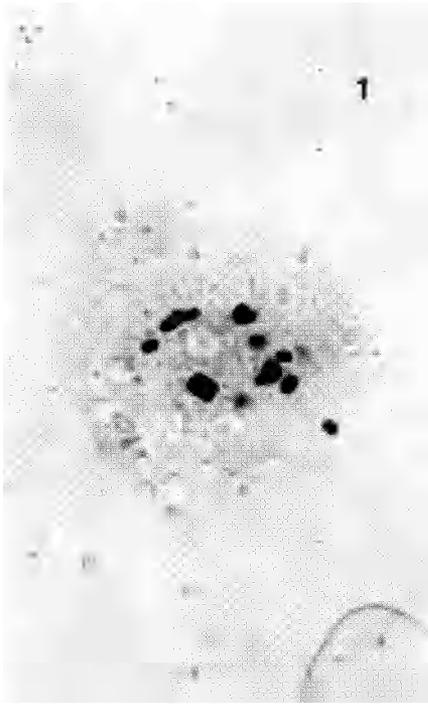
- Figg. 12-13. - Ceppo 671. Cellule binucleate in profase e prometafase. Da notare la perfetta sincronia degli eventi nucleari ( $\times 1.300$ ).
- Fig. 14. - Ceppo 671. Cellula telofasica dell'embrione a sviluppo diploide: notare le dimensioni assai maggiori rispetto alle normali cellule diploidi ( $\times 1.000$ ).
- Fig. 15. - Ceppo 671. Cellula binucleata dell'embrione a sviluppo diploide: anche in questa notare la taglia molto grande ( $\times 1.000$ ).

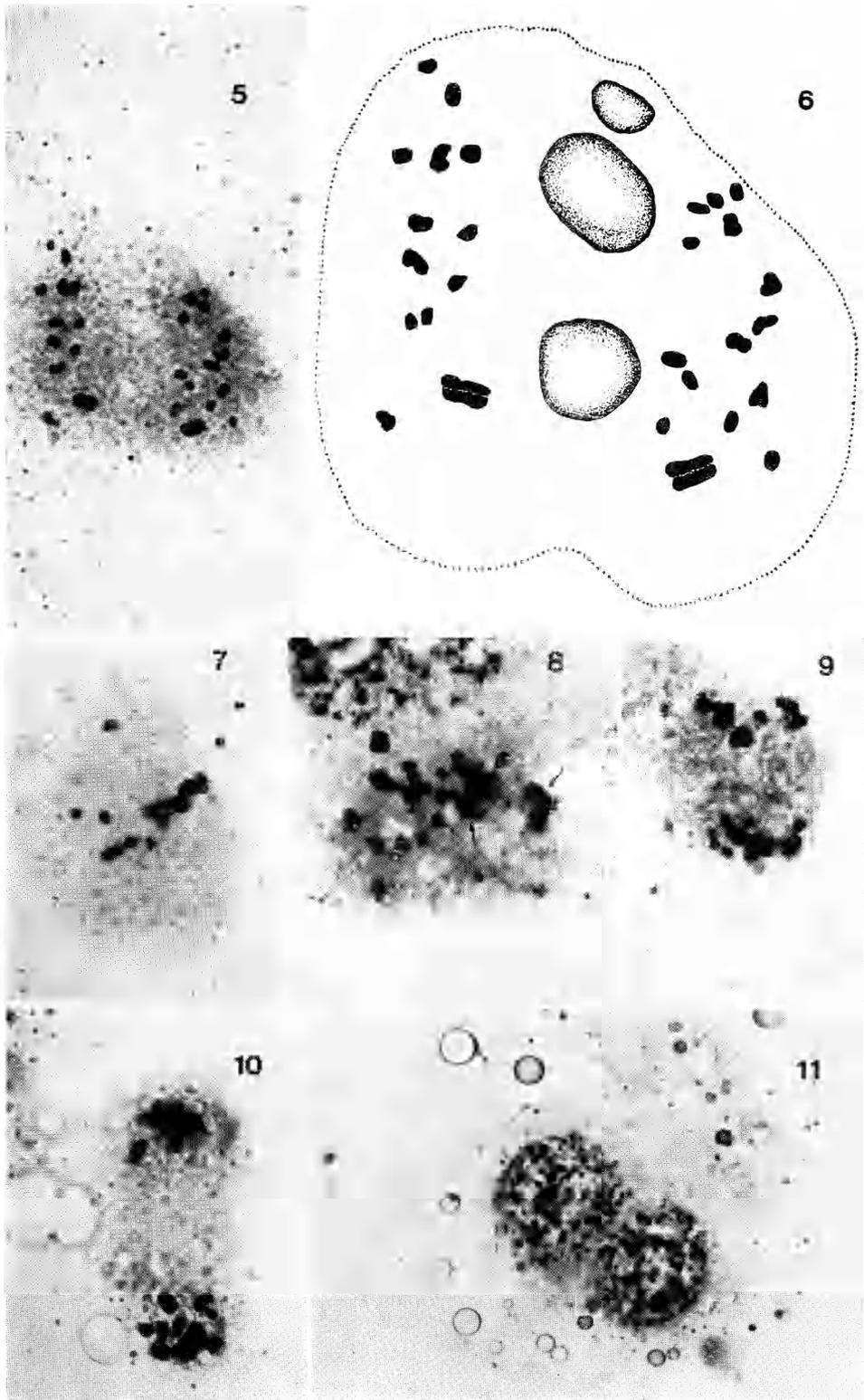
## TAVOLA IV.

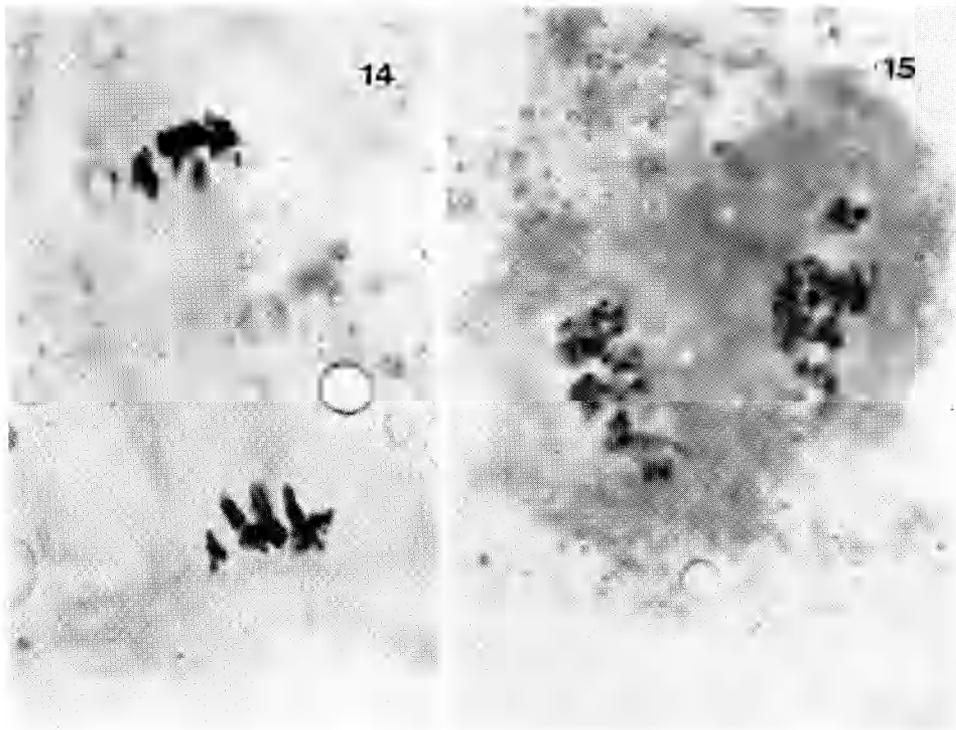
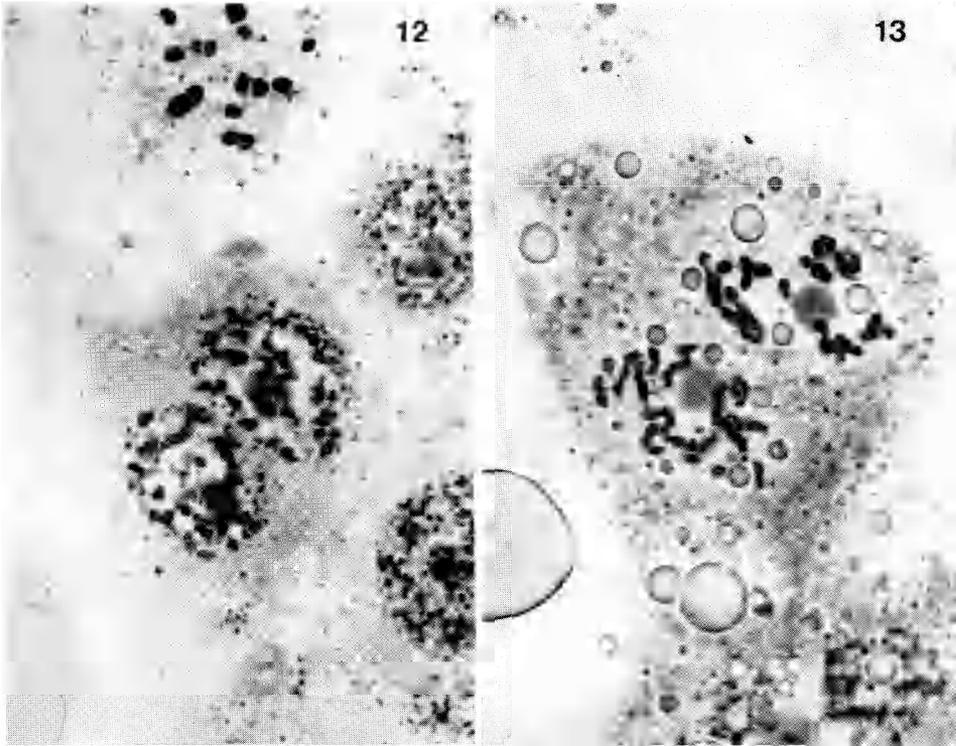
- Fig. 16. - Ceppo anfigonico. Cellula ipodiploide (27 cromosomi) di embrione di 75 giorni. Sono riconoscibili i due grandi metacentrici ( $\times 2.800$ ).
- Fig. 17. - Ceppo anfigonico. Cellula ipodiploide (32 cromosomi) di embrione di 75 giorni. Da notare i due grandi metacentrici ( $\times 2.800$ ).

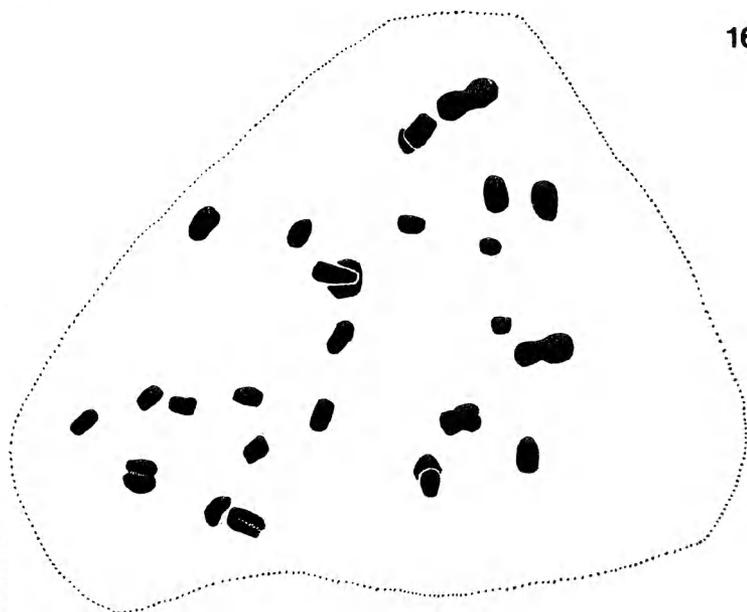
## TAVOLA V.

- Fig. 18. - Ceppo anfigonico. Cellula anafasica mostrante asincronia di divisione ed ineguale ripartizione cromosomica (20 a sinistra e 16 a destra). Tale cellula appartiene ad un embrione con sviluppo aploide ( $\times 2.800$ ).
- Figg. 19-20. - Ceppo anfigonico. Fotografia e lucido di cellula ipodiploide (27 cromosomi) di embrione con iniziale sviluppo aploide. Sono riconoscibili i 2 grandi metacentrici. (Foto  $\times 1.300$ ; lucido  $\times 2.800$ ).

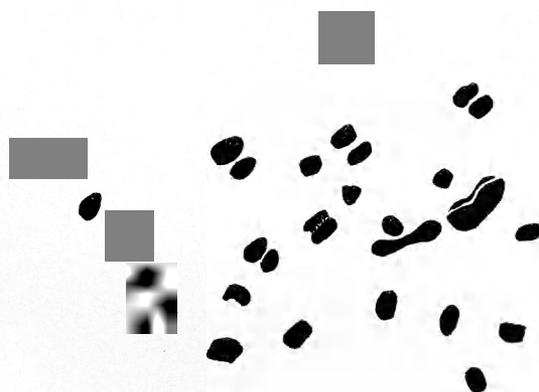








16



17

