
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

ROBERTO BERTOLANI

**Contributo alla cariologia dei Tardigradi.
Osservazioni su *Macrobotus hufelandii***

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 50 (1971), n.6, p. 772-775.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1971_8_50_6_772_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. — *Contributo alla cariologia dei Tardigradi. Osservazioni su Macrobiotus hufelandii* (*). Nota di ROBERTO BERTOLANI, presentata (**) dal Socio A. STEFANELLI.

SUMMARY. — The chromosome number in *M. hufelandii* is $2n = 12$ and $n = 6$ as in two other species of *Macrobiotus* (*M. richtersi* from Pisa and *M. harmsworthi*). The results differ from previous data which have stated $2n = 14$ in *M. hufelandii* females. It is supposed that at least two sibling species are included in *M. hufelandii*.

La classificazione dei Tardigradi presenta spesso notevoli difficoltà e incertezze [1] poiché i pochi caratteri distintivi (apparato boccale, cuticola e suoi processi, unghie e ornamentazioni dell'uovo) possono presentare un'ampia variabilità nell'ambito della stessa specie; essendo stato possibile l'allevamento solo in pochi casi, non si è riusciti a verificare se tali variazioni siano specifiche, o se vi siano più specie comprese sotto lo stesso nome. Il medesimo discorso vale per specie classificate con nome diverso, ma che tuttavia presentano solo piccole variazioni tra loro (per esempio: gli *Echiniscus* della serie *blumi-canadensis*). L'esistenza di questi problemi ha suggerito di intraprendere un esame cariologico sui Tardigradi. Questo lavoro si inserisce in un piano di ricerca del nostro Istituto inteso all'individuazione di specie *sibling*, la cui esistenza è già stata dimostrata in alcuni Crostacei rizocefali [2].

I dati bibliografici sulla cariologia dei Tardigradi sono scarsi e non sempre attendibili, sia perché rappresentano osservazioni incidentali nel corso di ricerche eseguite con altri intenti, sia perché sono ottenuti con metodi non molto idonei (sezioni istologiche), sia perché i corredi cromosomici a volte sono attribuiti a specie entrate in sinonimia o insufficientemente descritte. Basse [3] asserisce che piastre equatoriali di gonadi femminili in *Macrobiotus hufelandii* presentano circa (« etwa ») 14 cromosomi. Henneke [4] in *Macrobiotus macronyx*, che in realtà è un *Hypsibius* (*H. dujardini* o *H. augusti* secondo Marcus), osserva elementi della gonade femminile e maschile con 5 cromosomi, ma non decide se si tratta del numero aploide o diploide. Von Wenck [5] in *Macrobiotus lacustris* (anche in questo caso si tratta di un *Hypsibius*; secondo Marcus *H. augusti*) descrive la prima divisione maturativa delle uova con 5 bivalenti, assai piccoli, ma ben separati tra loro; l'Autore descrive inoltre 10 cromosomi nelle cellule embrionali. Marcus in un lavoro sull'embriologia dei Tardigradi [6] ed in una monografia [7] cita alcuni numeri cromosomici osservati negli ovociti dopo la formazione del corion: 14 per

(*) Ricerca eseguita nell'Istituto di Anatomia Comparata dell'Università, Via Berengario, 14, 41100 Modena.

(**) Nella seduta del 18 giugno 1971.

Macrobotus hufelandii, 12 per *Hypsibius convergens* e *M. harmasworthi*, 10 per altre specie di *Hypsibius*, per esempio. *H. megalonyx* (sin. *H. augusti*). L'Autore inoltre rappresenta e descrive nelle metafasi I degli ovociti di *H. convergens* 6 tetradi. Più recentemente Ammermann [8, 9] osserva in *H. dujardini* 5 bivalenti nelle metafasi I degli ovociti e 10 cromosomi nelle mitosi embrionali. In un precedente lavoro [10] ho accertato l'esistenza in *M. richtersi* di una popolazione bisessuata con 6 bivalenti nelle metafasi meiotiche e 12 cromosomi nelle mitosi, e di un'altra popolazione partenogenetica con 18 cromosomi nelle mitosi ovocitarie e somatiche. Avendo osservato che anche in *M. hufelandii* vi sono popolazioni bisessuate e popolazioni prive di maschi [11], in questa Nota riferisco i risultati delle prime osservazioni su questo Tardigrado, sia come premessa all'esame delle popolazioni prive di maschi, sia come inizio di un esame carilogico di questi animali; infatti *M. hufelandii*, forse perché è una specie cosmopolita, presenta una notevole variabilità nei caratteri morfologici, che ha fatto sospettare l'esistenza di popolazioni sistematicamente distinte [12].

Per questa ricerca ho utilizzato circa 450 esemplari di *Macrobotus hufelandii* Schultze appartenenti a popolazioni bisessuate, dove ho riscontrato un rapporto-sessi di circa 1 : 1, e che sono state raccolte nelle zone appenniniche delle provincie di Modena e Reggio Emilia [11]. I Tardigradi sono stati estratti da muschi e licheni inumiditi con acqua distillata (per 30 min-6 h), sono stati isolati dai vari detriti ed esaminati *in vivo*. Per il completamento della diagnosi sistematica gli animali e le uova sono stati trasportati su un vetrino e montati in polivinil-lattofenolo e sono stati classificati secondo i criteri di Ramazzotti [12] e di Marcus [13]. Per l'analisi carilogica, dopo vari tentativi con orceina acetica, carminio acetico e con il metodo di Feulgen, ho preferito l'orceina aceto-lattica per la costanza e nitidezza dei preparati; pertanto i Tardigradi sono stati posti in una salierina con pochissima acqua alla quale sono state aggiunte alcune gocce di orceina aceto-lattica; nella salierina, coperta da un vetro, si è effettuata la colorazione (12-70 ore); i singoli animali sono stati quindi raccolti al binoculare con una sottile pipetta e trasferiti singolarmente su un vetrino in una goccia di nuova orceina aceto-lattica e infine coperti da un coprioggetto. Il preparato è stato sottoposto ad una verifica tassonomica ed è stato misurato l'animale. Successivamente, quando il caso lo richiedeva, veniva effettuato uno schiacciamento, più o meno spinto, per mettere meglio in evidenza i cromosomi (1). Il metodo descritto non può essere standardizzato per tutti i Tardigradi; infatti *Hypsibius*, ma soprattutto *Milnesium* e gli Echiniscidi, si colorano appena o non si colorano affatto se i tessuti restano all'interno della cuticola, e pertanto in questi casi è necessario comprimere il coprioggetto fino a far uscire le cellule dalla cuticola. In ogni caso le vescicole germinative e i cromosomi degli ovociti maturi

(1) Ringrazio il dott. B. Fratello per l'aiuto e i consigli ricevuti durante lo svolgimento di questa ricerca.

non si colorano o prendono una colorazione debolissima se restano all'interno dell'animale; così, e questo vale anche per i *Macrobrotus*, si deve esercitare con un ago una pressione sul coprioggetto che provochi la fuoriuscita degli ovociti. Va notato inoltre che in *M. hufelandii* le uova sono più scarse (1-4) che in *M. richtersi* (8-15, fino a circa 30); ciò comporta una maggior difficoltà nell'ottenere buoni preparati, essendo relativamente facile che qualche ovocita non fuoriesca, o che si rovini. Bisogna infine tener presente che i preparati allestiti con orceina aceto-lattica sono semipermanenti poiché col tempo l'orceina precipita in granuli e si adensa rendendo inutilizzabile il preparato. Le osservazioni dei cromosomi, date le piccole dimensioni, sono sempre state effettuate ai massimi ingrandimenti ($\times 100$) in campo chiaro ed in contrasto di fase.

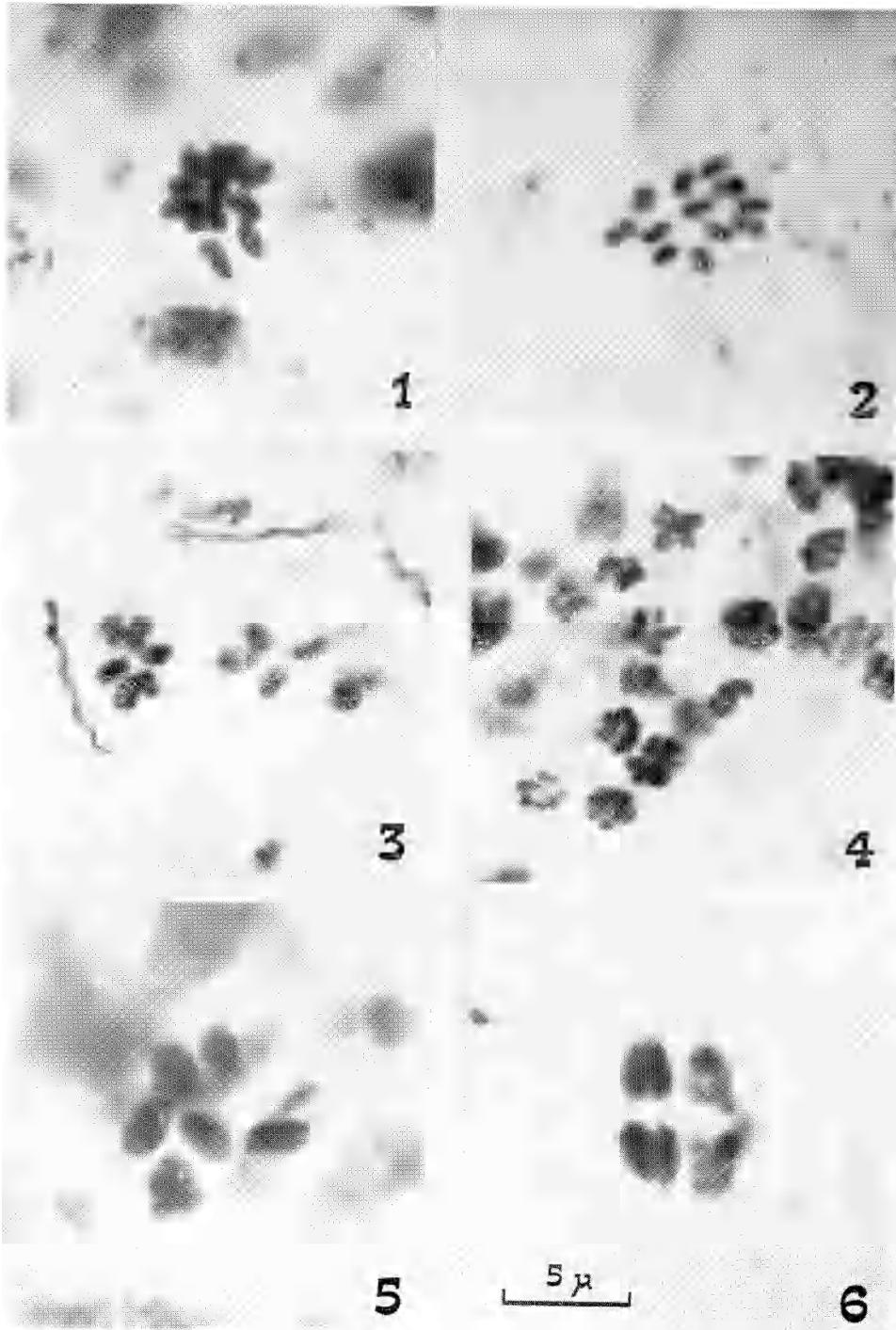
L'analisi cariologica in *M. hufelandii* ha messo in evidenza la presenza, oltre che di mitosi e meiosi nelle gonadi, di mitosi in molti tessuti somatici, di cui già è stato riferito precedentemente [14]; tra le mitosi somatiche si prestano meglio ad un conteggio cromosomico quelle delle cellule intestinali, dove più volte ho distinto 12 cromosomi sferoidali (fig. 1), sia in femmine che in animali di sesso non riconosciuto; 12 distinti cromosomi sono stati contati anche in un globulo cavitario. Le migliori mitosi, data la maggior separazione dei cromosomi, sono quelli goniali; esse sono presenti negli individui più piccoli, quando il sesso non è riconoscibile. Anche in questi casi sono state osservate piastre con 12 cromosomi sferoidali o appena allungati (fig. 2). Le rare mitosi rinvenute nelle gonadi maschili non mi hanno permesso un computo sicuro.

Nel testicolo le cellule sono molto piccole, ma tra esse si possono individuare le metafasi I degli spermatociti (fig. 3), dove si osservano 6 corpi cromatici allungati e riuniti a stella ($3-3,5 \mu$ di diametro) simili a quelli di *M. richtersi* [10]; si deve ritenere che ogni corpo cromatico rappresenti un bivalente, anche se in essi non è netta la fessurazione longitudinale; talvolta nella gonade maschile appaiono piastre più piccole ($2,2-2,7 \mu$ circa) in cui si riconoscono 6 piccoli cromosomi rotondeggianti (fig. 4); queste immagini vanno interpretate come metafasi II.

Nella gonade femminile sono stati osservati ovociti al termine della vitellogenesi in metafase, nei quali sono riconoscibili 6 corpi cromatici (fig. 5), più o meno allungati, di dimensioni maggiori rispetto a quelli degli spermatociti e ben distanziati tra loro; negli ovociti la natura del bivalente è chiaramente denunciata dalla marcata fessurazione longitudinale (fig. 6).

Il numero cromosomico di *M. hufelandii* risulta pertanto essere in condizione diploide $2n = 12$ ed in condizione aploide $n = 6$.

Questi dati non concordano con quelli descritti in bibliografia per questa specie ($2n = 14$ [3, 7]). Data la usuale accuratezza delle osservazioni di Marcus e la diversa origine del materiale, sono portato ad escludere un errore di conteggio; si affaccia piuttosto l'ipotesi che vi siano almeno due specie morfologicamente simili, che presentano un diverso numero cromosomico (specie *sibling*) riunite in *M. hufelandii*: infatti tra i campionamenti italiani



Mitosi somatica (1) e goniale (2) in *M. hufelandii*. I divisione (3) e II divisione meiotica (4) del maschio. Bivalenti nella I divisione meiotica della femmina: in piastra (5) e due bivalenti in fuso (6).

sono state trovate popolazioni bisessuate a Modena e partenogenetiche a Ravenna [11].

Il corredo diploide di *M. hufelandii* risulta numericamente uguale a quello di altri *Macrobotus* di cui è noto il numero cromosomico: *M. harmsworthi* ⁽²⁾ [7] e la popolazione bisessuata di *M. richtersi* [10]. Ciò tuttavia non impedisce che possano esistere differenze nel numero cromosomico tra specie affini o addirittura nell'ambito della stessa specie; ne sono prova le differenze tra *M. richtersi* diploide e triploide [10] e tra *Hypsibius convergens* [7] e *H. dujardini* [9], che sono morfologicamente assai simili. Per questo motivo ritengo che una ricerca in questo senso sia promettente e pertanto sono incoraggiato ad approfondire l'esame carilogico dei Tardigradi.

CONCLUSIONI

È stato precisato il numero cromosomico di *M. hufelandii*, che nella condizione diploide è uguale a 12 e 6 in quella aploide. Il corredo cromosomico di *M. hufelandii* risulta numericamente uguale a quello di altre due specie di *Macrobotus* (*M. richtersi* di Pisa e *M. harmsworthi*). I risultati ottenuti differiscono da quelli di precedenti Autori, i quali hanno descritto $2n = 14$ nelle femmine. Si prospetta l'ipotesi che in *M. hufelandii* coesistano specie diverse.

BIBLIOGRAFIA

- [1] G. RAMAZZOTTI, «Mem. Ist. Ital. Idrobiol.», 21, 117-128 (1967).
- [2] B. FRATELLO, «Caryologia», 21, 359-367 (1968).
- [3] A. BASSE, «Zeitschr. wiss. Zool.», 80, 259-281 (1905).
- [4] J. HENNEKE, «Zeitschr. wiss. Zool.», 97, 721-752 (1911).
- [5] W. VON WENCK, «Zool. Jahrb.», *Abt. Anat. Ont.*, 37, 465-514 (1914).
- [6] E. MARCUS, «Zool. Jahrb.», *Abt. Anat. Ont.*, 50, 333-384 (1929).
- [7] E. MARCUS, in: BRONNS, *Klassen und Ordnungen des Tierreichs*, V (Leipzig, 1929).
- [8] D. AMMERMAN, «Naturwiss.», 49, 115 (1962).
- [9] D. AMMERMAN, «Chromosoma», 23, 203-213 (1967).
- [10] R. BERTOLANI, «Rend. Acc. Naz. Lincei», ser. 8, 50 (in stampa) (1971).
- [11] R. BERTOLANI, «Rend. Acc. Naz. Lincei», ser. 8, 50 (in stampa) (1971).
- [12] G. RAMAZZOTTI, «Mem. Ist. Ital. Idrobiol.», 14, 1-595 (1962).
- [13] E. MARCUS, in: *Das Tierreich*, 66, 1-340 (Walter de Gruyter ed., Berlin und Leipzig, 1936).
- [14] R. BERTOLANI, «Rend. Acc. Naz. Lincei», ser. 8, 48, 739-742 (1970).

(2) In osservazioni personali ho verificato la presenza di 6 bivalenti negli ovociti di *M. harmsworthi* a conferma dei risultati di Marcus [7].