

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

# RENDICONTI

---

GIORGIO MANCINO, MATILDE RAGGHIANI, STEFANIA  
BUCCI INNOCENTI

## I cariotipi di *Triturus marmoratus* e *T. cristatus* studiati con il "C-staining method"

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 55 (1973), n.5, p. 559-564.*  
Accademia Nazionale dei Lincei

[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1973\\_8\\_55\\_5\\_559\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1973_8_55_5_559_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.** — *I cariotipi di Triturus marmoratus e T. cristatus studiati con il «C-staining method»* (\*). Nota di GIORGIO MANCINO, MATILDE RAGGHIANI e STEFANIA BUCCI INNOCENTI, presentata (\*\*)  
dal Socio M. BENAZZI.

SUMMARY. — The mitotic chromosomes of the newt species *Triturus marmoratus* and *T. cristatus* were submitted to the C-staining method.

All the centromeres are darkly stained and single darkly stained bands are induced on both sides of the centromere regions as well as on various chromosomes in subterminal position. Therefore, the C-bands allow the identification of the single elements of the complements and their more exact arrangement into karyotypes. In both species, the sex chromosomes show an extensive dark segment along the long arm corresponding to the heteromorphic region of lampbrush chromosomes I. In spite of the different number and location of the nucleolus-organizing regions and some discrepancies concerning certain subterminal bands, the two karyotypes appear of similar morphology and structure. There is no evidence for extensive structural rearrangements: probably *T. marmoratus* and *T. cristatus* have mostly undergone a certain differentiation caused by allelic changes in single genetic loci during the processes of karyological evolution and speciation.

#### INTRODUZIONE

La tecnica della bandeggiatura cromosomica secondo Pardue e Gall (1970) è stata recentemente applicata ai cromosomi di Urodeli, nei quali si è rivelata particolarmente efficace per una più sicura identificazione dei singoli elementi del corredo e, di conseguenza, per una più approfondita analisi comparativa dei cariotipi di specie sistematicamente affini ed aventi lo stesso numero cromosomico (Nardi, Ragghianti e Mancino, 1973). Si è ritenuto perciò utile estendere questa tecnica anche a *Triturus marmoratus* e a *T. cristatus* che, per la loro stretta affinità sistematica, sono stati racchiusi nella stessa superspecie (Lantz, 1947; Spurway, 1953) e sono in grado di dare l'ibrido F<sub>1</sub> *Triturus blasii* de l'Isle (1862), nelle zone di sovrapposizione del loro areale (cfr. Vallée, 1959).

I dati ottenuti nel presente lavoro hanno fornito un quadro cariologico che precisa ulteriormente il grado di differenziamento cromosomico raggiunto dalle due specie nel corso dei processi di speciazione.

#### MATERIALE E TECNICA

Le specie prese in esame sono *Triturus marmoratus* (Latreille, 1800) e *Triturus cristatus carnifex* (Laurenti, 1768).

L'areale della prima specie comprende la penisola iberica ad eccezione del sud-est, estendendosi anche in Francia oltre i Pirenei a sud di una linea che

(\*) Istituto di Istologia e Embriologia dell'Università di Pisa, Via Volta 4, Pisa. Ricerche eseguite con il contributo del C.N.R., Roma.

(\*\*) Nella seduta del 26 novembre 1973.

approssimativamente unisce la Normandia alla Borgogna. L'areale di *T. c. carnifex* ricopre, invece, tutta la penisola italiana dal livello del mare a m 1850, la Svizzera a sud delle Alpi, la Jugoslavia settentrionale, le regioni alpine dell'Austria a sud del Danubio; può estendersi inoltre fino all'Albania (cfr. Thorn, 1968).

Entrambe le specie presentano il numero cromosomico  $n = 12$ ,  $2n = 24$  comune alla maggior parte dei Salamandridi. Il loro cariotipo è stato analizzato dettagliatamente su piastre metafasiche ottenute da tessuti diversi (testicolo, intestino e coda in rigenerazione). Le preparazioni sono state allestite seguendo la tecnica introdotta da Pardue e Gall (1970) e successivamente descritta in dettaglio da Gall e Pardue (1971), omettendo l'uso di RNA radioattivo ed usando HCl a concentrazione 1 N. Gli esemplari erano preventivamente iniettati intraperitonealmente con 0,15 ml di Colcemid (Ciba; 1 mg/ml). Dopo 24 h, il materiale era fissato in 1 : 3 acido acetico-alcool etilico e dissociato in acido acetico al 45 %. Le preparazioni cromosomiche sono state infine allestite secondo la consueta tecnica definita « dry-ice method ».

La nomenclatura che si riferisce alla morfologia dei cromosomi in base alla posizione del centromero è in accordo con la terminologia proposta da Levan, Fredga e Sandberg (1964); quella che si riferisce alla bandeggiatura è in accordo con le norme stabilite nel corso della Conferenza di Parigi (1971).

## RISULTATI E DISCUSSIONE

Poiché lo scopo del presente lavoro è essenzialmente quello di presentare i dati relativi al « banding pattern » e alla caratterizzazione dei cariotipi di *T. marmoratus* e di *T. c. carnifex*, presenteremo i risultati ottenuti dall'impiego della tecnica precedentemente menzionata separatamente per le due specie.

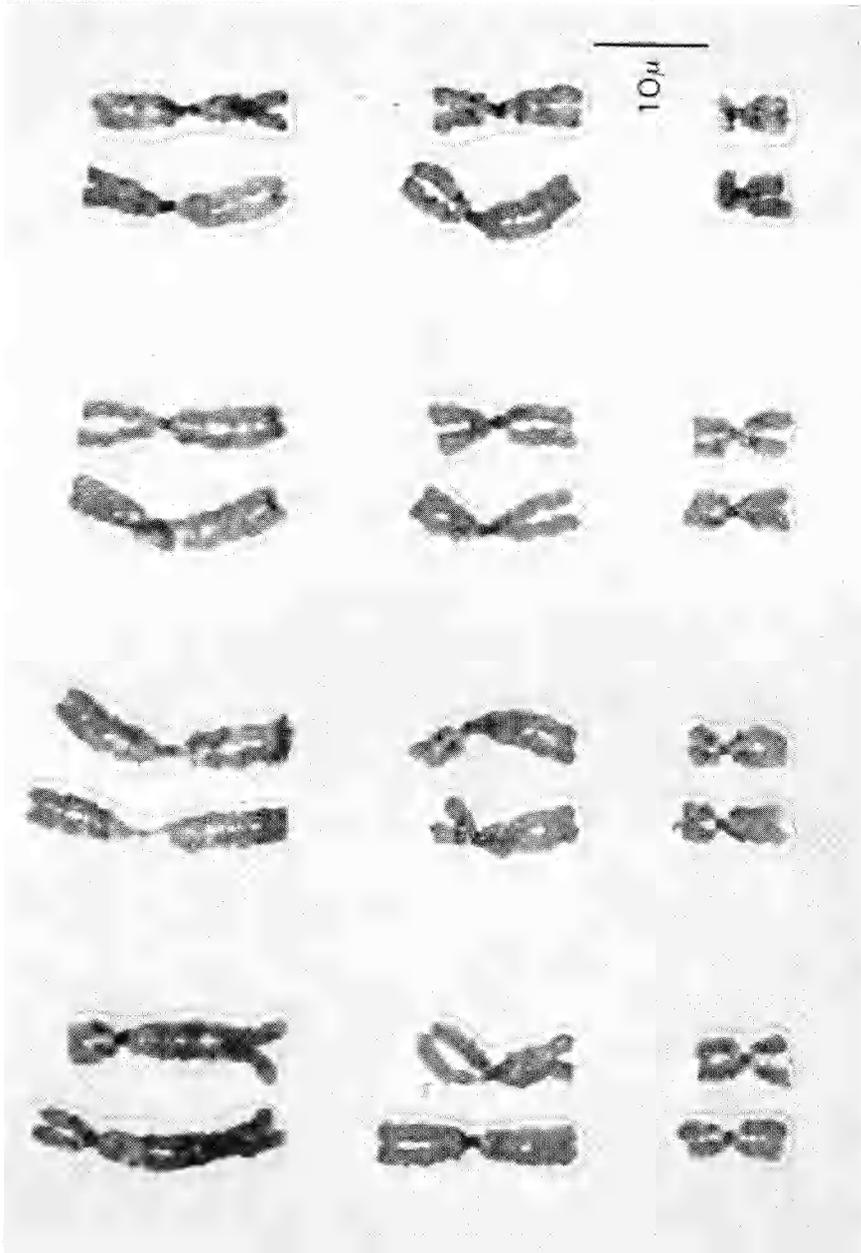
### A) *T. marmoratus*

#### a) Regione centromerica.

Tutti i cromosomi del corredo presentano un centromero evidenziato da un granulo piuttosto spesso o da un tratto che risulta colorato intensamente seguendo il « C-staining method » (Tav. I; Tav. II, fig. 1); particolarmente evidente è la regione centromerica del cromosoma XII.

#### b) Bande pericentriche.

Ai lati della regione centromerica sono presenti tratti semplici che con il Giemsa risultano colorati in scuro. Queste bande, definibili per la loro posizione come pericentriche, in alcuni cromosomi (IX, X e XI) sono ben evidenti su entrambi i bracci, mentre in altri sono presenti solo sul braccio corto (I, VI e VIII) o sul braccio lungo (XII) (Tav. I; Tav. II, fig. 1). Sottili tratti pericentrici sono talora presenti anche sul braccio corto dei cromosomi II, III, IV, V e VII e sul braccio lungo dei cromosomi II, VI, VII e VIII.



Cariotipo di *T. marmoratus*. La coppia I è costituita dai cromosomi del sesso. Ulteriori spiegazioni nel testo.

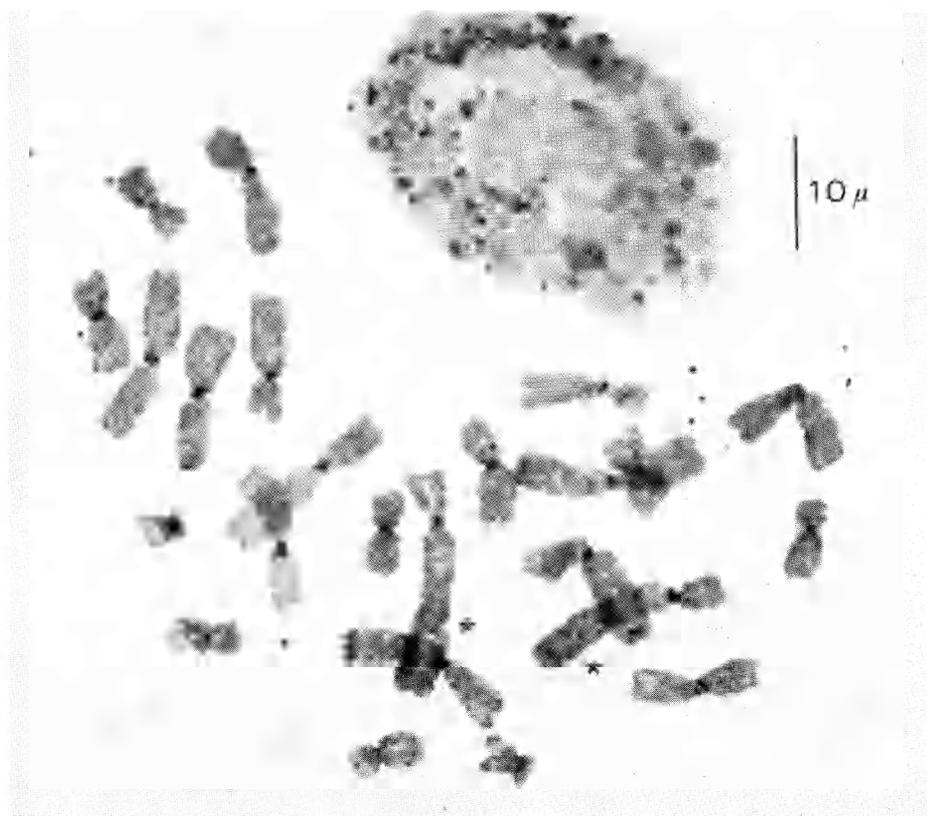


Fig. 1. - Metafase spermatogonale di *T. marmoratus*. I cromosomi del sesso sono indicati con \*. Ulteriori spiegazioni nel testo.

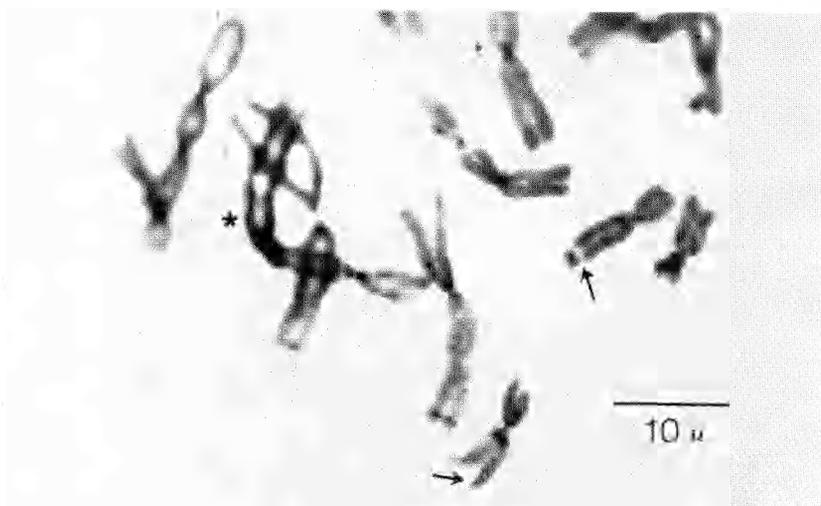
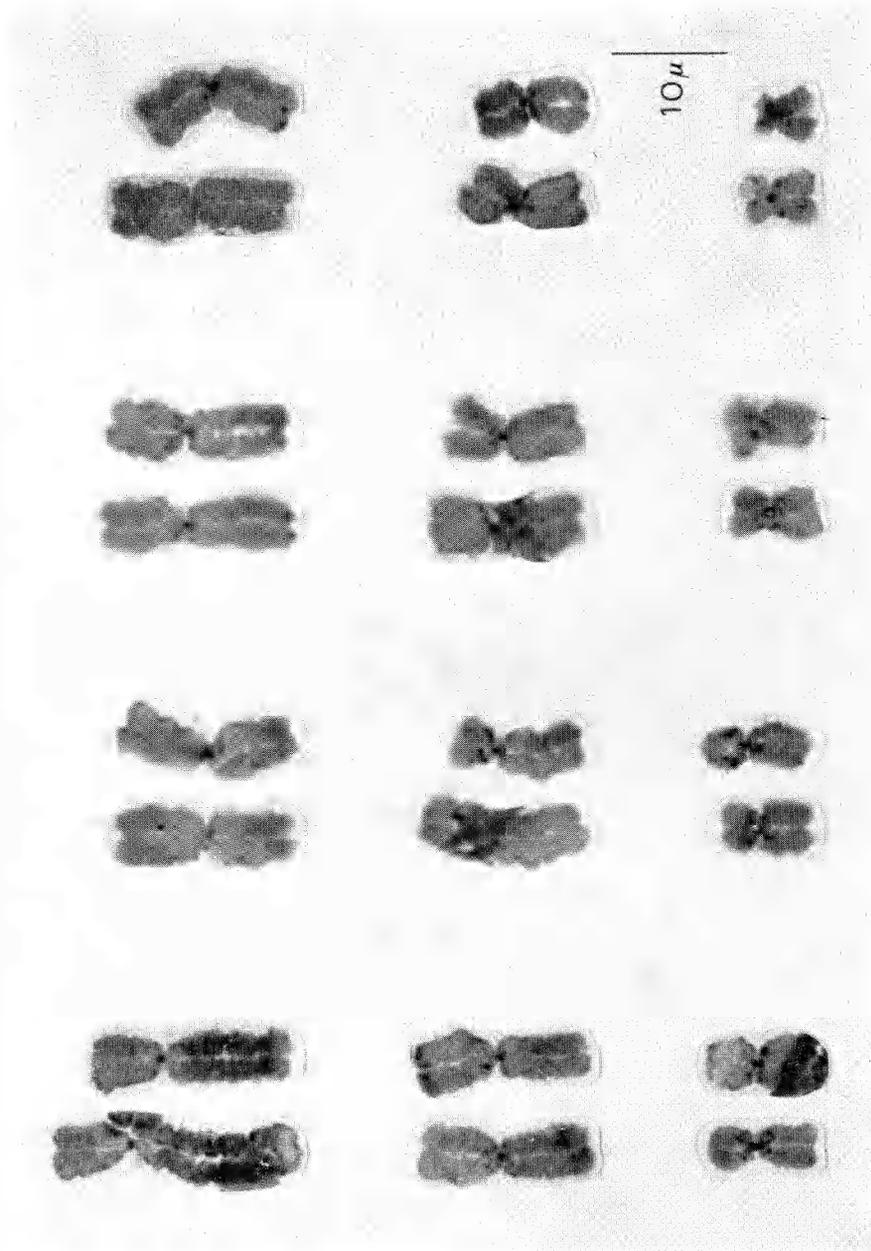
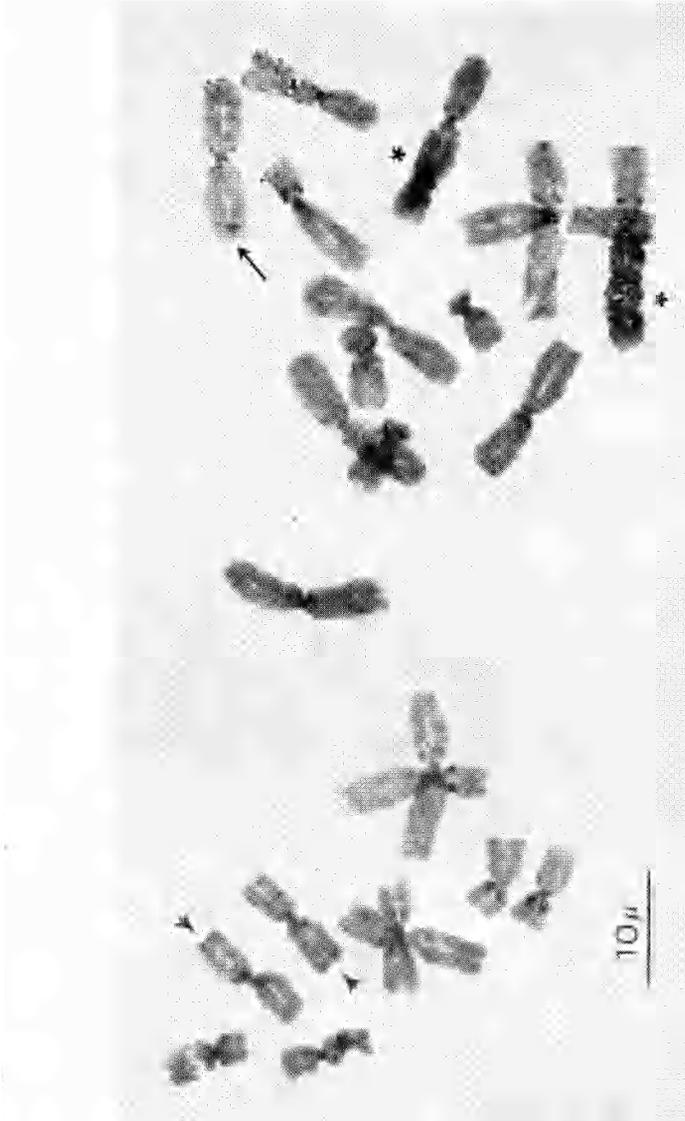


Fig. 2. - Cromosomi di piastra metafase somatica di *T. marmoratus*. Con → è indicata la regione nucleolo-organizzatrice del cromosomi X; con \* un cromosoma del sesso.



Cariotipo di *T. c. carnifex*. La coppia I è costituita dai cromosomi del sesso. Ulteriori spiegazioni nel testo.



Metafase spermatogonale di *T. c. carnifex*. Sono stati indicati con \* i cromosomi del sesso:  
con  $\longrightarrow$  il tratto subterminale del cromosoma V e con  $\blacktriangleright$  il tratto subterminale dei cromosomi VIII.

c) Bande subterminali.

L'uso del «C-staining method» determina bande subterminali, ben evidenti anche nell'adulto, sul braccio lungo dei cromosomi II e III (Tav. I; Tav. II, fig. 1); quella presente sul cromosoma II appare talvolta come una estesa area subterminale (Tav. I).

d) Regione nucleolo-organizzatrice.

Nel corredo di *T. marmoratus* è presente una sola coppia di regioni nucleolo-organizzatrici, precisamente sul braccio lungo del cromosoma X in posizione subterminale (Nardi e Mancino, 1971). Questa regione generalmente appare come un tratto chiaro dopo trattamento dei cromosomi mitotici con il «C-staining method» (Tav. II, fig. 2); tuttavia in alcune preparazioni è possibile osservare un granulo o un sottile tratto scuro ai bordi della costrizione nucleolare. Questo dato è in accordo con le osservazioni compiute, anche su altro materiale e con procedimenti tecnici diversi, da precedenti Autori, quali Ganner e Evans (1971), Vosa e Marchi (1972) e Labrousse, Guillemin e Gallien (1972). Questi ultimi Autori, in particolare, applicando la tecnica del Giemsa a pH = 9 nella specie *Pleurodeles waltlii*, non hanno osservato alcuna banda colorata in scuro a livello delle costrizioni secondarie delimitanti il satellite dei cromosomi III e XI, che rappresentano la coppia dei cromosomi nucleolari della specie.

e) Regione eteromorfa dei cromosomi del sesso.

I due cromosomi partner del bivalente *lampbrush* I, caratterizzati da lunghezza diversa e da una vasta regione eteromorfa ed achiasmatica che si estende sul braccio lungo, sono stati considerati gli eterocromosomi della specie (Mancino e Nardi, 1971; Nardi, Raggianti e Mancino, 1972). Colorando le mitosi con il Giemsa, il segmento di cromosoma I, corrispondente alla regione eteromorfa, risalta per intensità di colorazione sulla restante porzione cromosomica (Tav. I; Tav. II, fig. 1); tale comportamento degli eterocromosomi è stato notato in entrambi i sessi.

B) *T. cristatus carnifex*

a) Regione centromerica.

Il centromero è evidenziato dalla tecnica impiegata su tutti i cromosomi, ma appare spesso rappresentato da un granulo scuro di dimensioni più ridotte rispetto a quelle rilevate in *T. marmoratus* (Tav. III, Tav. IV).

b) Bande pericentriche.

Anche in questa specie si evidenziano bande pericentriche semplici su entrambi i bracci dei cromosomi VIII, IX, X, XI e XII e sul braccio corto dei cromosomi I, V e VI. Tratti più sottili e meno evidenti sono talora presenti anche sul braccio corto del cromosoma III e su entrambi i bracci dei cromosomi IV e VII (Tav. III, Tav. IV).

c) Bande subterminali.

In *T. c. carnifex* sono rilevabili con il Giemsa bande subterminali sui cromosomi II, V e VIII (Tav. III, Tav. IV). È possibile avanzare una spiegazione delle discrepanze fra questa specie e *T. marmoratus* solo per le bande subterminali del V e dell'VIII. Confrontando infatti le mappe dei rispettivi *lampbrush chromosomes* si è visto che questi elementi in *T. c. carnifex* portano sfere inserite in posizione subterminale (Callan e Lloyd, 1960 a), mentre in *T. marmoratus* mancano completamente di sfere (Nardi, Raghianti e Mancino, 1972).

d) Regioni nucleolo-organizzatrici.

Le due regioni nucleolo-organizzatrici del corredo sono presenti, in posizione subterminale, sul braccio corto del cromosoma VI e, in posizione pressoché mediana, sul braccio corto del cromosoma IX (Mancino, Nardi e Raghianti, 1972). In tutti i preparati esaminati, in corrispondenza di tali regioni non è stato individuato alcun granulo colorato in scuro dal Giemsa.

e) Regione eteromorfa dei cromosomi del sesso.

Come in *T. marmoratus*, anche in *T. c. carnifex* i cromosomi della coppia I presentano un'estesa regione del braccio lungo fortemente colorata dopo trattamento con il Giemsa (Tav. III, Tav. IV). Rispetto al bivalente *lampbrush* I, costituito dagli eterocromosomi (Callan e Lloyd, 1960 b), si ritiene che tale regione possa corrispondere al tratto caratterizzato da *loops* eteromorfi e da costante assenza di chiasmi.

Dall'esame comparativo dei cariotipi di *T. marmoratus* e *T. cristatus carnifex* è possibile rilevare che i singoli elementi mostrano una soddisfacente corrispondenza nei corredi delle due specie non solo per morfologia e dimensioni, ma anche per struttura generale. Infatti, tenendo presente che le «C-bands» possono essere considerate regioni ad eterocromatina costitutiva (Pardue e Gall, 1970; Arrighi e Hsu, 1971; Yunis e Yasmineh, 1971) probabilmente ricca in DNA ripetitivo (cfr. Cooper e Hsu, 1972), l'affinità strutturale tra i due cariotipi può essere dedotta sia dal comportamento pressoché identico dei centromeri di tutti i cromosomi di fronte al Giemsa sia dal pattern di bandeggiatura che in diversi cromosomi appare caratterizzato da bande in ugual numero e localizzazione. In entrambi i corredi, inoltre, i partners della coppia I, ritenuti i cromosomi del sesso, presentano una estesa regione, corrispondente a quella eteromorfa sul rispettivo bivalente *lampbrush*, che reagisce in maniera identica alla tecnica impiegata.

Non sono invece emerse prove sicure che *T. marmoratus* e *T. cristatus carnifex* differiscano per estesi riarrangiamenti strutturali. Al momento attuale, il differenziamento delle due specie appare quindi legato principalmente a cambiamenti allelici avvenuti a livello di singoli loci genetici, come è stato rilevato dallo studio delle variazioni morfologiche dei *loops* giganti e di altri

*landmarks sui lampbrush chromosomes* (cfr. White, 1969; Nardi, Ragghianti e Mancino, 1970; Mancino, Nardi e Ragghianti, 1972; Mancino, 1973). Dal presente studio è emerso infine che anche gli organizzatori nucleolari contribuiscono a differenziare i due cariotipi; tuttavia non sono ancora chiari i meccanismi che hanno portato ad un numero diverso di regioni nucleolo-organizzatrici nelle due specie né l'importanza di questa diversificazione strutturale ai fini dell'evoluzione cariologica e della speciazione.

## BIBLIOGRAFIA

- ARRIGHI F. E. e HSU T. C., *Localization of heterochromatin in human chromosomes*, «Cytogenetics», 10, 81-86 (1971).
- CALLAN H. G. e LLOYD L., *Lampbrush chromosomes of crested newts Triturus cristatus (Laurenti)*, «Phil. Trans. Lond.», B 243, 135-219 (1960 a).
- CALLAN H. G. e LLOYD L., *Lampbrush chromosomes*. In: «New approaches in cell biology» (Walker, P. M. B. ed.). New York: Academic Press (1960 b).
- COOPER J. E. K. e HSU T. C., *The C-band and G-band patterns of Microtus agrestis chromosomes*, «Cytogenetics», 11, 295-304 (1972).
- GALL J. G. e PARDUE M. L., *Nucleic acid hybridization in cytological preparation*, «Methods in enzymology», 31, 470-480. New York: Academic Press (1971). (Grossman L. and Moldave K., eds.).
- GANNER E. e EVANS H. J., *The relationship between patterns of DNA replication and of quinacrine fluorescence in the human chromosome complement*, «Chromosoma», 35, 326-341 (1971).
- LABROUSSE M., GUILLEMIN C. e GALLIEN L., *Mise en évidence, sur les chromosomes de l'Amphibien Pleurodeles waltlii Michah., de secteurs d'affinité différente pour le colorant de Giemsa à pH 9*, «C.R. Acad. Sc. Paris», 274, 1063-1065 (1972).
- LANTZ L. A., *Hybrids between Triturus cristatus Laur. and Triturus marmoratus Latr.*, «Proc. Zool. Soc.», 117, 247-258 (1947).
- LEVAN A., FREDGA K. e SANDBERG A. A., *Suggestion for a chromosome nomenclature based on centromeric position*, «Hereditas», 52, 201-220 (1964).
- MANCINO G., *Lampbrush chromosomes in cytotaxonomic and cytogenetic studies*. In: «Cytotaxonomy and Vertebrate Evolution» (Chiarelli B. and Capanna E., eds.). New York: Academic Press (1973).
- MANCINO G. e NARDI I., *Chromosomal heteromorphism and female heterogamety in the marbled newt Triturus marmoratus (Latreille)*, «Experientia», 27, 821-822 (1971).
- MANCINO G., NARDI I. e RAGGHIANI M., *Lampbrush chromosomes from semi-albino crested newts, Triturus cristatus carnifex*, «Experientia», 28, 856-860 (1972).
- NARDI I. e MANCINO G., *Mitotic karyotype and nucleoli of the marbled newt Triturus marmoratus (Latreille)*, «Experientia», 27, 424-425 (1971).
- NARDI I., RAGGHIANI M. e MANCINO G., *Karyological differentiation within the superspecies Triturus cristatus (Amphibia, Urodela)*, «Boll. Zool.», 37, 511-512 (1970).
- NARDI I., RAGGHIANI M. e MANCINO G., *Characterization of the lampbrush chromosomes of the marbled newt Triturus marmoratus (Latreille, 1800)*, «Chromosoma», 37, 1-22, (1972).
- NARDI I., RAGGHIANI M. e MANCINO G., *Banding patterns in newt chromosomes by the Giemsa stain*, «Chromosoma», 40, 321-331 (1973).
- PARDUE M. L. e GALL J. G., *Chromosomal localization of mouse satellite DNA*, «Science», 168, 1356-1358 (1970).

- PARIS CONFERENCE (1971), *Standardization in human cytogenetics*, «Cytogenetics», *II*, 313–362 (1972).
- SPURWAY H., *Genetics of specific and subspecific differences in European newts*, «Symp. Soc. Exptl. Biol.», *7*, 200–237 (1953).
- THORN R., *Les Salamandres*. Éditions P. Lechevalier, Paris (1968).
- VALLÉE L., *Recherches sur Triturus blasii de l'Isle, hybrid naturel de Triturus cristatus Laur. x Triturus marmoratus Latr.* Imprimerie M. Declume, Lons-le-Saunier (1959).
- VOSA C. G. e MARCHI P., *On the quinacrine fluorescence and Giemsa staining patterns of the chromosomes of Vicia faba*, «Giorn. Bot. It.», *106*, 151–159 (1972).
- WHITE M. J. D., *Chromosomal rearrangements and speciation in animals*, «Annual Review of Genetics» (Roman H. L., ed.), *3*, 75–98 (1969).
- YUNIS J. J. e YASMINEH W. G., *Heterochromatin, satellite DNA, and cell function*, «Science», *174*, 1200–1209 (1971).