
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

ROBERTO BERTOLANI, VELEA MAMBRINI

**Analisi cariologica e morfologica di alcune
popolazioni di *Macrobotus hufelandi* (Tardigrada)
della Valsesia**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 62 (1977), n.2, p. 239–245.*
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1977_8_62_2_239_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/>

SEZIONE III

(Botanica, zoologia, fisiologia e patologia)

Zoologia. — *Analisi cariológica e morfologica di alcune popolazioni di Macrobiotus hufelandi (Tardigrada) della Valsesia* (*). Nota di ROBERTO BERTOLANI e VELEA MAMBRINI, presentata (**) dal Socio A. STEFANELLI.

SUMMARY. — Four populations with a different sex ratio of the tardigrade *Macrobiotus hufelandi* are recognized in an alpine valley. This difference is due to the presence of three biotypes (diploid, triploid and tetraploid biotype). Ameiotic thelitokous parthenogenesis is present in the triploid and tetraploid biotypes, while the diploid biotype is bisexual.

Two types of eggs, probably related to the biotypes, are identified by morphologic analysis of egg shell.

Questa ricerca rappresenta un ulteriore contributo alla conoscenza di *Macrobiotus hufelandi* Schultze, Tardigrado ritenuto cosmopolita, del quale sono stati descritti alcuni biotipi, caratterizzati da un diverso numero cromosomico o da una differente modalità nella maturazione dell'ovocita [1]. Sono infatti noti un biotipo diploide e anfigonico ($2n = 12$) presente in varie località dell'Italia settentrionale [2, 3] e due diversi biotipi triploidi ($3n = 18$) con partenogenesi telitoca. Di questi uno, raccolto nel Trentino, presenta ovociti con 18 univalenti che dopo la spiralizzazione non si pongono in piastra ma rimangono disposti disordinatamente in una vescicola fusiforme [3]; l'altro, trovato nei pressi del Lago di Garda, con ovociti contenenti 18 pseudobivalenti (ognuno dei quali è costituito da quattro cromatidi privi di chiasmi) che in metafase si dispongono regolarmente sul piano equatoriale [1]. Infine è stato descritto un biotipo tetraploide ($4n = 24$) con partenogenesi telitoca appartenente alla sottospecie *M. hufelandi recens* Cuénot, raccolto nell'Isola di Cipro; anche questo biotipo è caratterizzato da presenza di pseudobivalenti [1].

A questo punto ci sembra opportuno ricordare che Ramazzotti, pur non conoscendo ancora i dati carilogici, aveva supposto l'esistenza di diverse razze di *M. hufelandi*, basandosi più sull'aspetto delle uova (numero di sporgenze, loro altezza, presenza o assenza alla loro base di una coroncina di punti) che su quello degli animali (maggiore o minore lunghezza) [4]. Oltre a ciò sono da ricordare anche i dati recentemente ottenuti con la microscopia elettronica a scansione che mettono in rilievo differenze nell'aspetto della superficie delle uova di questa specie [5, 6].

Per questa ricerca sono stati raccolti nel mese di settembre quattro campioni di muschi in altrettante località della Valsesia (Alpi Pennine); in

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

(**) Nella seduta del 12 febbraio 1977.

ciascuno di questi campioni era presente, ma non esclusivo, *M. hufelandi*. La maggior parte degli animali ed alcune uova sono stati fissati e colorati con orceina aceto-lattica e utilizzati per l'indagine cariologica; alcuni animali e la maggior parte delle uova sono stati montati in polivinil-lattofenolo per l'analisi morfologica. Nella maggior parte degli animali trattati con orceina aceto-lattica è stato possibile riconoscere il sesso, seguendo criteri già precedentemente esposti [2].

I risultati ottenuti per ogni popolazione sono riferiti nella Tabella I.

TABELLA I.

Località	♂♂	♀♀	??	tot
Campertogno	33	59	5	97
Cervatto	12	124	38	174
Riva Valdobbia	36	209	40	285
Alagna	—	119	4	123

Si nota che il rapporto-sessi in ciascun campione di muschio presenta una situazione diversa; si va infatti da un'abbondanza relativa di maschi a Campertogno alla loro completa assenza ad Alagna.

L'analisi cariologica è stata condotta su 679 esemplari e per 64 di essi è stato determinato il numero cromosomico. Nelle quattro popolazioni i cromosomi delle metafasi mitotiche, osservate a livello delle gonadi, dei globuli cavitari e nel tratto iniziale dell'intestino medio, presentano il medesimo aspetto; essi risultano sempre rotondeggianti, con diametro di circa $1 \mu\text{m}$ e senza un evidente centromero. Queste mitosi sono tuttavia caratterizzate da un diverso numero cromosomico. Tra gli esemplari di tutte le popolazioni sono infatti stati trovati 12 cromosomi mitotici in ♀♀ e ♂♂ e 18, oppure 24 cromosomi esclusivamente in ♀♀ (fig. 1, 1-3). Il diametro delle piastre equatoriali delle mitosi a 12 cromosomi è di $6-6,5 \mu\text{m}$, di quelle a 18 di $5-7 \mu\text{m}$, infine di quelle a 24 è di $7 \mu\text{m}$.

La conferma della variazione numerica dei cromosomi è stata ottenuta dall'analisi degli ovociti. In queste cellule i cromosomi si rendono visibili al termine dell'auxocitosi e diventano sempre più evidenti con il procedere della spiralizzazione. Alcuni ovociti possiedono 6 bivalenti; al diplotene solo quattro di essi mostrano un chiasma; in metafase i bivalenti sono lunghi da $2 \mu\text{m}$ a $2,5 \mu\text{m}$ e risultano costituiti da cromatidi di forma ovale ben separati tra loro, disposti a livello del piano equatoriale, ma orientati secondo le linee del fuso (fig. 1, 4). Un secondo tipo di ovociti presenta 18 cromosomi che nelle profasi osservate sono sempre risultati costituiti da due soli cromatidi,

mancando ogni traccia di appaiamento; al termine della spiralizzazione questi univalenti misurano da $1,5 \mu\text{m}$ a $2 \mu\text{m}$ e non si dispongono regolarmente in piastra, ma a volte rimangono casualmente orientati in una vescicola allungata ed a volte nella stessa tendono a distribuirsi in due gruppi polari (fig. 1, 5). Infine vi è un terzo tipo di ovociti che possiede 24 univalenti (anche in questo caso la mancanza di appaiamento fin dalla profase è evidente); le dimensioni di questi cromosomi non differiscono da quelle dei cromosomi degli ovociti triploidi, ma a differenza di questi quelli sono disposti in una metafase quasi regolare (fig. 1, 6).

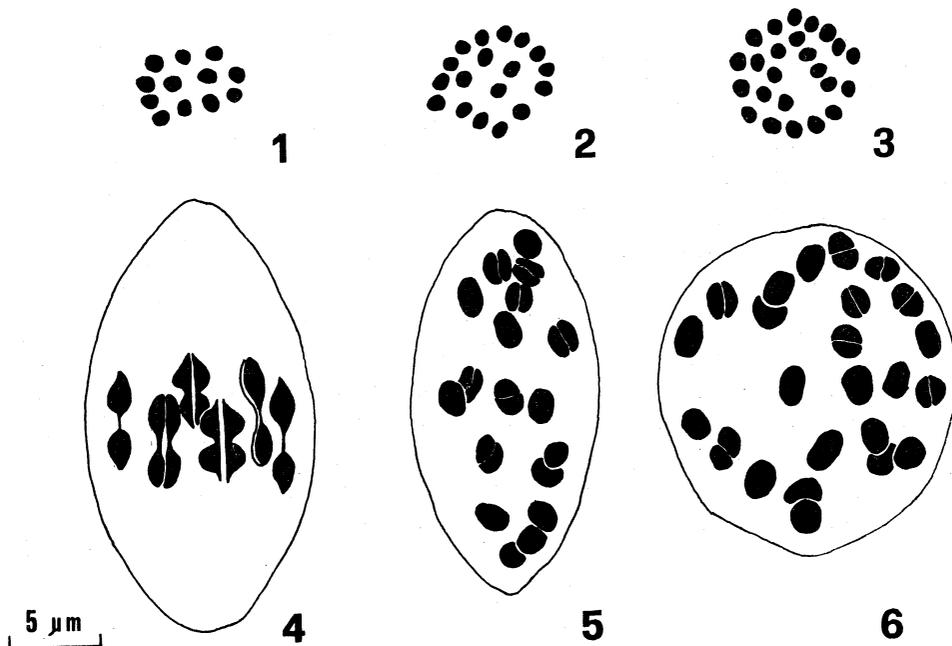


Fig. 1. — *M. hufelandi*: metafase mitotica diploide (1), triploide (2) e tetraploide (3); metafase di ovocita diploide in fuso (4), ovocita triploide al termine della spiralizzazione (5) e ovocita tetraploide in piastra (6).

Le osservazioni cariologiche su *M. hufelandi* della Valsesia portano dunque al riconoscimento di tre biotipi e precisamente un biotipo diploide ($2n = 12$) e due biotipi poliploidi ($3n = 18$ e $4n = 24$). Va sottolineato che il biotipo triploide presenta i medesimi quadri citologici osservati in *M. hufelandi* triploide del Trentino [3] e pertanto è da attribuire allo stesso biotipo. Il biotipo tetraploide, invece, si distingue da *M. hufelandi recens* tetraploide [1] sia per alcuni aspetti della maturazione degli ovociti, sia per la morfologia del guscio delle uova; esso quindi costituisce un nuovo biotipo.

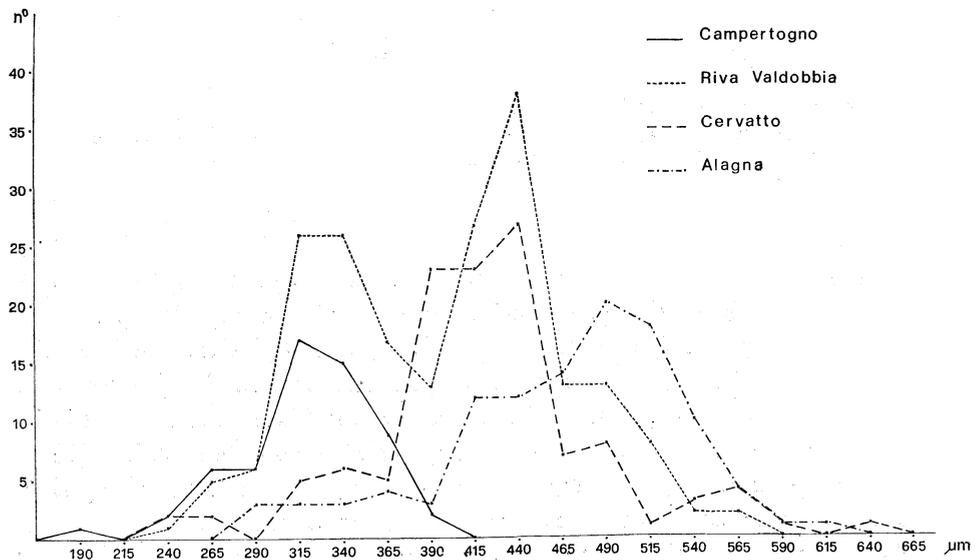
Gli esemplari diploidi, triploidi e tetraploidi sono variamente distribuiti nei diversi campioni di muschio, come mostra la Tabella II.

TABELLA II.

Località	Numero cromosomico	
	mitosi	ovociti
Campertogno	12	6
Cervatto	12; 18	6; 18
Riva Valdobbia	12; 18	6; 18; 2
Alagna	18; 24	18; 24

La mancanza di appaiamento in profase ed in metafase, comune a tutti gli ovociti degli animali triploidi e tetraploidi, dimostra che questi due biotipi attuano una partenogenesi di tipo ameiotico. Tale maturazione, essendo paragonabile ad una mitosi, non dovrebbe portare, tranne che nel caso di mutazioni, ad un cambiamento del patrimonio genetico rispetto al genitore; si verifica infatti che nel campione di Alagna, dove mancano i diploidi, i maschi sono assenti. Gli esemplari diploidi attuano invece una maturazione meiotica e, nei tre campioni, sui quattro in cui sono stati rinvenuti, sono sempre rappresentati sia da maschi che da femmine, per cui si deve supporre l'anfigonia.

Oltre all'analisi kariologica si è effettuato anche un accurato esame morfologico sia sugli animali che sulle loro uova. Gli animali raccolti nelle quattro località non presentano evidenti differenze qualitative nella struttura delle

Fig. 2. - Lunghezza delle femmine nelle quattro popolazioni valesiane di *M. hufelandi*.

parti sclerificate in relazione al diverso numero cromosomico. Si osserva invece una differenza quantitativa tra le varie popolazioni per quanto riguarda la lunghezza delle femmine. Nella fig. 2 tali femmine sono rappresentate riunite in classi di grandezza di $25 \mu\text{m}$ e suddivise per località. Sono state prese in considerazione solo le femmine in quanto non è da escludere un dimorfismo sessuale.

L'analisi della varianza, i cui risultati sono riportati nella Tabella III, dimostra che tra le varie popolazioni esistono differenze significative.

TABELLA III.

Località	Campertogno $m = 317 \pm 37 \mu\text{m}$	Riva Valdobbia $m = 396 \pm 70 \mu\text{m}$	Cervatto $m = 417 \pm 72 \mu\text{m}$
Alagna $m = 462 \pm 68 \mu\text{m}$	$F = 228,17$ $p < 0,01$	$F = 63,18$ $p < 0,01$	$F = 23,31$ $p < 0,01$
Cervatto	$F = 99,77$ $p < 0,01$	$F = 6,66$ $0,01 < p < 0,05$	
Riva Valdobbia	$F = 68,32$ $p < 0,01$		

La maggiore si riscontra tra la popolazione di Alagna e quella di Campertogno; questo dato deve essere collegato al fatto che proprio tra queste due popolazioni esiste la maggior differenza a livello del rapporto-sessi e dei biotipi (vedi Tabella I e II). La minore, comunque significativa, risulta invece tra i campioni di Riva Valdobbia e Cervatto, che sono in pratica costituiti dagli stessi biotipi; va infatti accennato che nel campione di Riva Valdobbia i tetraploidi sono stati accertati dall'analisi citologica di un unico esemplare; tenendo in considerazione i diversi valori del rapporto-sessi nelle due popolazioni, la significatività può essere spiegata da una diversa percentuale tra diploidi e triploidi.

Questi risultati confermano che nei Tardigradi la taglia somatica aumenta al crescere della ploidia [7, 8].

L'esame morfologico condotto sul guscio delle uova di *M. hufelandi* della Valsesia ha permesso di rilevare alcune differenze. Come si vede dalla Tabella IV la raccolta delle uova risulta limitata, poiché inizialmente, data l'uniformità degli animali, si è cercato di avere per ogni campione solo il necessario per la sicura determinazione delle specie. Va inoltre tenuto presente che nel campione di Campertogno le uova non sono state trovate, nonostante la nostra attenzione, per cui la loro assenza non deve essere imputata a trascuratezza nella raccolta.

Tutte le uova esaminate rispondono alle caratteristiche generali della specie; esse sono rivestite da un guscio che presenta superficialmente una reticolatura, nonchè delle ornamentazioni a forma di « portauovo capovolto », cioè costituite da una base tronco-conica con una estremità distale allargata a disco. Queste strutture però variano di aspetto e di dimensione e ci hanno permesso di classificare le uova in almeno due tipi diversi. Uova di tipo A, con appendici lunghe circa 11 μm , aventi disco e base dello stesso diametro (9 μm) (Tav. I, 1); uova di tipo B: la cui reticolatura appare più fitta, le appendici più tozze, lunghe circa 5 μm , con una base di 6 μm ed un disco apicale di diametro minore (4,5-5 μm), il cui bordo a volte sembra leggermente frastagliato (Tav. I, 2). Nella Tabella IV è rappresentata la distribuzione dei due tipi di uova nei vari campioni.

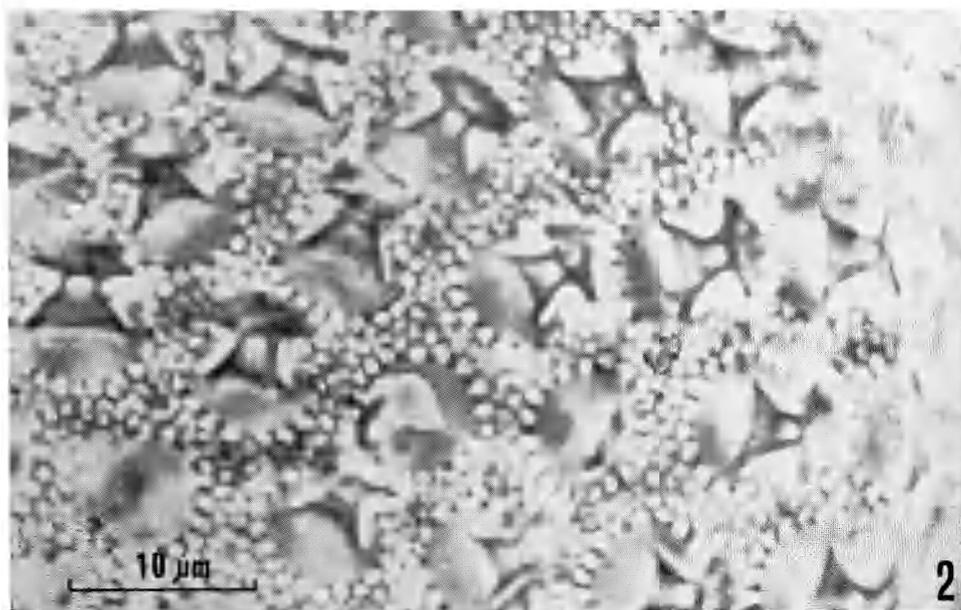
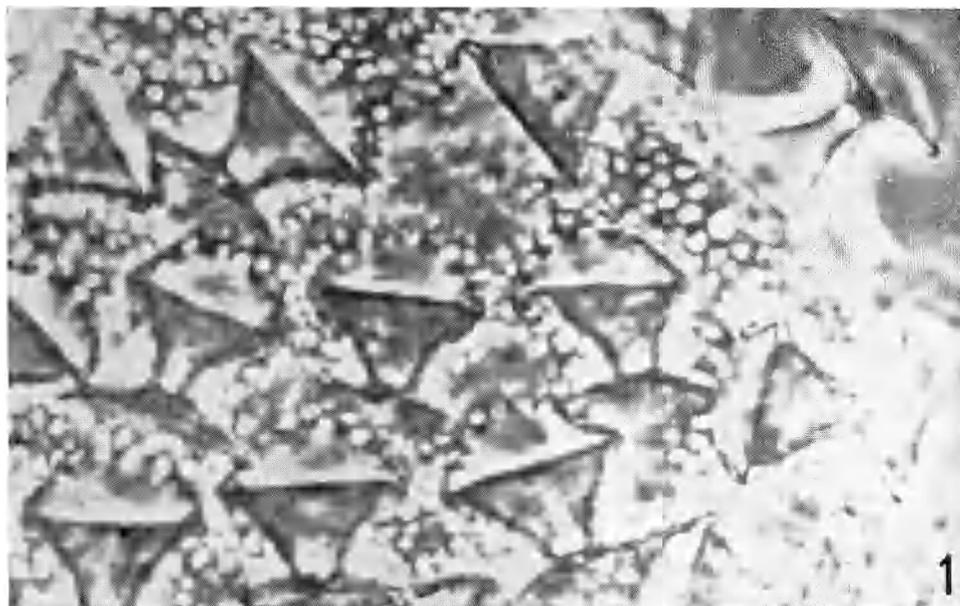
TABELLA IV.

Località	Uova tipo A	Uova tipo B
Campertogno	—	—
Cervatto	19	29
Riva Valdobbia	4	7
Alagna	—	26

Nel campione di Alagna sono state trovate uova simili al tipo B, che si differenziano però da queste per la maggior lunghezza delle appendici (circa 7 μm). Non essendo facile una loro sicura identificazione, si è preferito tralasciare la descrizione di un terzo tipo di uova.

L'analisi cariologica condotta su alcune uova deposte non ha dato risultati utili; rimangono pertanto in nostro possesso soltanto i dati sulla morfologia del guscio, dai quali è possibile unicamente avanzare delle ipotesi sulla relazione tra poliploidia e tipo di uovo. L'assenza di uova di tipo A nel campione dove mancano i diploidi fa supporre un collegamento tra questi dati. È comunque nostra intenzione approfondire il problema con mezzi più idonei e in relazione a popolazioni di altre località.

Il complesso dei risultati esposti in questa Nota dimostra che *M. hufelandi* della Valsesia, di cui sono state analizzate quattro popolazioni, presenta una notevole variabilità per quel che riguarda il rapporto-sessi, il numero cromosomico e le modalità di maturazione del gamete femminile, la taglia somatica e la morfologia delle uova. Tali differenze sono da imputare alla presenza di tre biotipi riproduttivamente isolati. Questi biotipi possono essere simpatici e poiché uno è bisessuato, mentre gli altri due sono unisessuati, ci si rende ragione, analogamente a *M. hufelandi* del Trentino [3], delle diffe-



M. hufelandi: uovo di tipo A (1) e uovo di tipo B (2).
(Contrasto di fase; le due foto allo stesso ingrandimento)

renze del rapporto-sessi. L'individuazione di un nuovo biotipo, quello tetraploide, porta ad un'ulteriore complicazione della specie *M. hufelandi*, che non può essere considerata come un'unica entità. Tale rinvenimento, inoltre, ribadisce che il fenomeno della partenogenesi dei Tardigradi non è occasionale. È nostra intenzione insistere in queste ricerche anche per verificare se i biotipi poliploidi di *M. hufelandi* derivino dai diploidi di un'unica specie, oppure da più specie tassonomicamente difficili da distinguere; comunque l'insorgenza della poliploidia dimostra l'instabilità della specie.

Tenendo presente che non è sempre possibile ottenere risultati cariológici utili, i dati sulla morfologia del guscio delle uova aprono una nuova via per l'individuazione di alcuni biotipi. Infatti, se da un lato non è ancora del tutto sicura l'attribuzione di un tipo di uova ad uno specifico biotipo, dall'altra è certa l'esistenza di più tipi di uova con differenze qualitative costanti (vedi anche Toftner e Coll. [6]). Questo nuovo mezzo di identificazione acquista maggior significato se si considera che i biotipi di una popolazione del Trentino di *M. hufelandi* sono diversamente distribuiti nello stesso areale in rapporto a condizioni ambientali [1, 3]. Anche se restano sconosciute le modalità di insorgenza della poliploidia nei Tardigradi, questo dato indica l'esistenza di particolari adattamenti dei biotipi poliploidi; non è da escludere che fattori ambientali influiscano sulla distribuzione dei biotipi di *M. hufelandi* anche in Valsesia.

BIBLIOGRAFIA

- [1] R. BERTOLANI (1975) - «Mem. Ist. Ital. Idrobiol.», 32 Suppl., 17-35.
- [2] R. BERTOLANI (1971) - «Rend. Acc. Naz. Lincei», ser. VIII, 50, 772-775.
- [3] R. BERTOLANI (1973) - «Rend. Acc. Naz. Lincei», ser. VIII, 54, 469-473.
- [4] G. RAMAZZOTTI (1962) - «Mem. Ist. Ital. Idrobiol.», 14, 1-595.
- [5] A. A. GRIGARICK, R. O. SCHUSTER e E. C. TOFTNER (1973) - «The Pan-Pacific Entomologist», 49, 258-263.
- [6] E. C. TOFTNER, A. A. GRIGARICK e R. O. SCHUSTER (1975) - «Mem. Ist. Ital. Idrobiol.», 32 Suppl., 393-411.
- [7] R. BERTOLANI (1971) - «Rend. Acc. Naz. Lincei», ser. VIII, 50, 487-489.
- [8] R. BERTOLANI (1973) - «Rend. Acc. Naz. Lincei», ser. VIII, 55, 571-574.