
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

LUCIANO BULLINI, GIUSEPPE NASCETTI, STEFANIA
CARRÈ, FINA RUMORE, ETTORE BIOCCA

Ricerche cariologiche ed elettroforetiche su *Parascaris univalens* e *Parascaris equorum*

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 65 (1978), n.3-4, p.
151–156.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1978_8_65_3-4_151_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/>

Genetica. — *Ricerche carilogiche ed elettroforetiche su Parascaris univalens e Parascaris equorum.* Nota di LUCIANO BULLINI (*), GIUSEPPE NASCETTI (**), STEFANIA CIAFRÈ (**), FINA RUMORE (*) e ETTORE BIOCCA (**), presentata (***) dai Soci G. MONTALENTI e G. RITA.

SUMMARY. — The karyotypes of the two sibling species *Parascaris equorum* and *P. univalens* are illustrated, as well as their chromosome morphology. The chromosomes are characterized by heteropycnotic extremities and the absence of a well-defined centromerical zone. Furthermore in *P. equorum* one chromosome pair appears distinctly longer than the other, which would exclude the evolution of this species by a simple process of tetraploidization; this is also ruled out by the electrophoretic data.

The electrophoretic study of 27 enzyme loci in the two species has shown: 1) only two of these loci (*Pgm* and *Est-1*) are polymorphic according to the 1% criterion; 2) 22 loci out of 27 have fixed alternative alleles in the two species (*Aldo*, *Est-2*, *Est-3*, *G-6-pdh*, *G-3-pdh*, α -*Gpdh*, *Idh-1*, *Idh-2*, *Ldh*, *Odh*, *6-Pgdh*, *Sdh*, *Xdh*, *Hk-1*, *Adk-1*, *Adk-2*, *Phi*, *Tpi*, *Got-1*, *Got-2*, *Me* and *Sod-1*); 3) the *Pgm* locus polymorphic in both species, presents the *Pgm*^{1.00} allele with a frequency of 95.07% in *P. univalens*, whilst in *P. equorum* the most common allele is *Pgm*^{1.10} with a frequency of 89.66; 4) the observed mean heterozygosity per locus is very low: 0.88% for *P. equorum* and 1.52% for *P. univalens*; 5) out of the 2238 specimens electrophoretically examined 2092 were identified as *P. univalens*, 127 as *P. equorum*, while 19 (1 male and 18 females) were hybrids; the hybrids were heterozygous at all loci fixed for alternative alleles in *P. univalens* and *P. equorum* and presented both the alleles characteristic of the two species; 6) in spite of the presence of natural hybrids electrophoretic data show no gene flow between the two species; 7) the genetic distance (*D*) between the two species, calculated with the Nei index, is 1.939 (genetic identity (*I*) = 0.144); such a high genetic distance was never before recorded for sibling species; it indicates that *P. equorum* and *P. univalens* are the product of a very ancient process of speciation which has affected a large part of the genome.

INTRODUZIONE

In una prima nota dedicata alla sistematica del genere *Parascaris* (Biocca *et al.* [4]) abbiamo dimostrato che i parassiti degli equini, finora attribuiti all'unica specie *Parascaris equorum* (Goeze), appartengono in realtà a due specie distinte, per le quali abbiamo proposto di utilizzare i nomi *P. equorum* (Goeze) e *P. univalens* (Hertwig). Le due specie possono essere identificate sia a livello carilogico (in *P. equorum* il cariotipo è $2n = 4$, mentre in *P. univalens* è $2n = 2$), sia mediante lo studio elettroforetico di vari sistemi gene-enzima. Inoltre le due entità, pur essendo specie gemelle, risultano identificabili, almeno negli adulti di sesso maschile, anche a livello morfologico; infatti in *P. equorum* gli spicoli presentano terminazione arrotondata,

(*) Istituto di Genetica, Facoltà di Scienze, Università di Roma.

(**) Istituto di Parassitologia, Facoltà di Medicina, Università di Roma.

(***) Nella seduta del 15 giugno 1978.

mentre in *P. univalens* hanno terminazione tronca (negli ibridi gli spicoli hanno caratteristiche intermedie).

Nel presente lavoro vengono esposti i risultati delle indagini citogenetiche e dello studio elettroforetico di 27 sistemi gene-enzima condotti su 2238 esemplari di *Parascaris* raccolti in cavalli ed asini provenienti da allevamenti italiani e di vari paesi dell'Europa centro-orientale. La sostanziale omogeneità dei risultati ottenuti consente di considerare, almeno ai fini del presente lavoro, sia gli individui di *P. equorum*, sia quelli di *P. univalens*, come appartenenti ad un'unica popolazione, indipendentemente dalla loro origine geografica.

INDAGINI CARIOLOGICHE

a) *Tecnica.*

Per l'esame citologico dei cromosomi è stata prelevata la parte prossimale delle gonadi sia maschili che femminili. Questo materiale è stato incubato per 4 ore in soluzione fisiologica (NaCl 0,7%) contenente colchicina 10^{-5} M. Successivamente il materiale è stato incubato per 10 minuti in soluzione ipotonica (citrate 0,5%), frammentato, fissato per 1 minuto in una soluzione di alcool metilico e acido acetico 1:1 e infine schiacciato in orceina acetica. I preparati così ottenuti, lutati con cera, hanno una durata media di 10 giorni e permettono quindi una facile analisi microscopica.

b) *Risultati.*

Cellule goniali in mitosi, sia maschili che femminili, di *P. univalens* e *P. equorum* sono state esaminate per lo studio del numero e della morfologia dei cromosomi. *P. univalens* presenta una coppia di cromosomi, *P. equorum* due coppie (Boveri [5], [6], [7], [8]; Hertwig [11]; Brauer [9]).

In *P. equorum* una coppia cromosomica appare chiaramente più lunga dell'altra (vedi tav. I c, d). Questo dato sembrerebbe escludere che l'evoluzione di *P. equorum* sia avvenuta per un semplice processo di tetraploidizzazione. Ciò risulta confermato dai risultati delle ricerche elettroforetiche sui sistemi gene-enzima studiati (vedi paragrafo seguente). Tuttavia solo ulteriori studi sulla struttura dei cromosomi, soprattutto con le tecniche di bandeggio, potranno chiarire l'evoluzione del cariotipo in queste due specie.

In ambedue le specie i cromosomi appaiono notevolmente allungati anche dopo trattamento con colchicina. Alle due estremità di ciascun cromosoma si osservano due grandi blocchi eteropicnotici, mentre la zona intermedia del cromosoma sembra costituita da una serie di cromomeri. Non si osserva una regione centromerica ben definita.

Queste osservazioni si accordano con l'ipotesi che tali cromosomi abbiano una natura multipla (Bonnievie [3]; Teh Ping Lin [16]). È noto, infatti, che in *Parascaris* i cromosomi subiscono un processo di frammentazione nella linea somatica e che gli elementi così formati possiedono le caratteristiche centromeriche e telomeriche dei normali cromosomi.

INDAGINI GENETICHE SU ENZIMI

a) *Tecniche.*

Le ricerche sui sistemi gene-enzima sono state condotte mediante elettroforesi su gel d'amido. Sono stati studiati i seguenti enzimi: aldolasi (ALDO), esterasi (EST), glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G-6-PDH), gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (G-3-PDH), α -glicerofosfato deidrogenasi (α -GPDH), isocitrico deidrogenasi (IDH), lattato deidrogenasi (LDH), malato deidrogenasi (MDH), ottanolo deidrogenasi (ODH), 6-fosfogluconato deidrogenasi (6-PGDH), sorbitolo deidrogenasi (SDH), xantino deidrogenasi (XDH), fosfoglucomutasi (PGM), esochinasi (HK), adenilatochinasi (ADK), fosfoesoisomerasi (PHI), triosofosfatoisomerasi (TPI), glutammato ossalacetico transaminasi (GOT), enzima malico (ME) e superossido dismutasi (SOD).

Le tecniche impiegate sono, con piccole modifiche, quelle descritte da Shaw e Koen [15], Brewer [10], Selander *et al.* [14] e Ayala *et al.* [1].

Il tessuto utilizzato per lo studio elettroforetico degli enzimi è stato il sacco muscolo-cutaneo, del quale venivano omogenati meccanicamente porzioni della lunghezza di cm 0,5 circa.

b) *Risultati.*

Lo studio elettroforetico dei 27 loci enzimatici è stato condotto su 102-2092 individui in *Parascaris univalens* e su 30-127 individui in *P. equorum* (vedi tabelle I, II e III). Esso ha mostrato che solo il locus *Pgm* risulta polimorfico (criterio dell'1%) in entrambe le specie, mentre il locus *Est-1* è risultato polimorfico solo in *P. univalens*. Gli altri 25 loci non presentano polimorfismo in nessuna delle due specie (tabella I). Di questi ben 22 (*Aldo*, *Est-2*, *Est-3*, *G-6-pdh*, *G-3-pdh*, α -*Gpdh*, *Idh-1*, *Idh-2*, *Ldh*, *Odh*, *6-Pgdh*, *Sdh*, *Xdh*, *Hk-1*, *Adk-1*, *Adk-2*, *Phi*, *Tpi*, *Got-1*, *Got-2*, *Me* e *Sod-1*) risultano fissati nelle due specie per alleli alternativi.

Varianti rari (frequenza inferiore all'1%) sono stati osservati in *P. univalens* nei loci *Est-3* (*Est-3*⁹⁶ e *Est-3*^{1.05}), *Mdh-2* (*Mdh-2*^{1.07}), *Phi* (*Phi*⁸⁵, *Phi*⁸⁸, *Phi*⁹³ e *Phi*^{1.06}) e *Got-1* (*Got-1*⁹² e *Got-1*^{1.12}) e in *P. equorum* nei loci *Est-3* (*Est-3*⁸⁸ e *Est-3*⁹⁶) e α -*Gpdh* (α -*Gpdh*^{1.05}).

Il locus *Pgm* presenta in *P. univalens* due alleli, *Pgm*^{1.00} e *Pgm*^{1.05} che hanno rispettivamente frequenze del 95,07% e del 4,93%; in *P. equorum* è presente l'allele *Pgm*^{1.05} (frequenza 10,34%), ma l'allele di gran lunga più comune è *Pgm*^{1.10} (non osservato, almeno finora, in *P. univalens*) la cui frequenza è 89,66% (vedi tabella II); la percentuale di eterozigoti osservata è per questo locus del 9,47% (eterozigoti attesi 9,37%) in *P. univalens* e del 18,39% (attesi 18,54%) in *P. equorum*.

Il locus *Est-1* presenta in *P. univalens* l'allele *Est-1*^{1.00} con frequenza dell'83,81% e l'allele *Est-1*⁹⁷ con frequenza del 16,19%; in *P. equorum* è stato finora osservato il solo allele *Est-1*^{1.00} (vedi tabella 3). La percentuale di eterozigoti osservati in *P. univalens* è per quest'ultimo locus del 27,05%, quella degli eterozigoti attesi del 27,14%.

TABELLA I.

Loci non polimorfici (criterio dell'1%) in P. univalens e P. equorum.
(I loci fissati nelle due specie per alleli alternativi sono indicati con un asterisco)

LOCI	<i>Parascaris univalens</i>		<i>Parascaris equorum</i>	
	N. individui saggiati	Allele	N. individui saggiati	Allele
Aldolasi (<i>Aldo</i>) *	115	1.00	30	.90
Esterasi-2 (<i>Est-2</i>) *	2092	1.00	127	.98
Esterasi-3 (<i>Est-3</i>) *	2092	1.00	127	.93
Glucosio-6-fosfato deidrogenasi (<i>G-6-pdh</i>) *	145	1.00	32	1.08
Glicer aldeide-3-fosfato deidrogenasi (<i>G-3-pdh</i>) *	210	1.00	40	.94
α -Glicerofosfato deidrogenasi (α - <i>Gpdh</i>) *	449	1.00	75	.92
Isocitrico deidrogenasi-1 (<i>Idh-1</i>) *	220	1.00	40	.90
Isocitrico deidrogenasi-2 (<i>Idh-2</i>) *	220	1.00	40	1.02
Lattato deidrogenasi (<i>Ldh</i>) *	1227	1.00	107	.93
Malato deidrogenasi-1 (<i>Mdh-1</i>)	481	1.00	65	1.00
Malato deidrogenasi-2 (<i>Mdh-2</i>)	481	1.00	65	1.00
Ottanolo deidrogenasi (<i>Odh</i>) *	186	1.00	35	.90
6-Fosfogluconato deidrogenasi (<i>6-Pgdh</i>) *	182	1.00	39	1.10
Sorbitolo deidrogenasi (<i>Sdh</i>) *	1227	1.00	107	.95
Xantino deidrogenasi (<i>Xdh</i>) *	131	1.00	36	.90
Esochinasi-1 (<i>Hk-1</i>) *	230	1.00	45	.96
Adenilatochinasi-1 (<i>Adk-1</i>) *	1227	1.00	107	.95
Adenilatochinasi-2 (<i>Adk-2</i>) *	1227	1.00	107	.92
Fosfoesoisomerasi (<i>Phi</i>) *	2092	1.00	127	.93
Triosofosfatoisomerasi (<i>Tpi</i>) *	102	1.00	32	.96
Glutamato ossalacetico transaminasi-1 (<i>Got-1</i>) *	169	1.00	51	1.03
Glutamato ossalacetico transaminasi-2 (<i>Got-2</i>) *	169	1.00	51	1.08
Enzima malico (<i>Me</i>) *	241	1.00	44	1.09
Superossido dismutasi-1 (<i>Sod-1</i>) *	385	1.00	75	.90
Superossido dismutasi-2 (<i>Sod-2</i>)	385	1.00	75	1.00

TABELLA II.

Frequenze alleliche per il locus fosfoglucomutasi (Pgm) in Pascaris univalens e P. equorum.

SPECIE	N. individui saggiati	Alleli <i>Pgm</i>			% eterozigoti osservati
		1.00	1.05	1.10	
<i>P. univalens</i> . .	1035	95,07	4,93	—	9,47
<i>P. equorum</i> . .	87	—	10,34	89,66	18,39

TABELLA III.

Frequenze alleliche per il locus esterasi-I (Est-I) in Parascaris univalens e P. equorum.

SPECIE	N. individui saggiati	Alleli <i>Est-I</i>		% eterozigoti osservati
		.97	1.00	
<i>P. univalens</i>	525	16,19	83,81	27,05
<i>P. equorum</i>	40	—	100,00	—

L'eterozigosi media per locus osservata è risultata molto bassa: 0,88% in *P. equorum* e 1,52% in *P. univalens*. Il fatto che in *P. equorum* il valore di eterozigosi media sia risultato inferiore a quello di *P. univalens* è probabilmente dovuto al relativamente basso numero di individui di *P. equorum* da noi saggiati (per vari loci meno di cento individui).

Sui 2238 esemplari di *Parascaris* studiati elettroforeticamente 2092 sono risultati appartenere a *P. univalens*, 127 a *P. equorum*, mentre 19 (1 maschio e 18 femmine) erano ibridi. Gli ibridi sono risultati eterozigoti in tutti i loci fissati per alleli alternativi in *P. univalens* e *P. equorum* e presentavano entrambi gli alleli caratteristici delle due specie. Nonostante la presenza di ibridi naturali i dati elettroforetici indicano che tra le due specie non vi è flusso genico.

La distanza genetica (D) tra *P. univalens* e *P. equorum*, calcolata con l'indice di Nei [12], è risultata molto elevata: 1,939 (identità genetica (I) = 0,144). Valori simili sono stati, almeno finora, osservati solo tra specie morfologicamente molto ben differenziate, appartenenti di norma a generi distinti (Ayala [2]). Ciò indica che il processo di speciazione che ha dato origine a *P. univalens* e *P. equorum* è notevolmente antico (circa dieci milioni di anni, applicando la formula $t = 5 \times 10^6 D$, proposta da Nei [13]) e ha implicato cambiamenti molto profondi, non solo a livello cromosomico, ma anche

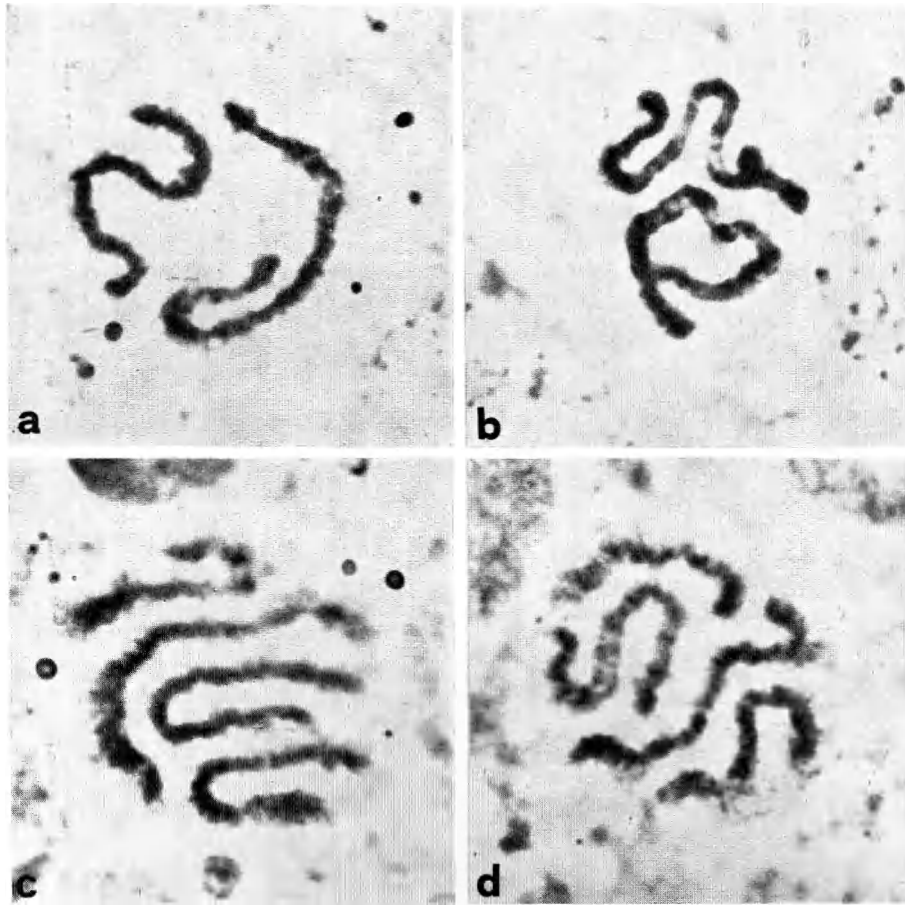
a livello di geni strutturali. I dati elettroforetici confermano, inoltre, che l'evoluzione di *P. equorum* non è avvenuta attraverso un semplice processo di tetraploidizzazione a partire da *P. univalens*, in accordo con le osservazioni cariologiche precedentemente riportate.

Ringraziamenti. Gli autori esprimono la loro gratitudine al Prof. O. Massi, dirigente del servizio veterinario del Comune di Roma, per aver messo a disposizione parte del materiale utilizzato nel presente lavoro. Ringraziano, inoltre, i Prof.ri M. Gatti e S. Pimpinelli per gli utili suggerimenti relativi allo studio cariologico e la Dott.ssa M. R. Cianchi per la collaborazione alle indagini elettroforetiche.

Le ricerche sono state realizzate grazie a contributi del Consiglio Nazionale delle Ricerche e del Ministero della Pubblica Istruzione.

LAVORI CITATI

- [1] F. J. AYALA, J. R. POWELL, M. L. TRACEY, C. A. MOURÃO e S. PEREZ-SALAS (1972) - *Enzyme variability in the Drosophila willistoni group*. IV. *Genic variation in natural populations of Drosophila willistoni*. «Genetics», 70, 113-139.
- [2] F. J. AYALA (1975) - *Genetic differentiation during the speciation process*. «Evolutionary Biology», 8, 1-78.
- [3] K. BONNEVIE (1912) - *Über die Struktur und Genese der Ascaris Chromosomen*. «Arch. Zellforsch.», 9, 433-457.
- [4] E. BIOCICA, G. NASCETTI, A. IORI, R. COSTANTINI e L. BULLINI (1978) - *Descrizione di Parascaris univalens, parassita degli equini e suo differenziamento da Parascaris equorum*, «Acc. Naz. Lincei, Rend. Cl. Sc. Fis., Mat. e Nat.», 65, 133-140.
- [5] Th. BOVERI (1887) - *Über Differenzierung der Zellkerne während der Furchung des Eies von Ascaris megaloccephala*. «Anat. Anz.», 2, 688-693.
- [6] Th. BOVERI (1888) - «Zellenstudien», 2, Fischer. Jena.
- [7] Th. BOVERI (1892) - *Über die Entstehung des Gegensatzes zwischen den Geschlechtszellen und den somatischen Zellen bei Ascaris megaloccephala*, «S. B. Ges. Morph. Physiol. Münch.», 8, 114-125.
- [8] Th. BOVERI (1909) - *Die Blastomerenkerne von Ascaris megaloccephala und die Theorie der Chromosomenindividualität*. «Arch. Zellforsch.», 5, 181-268.
- [9] A. BRAUER (1893) - *Zur Kenntniss der Spermatogenese von Ascaris*. «Arch. mikr. Anat.», 42, 153-213.
- [10] G. J. BREWER (1970) - *An Introduction to Isozyme Techniques*. Academic Press, New York.
- [11] O. HERTWIG (1890) - *Vergleich der Ei- und Samenbildung bei Nematoden. Eine Grundlage für cellulare Streitfragen*. «Arch. mikr. Anat.», 36, 1-138.
- [12] M. NEI (1972) - *Genetic distance between populations*. «Amer. Natur.», 106, 283-292.
- [13] M. NEI (1975) - *Molecular Populations Genetics and Evolution*, North-Holland, American Elsevier, Amsterdam-New York.
- [14] R. K. SELANDER, M. H. SMITH, S. Y. YANG, W. E. JOHNSON e J. B. GENTRY (1971) - *Biochemical polymorphism in the genus Peromyscus*. I. *Variation of the old-field mouse (Peromyscus polionotus)*. Studies in Genet., Univ. Texas publ. N. 7103, 49-90.
- [15] C. R. SHAW e A.L. KOEN (1968) - *Starch gel zone electrophoresis of enzymes*. In: *Chromatographic and Electrophoretic Techniques* Vol. 2, 2nd ed., I. Smith e J. Wiley editors, New York.
- [16] TEH PING LIN (1954) - *The chromosomal cycle in Parascaris equorum (Ascaris megaloccephala): oogenesis and diminution*. «Chromosoma», 6, 175-198.



Metafasi di cellule goniali in *Parascaris univalens* (a, maschio; b, femmina) e *Parascaris equorum* (c, femmina; d, femmina). Colorazione con orceina acetica. Si notino le estremità eteropicnotiche dei cromosomi e l'assenza di una regione centromerica ben distinta. In *P. equorum* una delle due coppie di cromosomi appare più lunga rispetto all'altra.

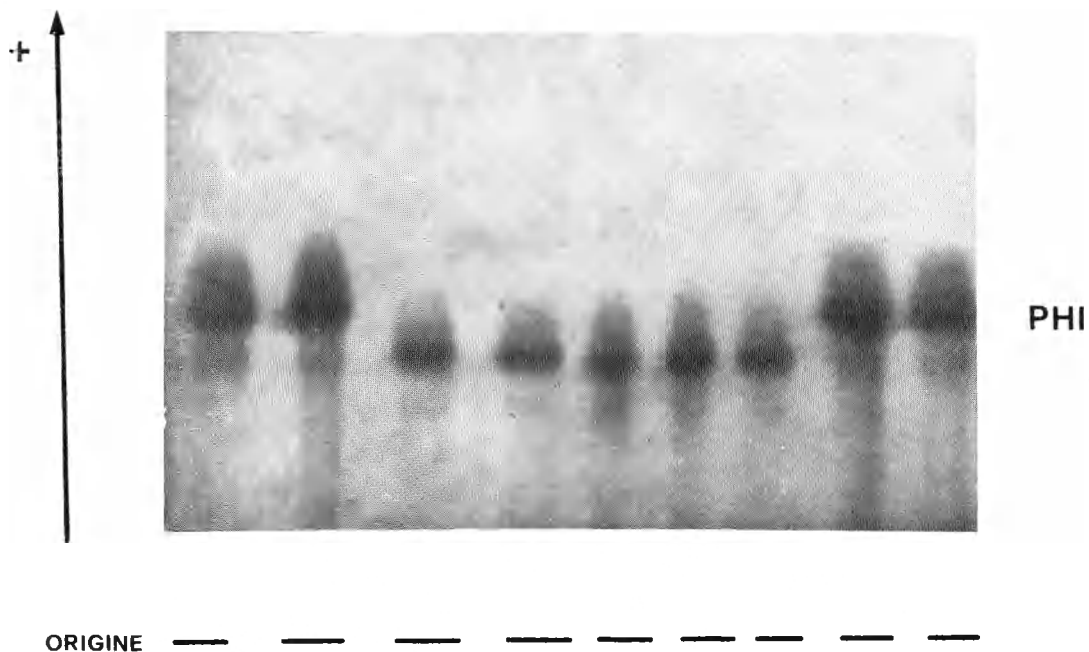


Fig. 1. - Zimogramma della fosfoesosoisomerasi (PHI) in *Parascaris univalens* (i primi due e gli ultimi due nella foto) e *P. equorum* (i cinque centrali).

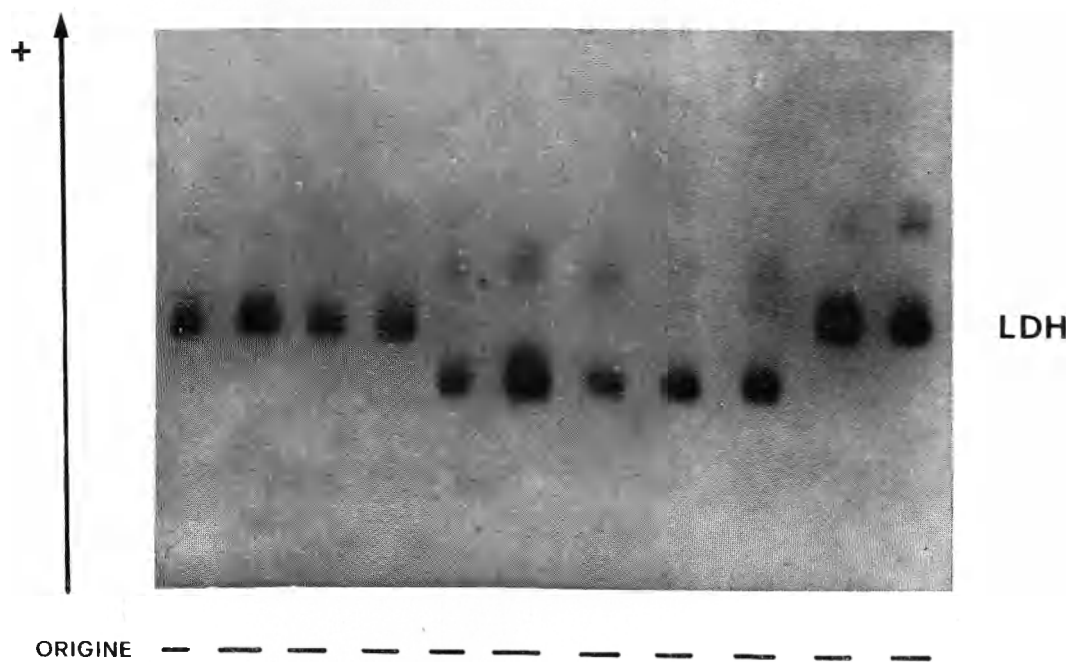


Fig. 2. - Zimogramma della lattato deidrogenasi (LDH) in *Parascaris univalens* (i primi quattro e gli ultimi due nella foto) e *P. equorum* (i cinque centrali).

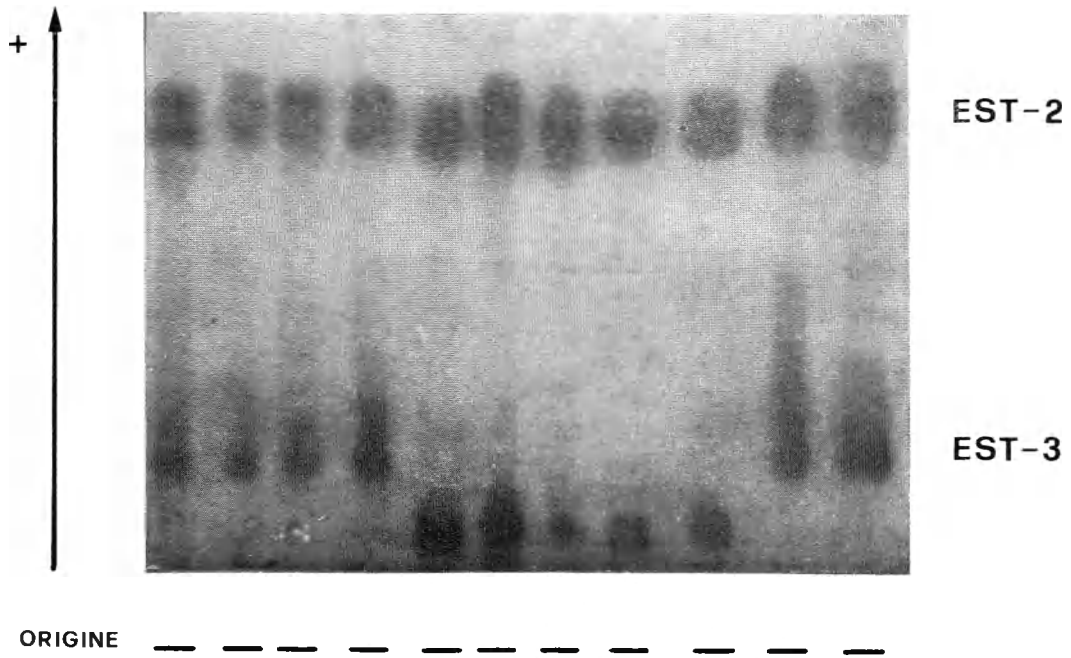


Fig. 3. - Zimogramma dell'esterasi-2 (EST-2) e dell'esterasi-3 (EST-3) in *Parascaris univalens* (i primi quattro e gli ultimi due nella foto) e *P. equorum* (i cinque centrali).

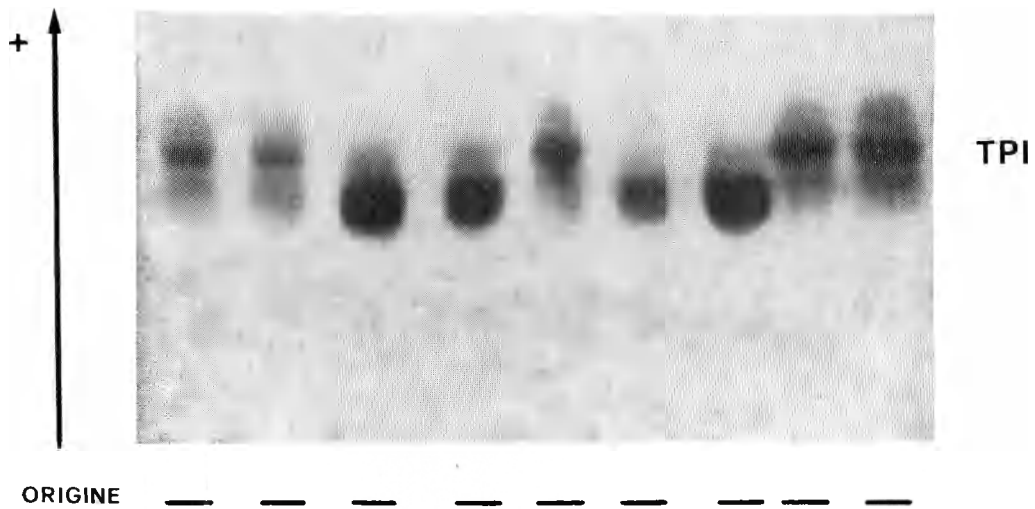


Fig. 4. - Zimogramma della triosofosfatoisomerasi (TPI) in *Parascaris univalens* (i primi due, il quinto e gli ultimi due) e *P. equorum* (il terzo, il quarto, il sesto e il settimo).