

Zeitschrift: Jahrbuch der Schweizerischen Naturforschenden Gesellschaft.
Wissenschaftlicher und administrativer Teil = Annuaire de la Société
Helvétique des Sciences Naturelles. Partie scientifique et administrative

Herausgeber: Schweizerische Naturforschende Gesellschaft

Band: 160 (1980)

Teilband: Wissenschaftlicher Teil : Wirbeltierzytogenetik = Partie scientifique :
cytogénétique des vertébrés = Scientific part : cytogenetics of
vertebrates

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. [Mehr erfahren](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. [En savoir plus](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. [Find out more](#)

Download PDF: 06.01.2026

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Die 1815 gegründete Schweizerische Naturforschende Gesellschaft ist die älteste wissenschaftliche Dachgesellschaft der Schweiz. Ihr Ziel ist die Förderung und Entwicklung der exakten und Naturwissenschaften und deren Vertretung in der Öffentlichkeit. Den intensiven Gedankenaustausch zwischen Wissenschaftlern verschiedener Fachrichtungen fördert die SNG, indem sie Symposien durchführt oder unterstützt und publiziert. Das Jahrbuch, wissenschaftlicher Teil, ist die Fortsetzung der seit 1819 erschienenen Verhandlungen der Schweizerischen Naturforschenden Gesellschaft.

Fondée en 1815, la Société helvétique des sciences naturelles est la plus ancienne organisation faîtière scientifique du pays. Elle a pour but l'encouragement et le développement des sciences exactes et naturelles, leur compréhension auprès du public et l'intensification des échanges entre scientifiques de diverses disciplines. Elle organise et soutient des symposia et en publie les actes. L'Annuaire, partie scientifique, remplace les Actes de la Société helvétique des sciences naturelles, publiés depuis 1819.

Wirbeltierzytogenetik

**Cytogénétique
des vertébrés**

**Cytogenetics of
Vertebrates**

für die SNG herausgegeben von
édité pour la SHSN par

Hansjakob Müller

1980
Birkhäuser Verlag
Basel · Boston · Stuttgart

Die vorliegende Publikation ist urheberrechtlich geschützt.
Alle Rechte, insbesondere das der Übersetzung in andere Sprachen,
vorbehalten. Kein Teil dieses Buches darf ohne schriftliche
Genehmigung des Herausgebers in irgendeiner Form – durch Fotokopie,
Mikrofilm oder andere Verfahren – reproduziert oder in eine
von Maschinen, insbesondere Datenverarbeitungsanlagen,
verwendbare Sprache übertragen werden.

© 1981 Schweizerische Naturforschende Gesellschaft Bern
Printed in Switzerland by Birkhäuser AG, Graphisches Unternehmen, Basel
ISSN 0252/2969

Symposium zu Ehren von Prof. Dr. Robert Matthey, Pully
Symposium en hommage au prof. dr Robert Matthey, Pully



(Photo Prof. Dr. P.E. Pilet)

Jahrbuch der SNG/Annuaire de la SHSN

1978

Gletscher und Klima/Glacier et climat
1981. 312 Seiten/pages. Broschur/broché

1979

Méthode et responsabilité/Methode und Verantwortung
1981. 112 pages/Seiten. Broché/Broschur

1980, Fasc. 1

Das Bewegungsverhalten von Krebszellen/
Winterthurer Naturforscher und Techniker vor 1850/
Die Relevanz von Lysimetern/
Elektrochemie und verwandte Probleme
1982. 138 Seiten/pages. Broschur/broché

1980, Fasc. 2

Osteosynthese und Endoprothese/
Ostéosynthèse et Endoprothèse
1984. 197 Seiten/pages. Broschur/broché

o/ 1980, Fasc. 3

Wirbeltierzytogenetik/Cytogénétique des vertébrés/
Cytogenetics of Vertebrates
1981. 86 Seiten/pages. Broschur/broché

1981

Vom Ursprung der Dinge/
De l'origine des choses
1983. 160 Seiten/pages. Broschur/broché

1982, Fasc. 2

Stadtdynamik in der Schweiz/
La dynamique urbaine en Suisse
1983. 109 Seiten/pages. Broschur/broché

**WIRBELTIER-
ZYTOGENETIK**

**CYTOGENETIQUE
DES VERTEBRES**

**CYTOGENETICS
OF VERTEBRATES**

Birkhäuser Verlag

Jahrbuch der Schweizerischen Naturforschenden
Gesellschaft, wissenschaftlicher Teil
Annuaire de la Société Helvétique des Sciences
Naturelles, partie scientifique

1980/3

**+SNG
SHSN**

Vorwort

Professor Dr. Robert Matthey gehört zu den Pionieren der Zytogenetik; er ist Begründer der Zytotaxonomie. Sein 1949 erschienenes Buch «Les chromosomes de vertébrés» wurde zum Standardwerk dieser Wissenschaft. Der von Matthey vorgeschlagene Begriff «nombre fondamental» (NF), der zur Erklärung der Variation der Chromosomenzahl durch zentrische Fusionen akrozentrischer Chromosomen bei verwandten Tierarten dient, hat sich in der genetischen Nomenklatur eingebürgert. Die Schweizerischen Gesellschaften für Zoologie und Genetik freuten sich daher, zu Ehren ihres verdienten Mitgliedes und Ehrenmitgliedes, das 1980 seinen 80. Geburtstag feierte, ein Symposium über «Moderne Aspekte der Wirbeltierzytogenetik» veranstalten zu können. Es fand im Rahmen der 160. Jahresversammlung der Schweizerischen Naturforschenden Gesellschaft am 18. Oktober 1980 in Winterthur statt. Sämtliche Beiträge sind in diesem Jahrbuch wiedergegeben. Sie möchten dem Genetiker und Zoologen einen raschen Zugang zu aktuellen Fragestellungen der zytogenetischen Forschung ermöglichen und sollten als Anregung zur Fortsetzung der zytogenetischen Forschung in unserem Lande dienen.

Unser Dank gilt den Referenten, die durch ihre Beiträge zum hohen wissenschaftlichen Niveau des Symposiums beitrugen. Ferner sind wir Herrn Professor Dr. P. Sträuli, Jahrespräsident der Schweizerischen Naturforschenden Gesellschaft, und seinen Mitarbeitern, dem Sekretariat der Schweizerischen Naturforschenden Gesellschaft in Bern und dem Birkhäuser Verlag für ihre Unterstützung bei der Durchführung des Symposiums und der Herausgabe des vorliegenden Sammelbandes dankbar. Herr Professor Dr. Pierre Tardent, Präsident der Schweizerischen Zoologischen Gesellschaft, Zürich, und Herr Professor Dr. Peter Vogel, Lausanne, haben sich in allen Phasen der Planung und Durchführung für das Gelingen des Symposiums eingesetzt.

Basel, Juni 1981

Hansjakob Müller
Präsident der
Schweizerischen Gesellschaft
für Genetik

Index

<i>P. Vogel (Université de Lausanne)</i> Hommage au professeur Robert Matthey	1
<i>M. Schmid (University of Göttingen)</i> Chromosome Evolution in Amphibia	4
<i>H. R. Kobel (Universität Genf)</i> Polyploide, haploide, aneuploide <i>Xenopus</i>	28
<i>W. Sachsse (Universität Mainz)</i> Karyologische Entwicklungen in der Klasse Reptilia	31
<i>U. Müller (Universität Freiburg i. Br.)</i> Die gonadendifferenzierende Funktion von H-Y Antigen während der Vertebratenevolution	39
<i>M. Jotterand-Bellomo (Université de Lausanne)</i> La formule chromosomique de <i>Mus setulosus</i> (Leggada)	44
<i>B. Dutrillaux, J. Couturier, E. Viegas-Péquignot (Ecole de Médecine Paris)</i> Evolution chromosomique chez les primates	58
<i>G. Stranzinger (Institut für Tierproduktion ETH Zürich)</i> Zytogenetik im Dienste der Nutztierzucht	68
Sachwortregister/Index des matières/Subject Index	80

Hommage au professeur Robert Matthey

Peter Vogel

Cher et honoré Collègue,
Monsieur le Président de la Société suisse de
génétique,
Monsieur le Président de la Société suisse de
zoologie,
Mesdames, Messieurs,

Il est impossible d'évoquer la progression des connaissances en cytogénétique sans prononcer le nom de Robert Matthey. A l'occasion unique d'un symposium sur la cytogénétique organisé en Suisse, nous nous devons de réserver au professeur Matthey, Doyen de la cytogénétique dans notre pays, une place d'honneur. De plus, le fait que Robert Matthey, né le 21 juillet 1900, a fêté ses quatre-vingt ans, est un motif supplémentaire, pour nos deux sociétés, de dédier leur symposium à ce savant. Qu'il me soit dès lors permis, avant de rappeler son œuvre, de procéder à une brève rétrospective.

J'aimerais tout d'abord parler de sa personnalité qui a marqué l'Université de Lausanne. Je n'ai pas eu le privilège de suivre son enseignement brillant qui a déterminé l'orientation de nombreux chercheurs et fasciné les biologistes lausannois, dont une quarantaine de volées d'étudiants en médecine et en sciences. Ceux qui ont eu le bonheur d'en être les auditeurs se souviennent de cours où la clarté, la rigueur et l'esprit de synthèse étaient heureusement servis par un talent de dessinateur et un sens de l'humour constamment présent.

Une grande force de persuasion, mais aussi, parfois, une franchise déconcertante ont caractérisé ses conférences publiques: la responsabilité des scientifiques et des médecins, face aux grands problèmes suscité par l'évolution humaine, particulièrement par la surpopulation, était un sujet qui inquiétait profondément le savant et l'humaniste.

Si la culture générale du professeur Matthey est très étendue, son activité scientifique s'est progressivement limitée au domaine de la cytogénétique. Peut-être ceci a-t-il pu dérouter certains élèves orientés par leur maître

vers les sujets chromosomiques. Mais justement, cette spécialisation était nécessaire pour assurer un rendement maximum à un institut pauvrement doté mais qui a pu se maintenir au niveau international.

La carrière professionnelle de Robert Matthey peut se résumer ainsi: Etudes de biologie à la Faculté des sciences de l'Université de Lausanne, couronnées en 1924 par un doctorat sous la direction du Professeur Galli-Valerio. Puis des recherches scientifiques sous la direction stimulante du Professeur Guyénot à l'Université de Genève. Dès 1929, Robert Matthey assure une charge de cours à l'Université de Lausanne, où il est nommé en 1931, professeur extraordinaire et directeur du «Laboratoire de zoologie et d'anatomie comparée», qu'il dirigera durant 40 ans. En 1938, il est promu professeur ordinaire. Mais il participe aussi activement à la vie universitaire: à deux reprises, il assume les charges de doyen, et de 1958 à 1960, il est recteur de l'Université de Lausanne. En 1970 enfin, il accède à l'honorariat et remet la direction de son institut aux mains de son successeur.

La compétence professionnelle de Robert Matthey s'exprime entre autres par sa collaboration à plusieurs périodiques scientifiques: il est co-fondateur de la revue «Experientia» et de «Scienca genetica». De plus, il est co-éditeur de «Cytologia» et collaborateur actif de «Caryologia» et «Mammalia». Les honneurs qui lui sont conférés témoignent de sa réputation en Suisse et à l'étranger: en 1945, le Prix Marcel-Benoist, en 1952, le grade de docteur *honoris causa* de l'Université de Rennes et une année plus tard, celui de l'Université de Genève.

Ayant rapidement retracé les étapes de sa carrière professionnelle, mon intention, dans le cadre de ce symposium sur les aspects modernes de la cytogénétique des Vertébrés, est de rappeler l'œuvre scientifique de Robert Matthey qui, comme Hsu (1979) l'a montré dans son livre, a sensiblement influencé l'histoire de la cytogénétique dans la phase initiale. Mais en tant que mammalo-

giste et écologiste, je tiens à souligner surtout l'importance des travaux de la période postérieure à 1960.

Comme tant de vocations zoologiques, celle de Robert Matthey est née de son intérêt pour l'entomologie. Néanmoins, les premières publications résultant de ses travaux à Genève concernent des transplantations de l'œil chez les Amphibiens et la régénération chez les Reptiles. Puis suivent des études sur la spermatogenèse chez les Lézards et les Vipères. Nous nous trouvons à l'origine d'une longue suite de travaux consacrés aux chromosomes, ces porteurs des gènes dont ils assurent la transmission. A cette époque, les techniques utilisées manquaient de précision et laissaient trop de champ à l'interprétation: rappelons que le nombre de chromosomes chez l'homme fut estimé déjà par Winiwarter en 1912, mais ce n'est qu'en 1956 que Tjio et Levan déterminèrent le chiffre exact de 46. Le succès des 20 premières années de recherche de Robert Matthey s'explique par la qualité de ses préparations soumises à une autocritique sévère. Il ne craignait d'ailleurs pas de critiquer certains cytologistes auxquels il reprochait leurs images qui étaient: «suffisamment imprécises pour qu'il soit possible de les faire entrer dans n'importe quelle conception théorique».

A côté d'investigations sur la parthénogenèse des Orthoptères et d'autres Insectes, les Reptiles suscitèrent de bonne heure son attention. Une comparaison entre de nombreux caryotypes révèle que les mécanismes mis en évidence par Robertson en 1916 chez les Insectes, notamment la fusion de deux chromosomes acrocentriques ou la fission d'un chromosome métacentrique, étaient généralement en action chez les Reptiles et permettaient d'expliquer la variation du nombre de chromosomes, tout en laissant le nombre de bras inchangé. Matthey désigne ce dernier chiffre par «nombre fondamental» (NF), notion qui, introduite par lui en 1945, est entrée dans le langage scientifique international.

Ces premiers résultats déterminent la suite de son programme: analyse de caryotypes à l'intérieur d'un groupe systématique, interprétation des différences en tant que conséquence d'un processus de remaniement et recherche de règles dans l'évolution des caryotypes. Un bilan critique de toutes les

connaissances de l'époque fut établi par lui en 1949 et publié sous la forme d'un livre: «Les chromosomes des Vertébrés». Permettez-moi, pour illustrer son importance, de citer Chiarelli et Capanna, les éditeurs du livre «Cytotaxonomy and vertebrate Evolution», dont la dédicace rend hommage à Robert Matthey: «For all of us who begun to deal with the same subject around 1950, Matthey's book became the most reliable guide. We do not claim here to have attained further progress: no doubt information on vertebrate caryology has increased at a tremendous rate, but the problem so masterfully outlined by Matthey 20 years ago have remained unchanged».

L'introduction de nouvelles méthodes au début des années cinquante notamment le traitement par la colchicine, le choc hypotonique et la technique du «Squash» ont ouvert des perspectives nouvelles. La qualité des préparations a enfin permis de compter et de décrire les chromosomes avec une grande précision. Dès ce moment, Robert Matthey concentra ses recherches sur les Rongeurs qui représentent par leur richesse en espèces, un matériel de premier ordre. La collaboration avec les taxonomistes classiques se révéla particulièrement fructueuse: parmi eux, il faut surtout mentionner Francis Petter du Museum de Paris. Ainsi fut préparé le champ de la cytotaxonomie.

Dès ce moment, l'augmentation du nombre de caryotypes décrits amena de plus en plus la révision d'anciens concepts. Ainsi, on observe des cas toujours plus nombreux où le caryotype évolue indépendamment de la morphologie. Par exemple, Robert Matthey établit en 1954 chez *Ellobius lutescens* un caryotype de $2N=17$. Cette formule est d'autant plus énigmatique que *E. talpoides* possède $2N=52$ et *E. fuscocapillus* $2N=36$. Tout à fait comparable est le cas de *Microtus oregoni*, également découvert par Robert Matthey en 1957 et qui possède aussi $2N=17$. Ne s'agit-il vraiment que d'une convergence? La plus grande des aberrations fut découverte par Wurster et Benirschke quelques années plus tard chez un cerf, *Muntiacus muntjac*: $2N=6$ ou 7 , suivant le sexe, un véritable «scandale», selon Capanna! Si ces caryotypes exceptionnels peuvent être théoriquement expliqués par des translocations et inversions péricentriques répé-

tées, Robert Matthey eut la chance de trouver dans le genre *Leggada* un matériel remarquable, permettant d'étudier avec une plus grande précision ces réarrangements chromosomiques. Chez les *Leggada*, il décrit tout un «éventail Robertsonien», présentant pratiquement tous les caryotypes possibles entre $2N=36$ et $2N=18$, modifications qui ne transforment que rarement le nombre fondamental. Dans ces remaniements, les translocations touchant les hétérochromosomes sont d'un intérêt particulier, car elles peuvent précéder à l'établissement d'une spéciation stasipatrique, conception défendue par notre collègue, Martine Jotterand. C'est à ces travaux, publiés dans les années soixante, que nous devons la découverte de maintes espèces jumelles. Ils ont démontré la grande valeur du caryotype comme critère systématique dont la taxonomie ne pourrait plus se passer.

Signalons maintenant que depuis 1970, âge de la retraite du Professeur Matthey, les colorations différentielles ont fait leur apparition. Leur importance est aussi révolutionnaire que le fut l'introduction du choc hypotonique. Ce progrès technique permet d'identifier des bras ou des segments chromosomiques, moyen puissant de vérifier et d'approfondir les anciennes hypothèses.

J'en viens au dernier point de ma rétrospective, qui porte sur la direction de l'évolution du caryotype chez les Euthériens. Selon les anciens travaux, le mécanisme le plus important est la fusion centrique et, par conséquent, une tendance vers une réduction du nombre chromosomique. Ce point de vue a pour soi plusieurs arguments. Le principal est que l'augmentation du nombre des chromosomes est moins probable que la réduction, celle-ci exigeant une simple fusion centrique, celle-là la création d'un nouveau centromère. Mais on peut objecter que le décompte des chromosomes est d'autant plus facile que leur nombre est plus bas, et par conséquent, la détermination de ce nombre plus aisée. Nous devrions, dans notre hypothèse, supposer que, dans un groupe systématique donné, les espèces à nombre chromosomique faible sont plus fréquentes que celles où ce nombre est élevé. Or, des statistiques établies par Matthey, de 1953 à 1976, ont montré que les nombres diploïdes tendent vers une distribution normale, avec un

mode de 48. Au cours des années ces chiffres n'ont guère varié: l'échantillon de 1976 était de 1438 (dont 185, soit 12%, étudiées par Matthey lui-même). Par rapport aux échantillons précédents, les limites extrêmes étaient simplement repoussées, 92 chromosomes au maximum, 6 au minimum.

Une telle distribution normale suggère l'hypothèse qu'une augmentation du nombre diploïde est aussi fréquente qu'une diminution, et les deux processus deviennent de plus en plus improbables, au fur et à mesure que l'on s'éloigne de la valeur moyenne. Dès lors, il semble que les changements numériques ne présentent en eux-mêmes pas un avantage sélectif et Matthey conclut en 1976: «La signification même de l'évolution chromosomique nous échappe». Si ces dernières années, les connaissances de détails ont considérablement augmenté, il nous manque toujours des facteurs importants pour la compréhension globale de ces phénomènes et on serait tenté de citer Goethe comme l'a fait Robert Matthey dans une conférence de 1947: «Was man nicht weiss, das eben brauchte man, und was man weiss, kann man nicht brauchen!».

La cytogénétique est-elle dans une impasse?, question posée par le professeur Matthey dans une conférence en 1975. Nous ne le pensons pas, les recherches sur les problèmes phylogénétiques ont été dotées ces 15 dernières années de nouvelles méthodes spectaculaires, comparaison des réactions immunologiques, comparaisons des allozymes, des séquences d'acides aminés et des bases de l'ADN. D'autre part, des investigations récentes sur la structure du chromosome permettent d'espérer que l'étude morphologique classique des chromosomes et la biologie moléculaire se rencontreront pour donner une nouvelle dimension à la cytogénétique.

Pour terminer, j'aimerais vous exprimer, cher et honoré Collègue, notre profonde reconnaissance pour tout ce que vous nous avez donné, tant sur le plan scientifique que sur le plan humain.

Adresse de l'auteur:

Prof. Dr. Peter Vogel
Institut de zoologie et d'écologie animale
Université de Lausanne
Pl. du Tunnel 19
CH-1005 Lausanne

Chromosome Evolution in Amphibia

Michael Schmid

About half of all currently existing species of Amphibia have been cytogenetically analysed. These studies were primarily conducted with the conventional methods of cytogenetics. The modern techniques of chromosome banding have only been used on a very limited number of species. Nonetheless, the comparative cytogenetics of Amphibia already permit a closer insight into the operant laws of karyological evolution than was achieved in any other class of vertebrates. At the same time, however, the variable parameters playing a part in the chromosome evolution of individual amphibian groups also become apparent. The present review is to provide a summary of the lawful and variable parameters so far established with either conventional as well as modern cytogenetic methods.

Phylogeny and systematics of the Amphibia

Before going into the results of the chromosome studies on Amphibia, a short summary of the phylogeny and systematics of these vertebrates would be advantageous. According to the current view of vertebrate evolution, *Ichthyostega* from the late upper Devon is regarded as one of the first amphibian-like tetrapods. *Ichthyostega* represents a transitional stage between the crossopterygian fishes of the suborder *Rhipidistia* and the early amphibians. The adaptations necessary for a terrestrial way of life (atmospheric breathing, prevention of dessication, tetrapod locomotion) was accomplished by the amphibians during the Carboniferous and Permian periods. In these periods, several groups differentiated (*Ichthyostegalia*, *Rhachitomi*, *Stereospondyli*, *Embolomeri*, *Lepospondyli*), of which the *Lepospondyli* are considered the ancestors of the modern Amphibia (for reviews see Romer, 1966; Schmalhausen, 1968).

Unfortunately, very few fossils exist of the time between the well-documented paleozoic and the recent Amphibia. Therefore, it has not been possible to reconstruct the immediate ancestry of the Amphibia. The development of the abundance of forms among the recent amphibians is thought to have begun in the Tertiary. The Amphibia in existence today can be classified into 3 orders (*Anura*, *Urodela* and *Apoda*), about 28 families, approximately 320 genera and about 3000 species. Whereas the *Apoda* with their 160 species occur exclusively in the tropical regions of America, Africa and Asia, and the *Urodela* with their roughly 350 species are restricted to the temperate and sub-tropical regions of the northern hemisphere, the *Anura* with their 2500 species are almost ubiquitous (Ziswiler, 1976).

The classical cytogenetic studies on Amphibia

The early investigations of the 3 amphibian orders (*Anura*, *Urodela* and *Apoda*) were performed with the conventional methods of cytogenetics on uniformly stained chromosomes (Fig. 1). The comparative criteria used for this primarily were the number and morphology of chromosomes (relative length, centromeric position, arm ratio) as well as the number and positions of the secondary constrictions. The results obtained in the course of these studies yielded the first indications of the processes which had occurred during the chromosomal evolution of the Amphibia. Thus Morescalchi (1971, 1973) was able to demonstrate impressively that in all 3 amphibian orders during their evolution from primitive to highly specialized genera the number of microchromosomes and telocentric chromosomes was reduced in favor of large metacentric or

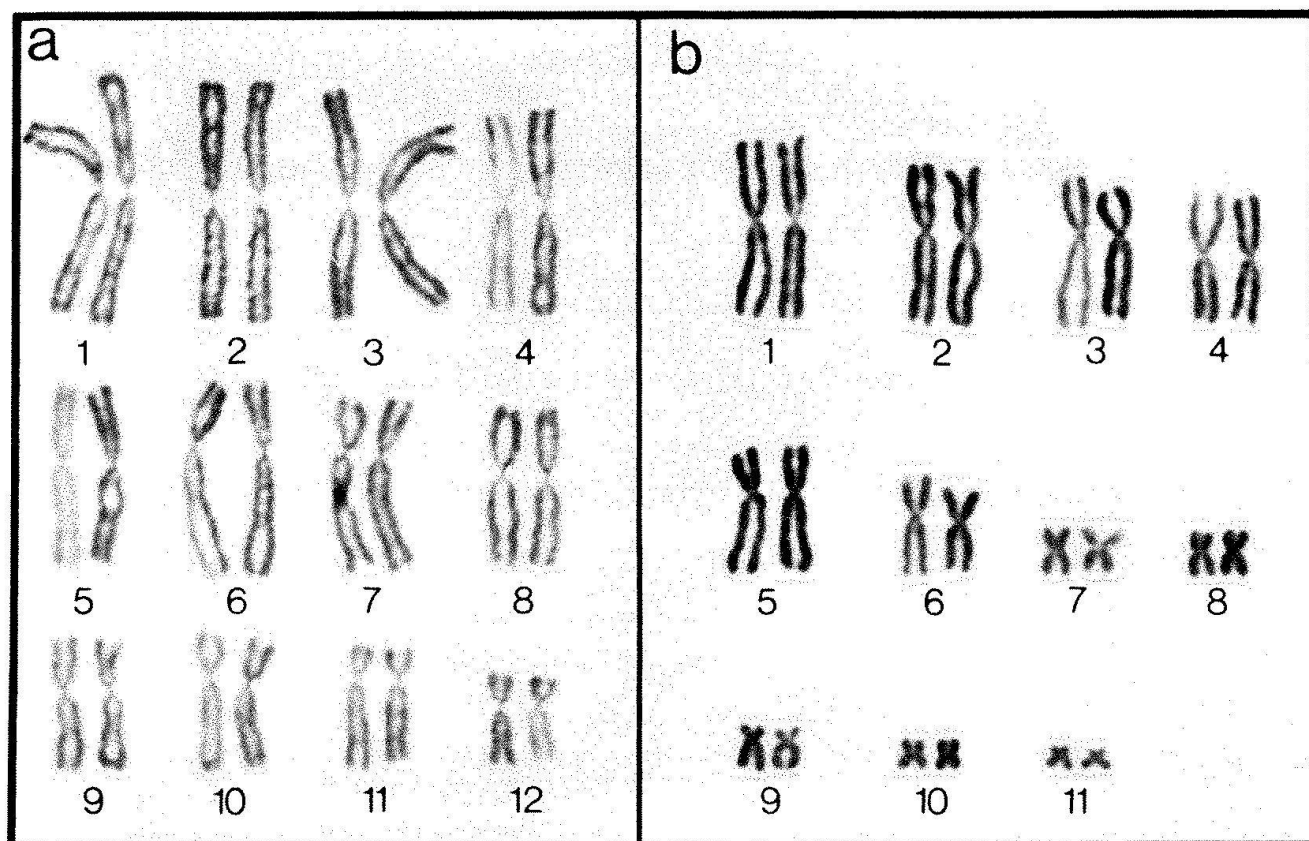


Fig. 1. Conventionally stained chromosomes (aceto-orcein) of highly developed species of Urodela and Anura. (a) *Triturus alpestris* and (b) *Bufo bufo*. Note that all chromosomes are meta- or submetacentric. Telocentric chromosomes, whose centromeres are localized at one end of the chromosomes, no longer occur in these species.

submetacentric chromosomes. The evolution of the karyotypes from the primitive genera, which still possess microchromosomes and telocentric chromosomes alongside a few meta- or submetacentric chromosomes, to the more highly evolved genera with exclusively metacentric chromosomes can be explained by centric fusions and tandem translocations taking place between the chromosomes (Morescalchi, 1973). This successive reduction of the chromosome number in the variously highly evolved families of Urodela, Anura and Apoda is described in the following three paragraphs (see also the reviews by Morescalchi, 1971, 1973, 1975, 1979).

Urodela

The order of the recent Urodela is divided into 8 families. The two primitive families Hynobiidae and Cryptobranchidae comprise very generalized species with a relatively high chromosome number ($2n = 40-64$). Microchromosomes (less than 2 μm in

length) and telocentric chromosomes are exceptionally numerous. The number of chromosome arms ("nombre fondamental" of Matthey, 1945) was determined to be between 62 and 90. The species of these two families have retained the most primitive karyotypes known in Urodela. Cytogenetically, the family Proteidae constitutes the next higher stage of evolution. The chromosome number of the Proteidae ($2n = 38$, $NF = 64-68$) is clearly intermediate between that of the primitive Hynobiidae and Cryptobranchidae and that of the more highly evolved families of Urodela. The Proteidae are distinguished from the primitive families by the lack of microchromosomes and from the more highly evolved families by the presence of telocentric chromosomes. The species of the highly evolved families Ambystomatidae, Plethodontidae and Amphiumidae possess $2n = 28$ or 26 meta- or submetacentric chromosomes and a $NF = 56-52$. These karyotypes have developed due to the complete loss of microchromosomes (tandem translocations) and the telocentric chromo-

somes (centric fusions). Finally, the chromosome number is yet further reduced in the family Salamandridae ($2n = 24, 22$; $NF = 48, 44$). All chromosomes are large, meta- or submetacentric elements (Fig. 1a). Cytogenetically, the Salamandridae must be considered the most highly evolved family of the recent Urodela. The only exceptions to the relationships between number, morphology and chromosome size as described above are the species of the family Sirenidae (*Siren intermedia*, *S. lacertina* and *Pseudobranchius striatus*). Although these, like the primitive families of Urodela, possess a relatively high number of chromosomes ($2n = 46, 52, 64$), almost all chromosomes are meta- or submetacentric; furthermore, there are no microchromosomes. It is considered probable (see below) that these species constitute tetraploid Urodela, which have originated from one of the highly evolved families (Morescalchi and Olmo, 1974).

Anura

The oldest family of the Anura are the Ascaphidae with only one living species in North America (*Ascaphus truei*) and three species in New Zealand (*Leiopelma*). *Ascaphus truei* is distinguished by a high chromosome number with telocentric chromosomes as well as microchromosomes. Since in this species $2n = 44$ and $2n = 46$ chromosomes have been determined although the number of chromosome arms is always $NF = 56$ (Morescalchi, 1967; Bogart, 1970), centric fusions must be regarded responsible for the discrepancy in the chromosome number. The genus *Leiopelma* is karyologically at a much higher stage of development than *Ascaphus*. Thus *L. hochstetteri* possesses $2n = 22$ macrochromosomes (10 meta- and 12 telocentric) and between 0 and 12 supernumerary microchromosomes occurring in variable numbers. In *L. hamiltoni* and *L. archeyi* only 18 macrochromosomes (16 meta- and 2 telocentric) are found (Morescalchi, 1968; Stephenson et al., 1972; 1974). These examples illustrate, that the reduction of the chromosome number which occurred during the phylogeny from the primitive to the highly evolved families can by all means take place within one family. The ancient family Disco-

glossidae is considered transitional between the primitive family Ascaphidae and the higher evolved anuran families. The karyological evolution in this family has led to the loss of the microchromosomes. There are only few telocentric chromosomes remaining in some species (*Alytes obstetricans*, *Discoglossus pictus*). The chromosome number of the species investigated to date fluctuates between $2n = 24$ and $2n = 48$, the number of chromosome arms between $NF = 48$ and 72. The also very ancient family Pipidae comprises very specialized genera (*Pipa*, *Xenopus*, *Hymenochirus*, *Pseudhymenochirus*). Their karyotypes differ at the intergeneric level ($2n = 20-36$), with some species showing telocentric chromosomes and microchromosomes. The number of chromosome arms varies between $NF = 30$ and 72. In one species, *Pipa parva*, all 30 chromosomes are telocentric; this situation, however, very probably does not reflect the original stage, having instead developed from centric fissions of meta- and submetacentric chromosomes (Morescalchi, 1968). Several tetraploid and hexaploid species were discovered in the genus *Xenopus* (see below). The karyological heterogeneity in the family Pipidae is thought to be related to the antiquity of this Anura. The species of this family possibly followed a different path of karyological evolution than did the higher Anura. In the relatively ancient family Pelobatidae and the highly evolved families Leptodactylidae, Dendrobatidae, Hylidae, Bufonidae, Microhylidae, Ranidae and Rhacophoridae the chromosome number is with some exceptions reduced to $2n = 26$ to 22. The chromosomes are largely meta- and submetacentric, very rarely telocentric (Figs. 1b, 5-8). Microchromosomes are present only in the rarest of cases (see B-chromosome of *Rana temporaria*, Fig. 8a). In several families, the successive reduction of the chromosome number can still be observed in a number of species. Thus in the family Ranidae there are species with $2n = 26, 24, 22$ and even with only 14 chromosomes (*Arthroleptis stenodactylus*, *A. poecilonotus*). Cytogenetic analyses on other Ranidae could possibly reveal karyotypes constituting a transition between species with $2n = 22$ chromosomes and *Arthroleptis* with $2n = 14$. In contrast to this process of successive

reduction of the chromosome number, there are also isolated groups among the higher evolved Anura in which telocentric chromosomes develop from meta- or submetacentric chromosomes by way of centric fissions. This process increases the chromosome number. The subfamily Eleutherodactylinae from the very species-rich family Leptodactylidae can serve as an example for this. As in many other highly evolved Anura, the original karyotype in this group is supposed to be $2n=26$ chromosomes (Morescalchi, 1973; 1979). Whereas the chromosome number was reduced to $2n=22$, 20 and 18 by way of centric fusions and tandem translocations in some species, it was increased to $2n=30$, 32, 34 and 36 by way of centric fissions in others. It is interesting to note that the higher chromosome numbers are found in the species from Central- und northern South America, where the Eleutherodactylidae are currently undergoing an exceptionally strong radiation and speciation.

Apoda

Only 12 of the 160 species comprising the order Apoda have been cytogenetically analysed at present (see reviews by Seto and Nussbaum, 1976; Morescalchi, 1979). The chromosome numbers determined to date range between $2n=20$ and 42 (NF=40-52). As in Urodela and Anura, there also exists a trend in the karyological evolution of Apoda to reduce the number of telocentric chromosomes and microchromosomes. Two species of the primitive family Ichthyophiidae have been studied (*Ichthyophis glutinosus* and *I. orthoplicatus*). These have $2n=42$ chromosomes (NF=52). 10 chromosome pairs are meta- and submetacentric, the others are telocentric or microchromosomes. In the more advanced families Typhlonectidae, Caeciliidae and Dermophiidae, the diploid chromosome number is lower. The number of telocentric chromosomes and microchromosomes is reduced in favor of the large meta- and submetacentric chromosomes. Thus in *Caecilia occidentalis* and *Siphonops paulensis* (Caeciliidae) there are only $2n=24$ (NF=48) and in *Chthonerpeton indistinctum* (Typhlonectidae) there are only $2n=20$ (NF=40) chromosomes left.

Polyploidies in Amphibia

The early cytogenetic investigations have already shown polyploidies to be very frequent in Amphibia. The number of observations about polyploid species, populations or single individuals increases rapidly. In no other class of vertebrates are naturally occurring polyploids so frequent as in Amphibia. Polyploidies are only described in a few fish species of the Chondrostei and Teleostei and a few reptiles of the Squamata. In the Urodela, triploidies and tetraploidies can very simply be experimentally induced by subjecting the eggs to temperature or pressure shocks. These physical factors prevent the formation of the second polar body. The use of female animals from the newt species *Pleurodeles waltlii* (Salamandridae) with a marker chromosome showing a pericentric inversion permitted an interpretation of the origin of triploidy and the other types of ploidies (Ferrier and Jaylet, 1978). It was also possible to create triploid animals in the Anura (*Xenopus laevis*) by means of pressure to the fertilized eggs (Tompkins, 1978). It is probable, that a certain number of embryos in the progeny of many Anura and Urodela are polyploid, since such animals have been found wherever large number of offspring were analysed (Fig. 7j).

Only in the Apoda have no polyploidies been observed to date; then again, there have hardly been enough cytogenetic studies performed on them.

The naturally occurring polyploid species or populations of Anura and Urodela discovered hence are listed in the Table 1. The first report of a tetraploid population of Anura was made on the South American species *Odontophrynus americanus* (Beçak et al., 1966). Investigations on a great number of animals from Brasil, Argentina and Uruguay have established that *O. americanus* only occurs in the diploid $2n=22$ or tetraploid $4n=44$ state (Bogart, 1967; Barrio and Rinaldi de Chieri, 1970; Barrio and Pistol de Rubel, 1972). Observations of the meiotic stages in the tetraploid animals in some cases revealed quadrivalent pairings involving the four supposedly homologous chromosomes (Bogart and Wassermann, 1972; Beçak et al., 1967). In the octoploid species *Ceratophrys ornata*, it was even pos-

Tab. 1. Polyploid species or populations found in Anura and Urodela.

Order	Family	Species	Diploid	Polyploid	Reference
Anura	Pipidae	<i>Xenopus vestitus</i>	—	4n = 72	1
		<i>Xenopus wittei</i>	—	4n = 72	2
		<i>Xenopus ruwenzoriensis</i>	—	6n = 108	3
	Ceratophryidae	<i>Ceratophrys ornata</i>	2n = 26	8n = 104	4
		<i>Odontophrynus americanus</i>	2n = 22	4n = 44	5
	Leptodactylidae	<i>Pleurodema bibroni</i>	—	4n = 44	6
		<i>Pleurodema kriegi</i>	—	4n = 44	6
	Hylidae	<i>Hyla versicolor</i>	—	4n = 48	7
		<i>Phyllomedusa burmeisteri</i>	2n = 26	4n = 52	8
	Bufonidae	<i>Bufo danatensis</i>	—	4n = 44	9
		<i>Bufo viridis</i>	2n = 22	4n = 44	10
		<i>Bufo</i> sp.	2n = 20	4n = 40	11
Urodela	Ranidae	<i>Rana esculenta</i>	2n = 26	3n = 39	12
		<i>Pyxicephalus delalandii</i>	2n = 26	4n = 52	11
		<i>Dicroglossus occipitalis</i>	2n = 26	4n = 52	11
	Ambystomatidae	<i>Ambystoma platineum</i>	—	3n = 42	13
		<i>Ambystoma tremblayi</i>	—	3n = 42	13
		<i>Ambystoma texanum</i> x <i>A. laterale</i>	—	3n = 42	14
	Sirenidae	<i>Siren intermedia</i>	—	4n = 46	15
		<i>Siren lacertina</i>	—	4n = 52	15
		<i>Pseudobranchius striatus</i>	—	4n = 64	15

(1) Tymowska et al., 1977. (2) Tymowska and Fischberg, 1980a. (3) Tymowska and Fischberg, 1980b. (4) Barrio and Rinaldi de Chieri, 1970a. (5) Beçak et al., 1966; Bogart and Wassermann, 1972. (6) Barrio and Rinaldi de Chieri, 1970b. (7) Wassermann, 1970. (8) Beçak et al., 1970; Batistic et al., 1975. (9) Pisanetz, 1978. (10) Mazik et al., 1976. (11) Bogart and Tandy, 1976. (12) Günther, 1970, 1975. (13) Uzell, 1963. (14) Downs, 1978. (15) Morescalchi and Olmo, 1974.

sible to demonstrate octovalents, hexavalents, quadrivalents and bivalents. On the other hand, the meiosis of the tetraploid *Pleurodema*, *Xenopus*, *Bufo* and *Dicroglossus* exclusively revealed bivalents (see references in Table 1). Then again, the hexaploid *Xenopus* and the tetraploid *Pyxicephalus* exhibit some few multivalents. Multivalent pairings have generally been considered evidence for chromosomal homology. The question of whether the polyploid species are autopolyploids (evolved by polyploidization from a single species) or allopolyploids (evolved from interspecies hybrids and secondary polyploidization) is comprehensively reviewed by Bogart (1980). It is probable that in the polyploid species of Amphibia a "diploidization-process" similar to the one in polyploid fish species becomes effective, causing a divergence in the development of chromosomes and genes initially identical. This diploidization is propelled by centric fusions, inversions and reciprocal translocations. After the "diploidization-

process" is completed, the initial polyploidy can no longer be readily recognized on the basis of the chromosome morphology or the pairing configuration of the meiotic chromosomes. Among the Urodela, there exists the all-female triploid populations of *Ambystoma*, which reproduces gynogenetically. They require sperm nuclei from a related diploid bisexual species for the activation of the eggs. The 3 species of the urodelan family Sirenidae (*Siren intermedia*, *S. lacertina* and *Pseudobranchius striatus*) also seem to show traces of a tetraploid condition; most of their chromosomes can be arranged in quartets of similar length and morphology (Morescalchi and Olmo, 1974).

Genome sizes in the Amphibia

The polyploidies described in the last section can also be perceived by determining the DNA-content with cytophotometric methods. The nuclear DNA amounts of

twelve species and subspecies of *Xenopus*, which were determined by Thiébaud and Fischberg (1977), can serve as an example of this. The lowest DNA amount (3.5 picograms DNA/diploid nucleus) was found in *X. tropicalis*, which possesses only 20 chromosomes. The species with 36 chromosomes has DNA amounts of 6.35–8.45 pg. The DNA value is roughly doubled (12.8 pg and 12.5 pg) in the two tetraploid species *X. vestitus* and *X. wittei* with their 72 chromosomes. Finally, the highest DNA content (16.2 pg) was found in the tetraploid species *X. ruwenzoriensis*. This example shows how the genome can increase through the multiplication of whole sets of chromosomes.

With regard to the genome size, the Amphibia, along with the lung fish (Dipnoi) are distinctly different from the rest of the vertebrates. Whereas in other vertebrates the DNA content per diploid nucleus is around 10 picograms or below, the Amphibia display values considerably above this figure (Fig. 2). In addition to this, there exists in the Amphibia and Dipnoi a very high inter-specific variability of the genome sizes. In Urodela, the highest DNA values were found in species from the families Amphiumidae, Proteidae and Sirenidae (90–189 pg) and the lowest in the families Plethodontidae and Salamandridae (30–86 pg). A common characteristic of the Urodela with the maximum genome sizes seems to be a larval or semi-larval mode of existence. This has led several authors to see a correlation between the genome size and the length of the larval period in Amphibia (Commoner, 1964; Goin et al., 1968). The genome sizes would accordingly have both an "adaptive" function as well as an evolutionary significance (Morescalchi, 1973; 1975). The highest DNA values of the Anura occur in the primitive family Discoglossidae (10–21 pg), the lowest in the Pelobatidae (1.6–8.9 pg). Those species with the extremely low genome sizes (genus *Scaphiopus* of North America) go through the extraordinarily short embryonic period of only 2 (!) days: this can also serve as a confirmation of the correlation between the genome size and the length of the larval period.

There arises the question of the other factors, besides polyploidization, on which the exceptionally great inter-specific and inter-

familial differences of the genome sizes in the Amphibia could be based. It has been shown, mainly by the kinetics of renaturation of DNA, that the genomes of all eucaryotes are comprised of single-copy ("unique") sequences, of intermediately repeated and of highly repeated sequences (Britten and Kohne, 1968). The various species differ from each other mainly in the quantity of the intermediately and highly repeated sequences of DNA. The renaturation kinetics performed with the DNA of some species of Anura and Urodela permit the conclusion that the quantity of intermediately and highly repeated sequences is greater in those species with a larger genome (Britten and Davidson, 1971; Straus, 1971; Morescalchi and Serra, 1974; Mizuno and Macgregor, 1974). Baldari and Amaldi (1976) compared the genomes of two species each of Anura and Urodela with highly varied DNA content: *Xenopus laevis* (6 pg DNA) with *Bufo bufo* (14 pg DNA) and *Triturus cristatus* (46 pg DNA) with *Necturus maculosus* (104 pg DNA). It turned out that within each subclass the two species analysed possess about the same absolute amount of single-copy sequences. The differences in the total nuclear DNA could be accounted for by the quantitative differences of the repetitive sequences. Furthermore, it could be shown that the great difference in the DNA content between the Anura and Urodela involves all sequence classes in parallel. There is at present no convincing interpretation concerning the function of the sizeable amounts of repetitive DNA in the genomes of the eucaryotes. The mechanism, besides polyploidization, by which the amount of nuclear DNA can increase is a repeated tandem gene duplication (Ohno, 1970). Since these duplications can proceed uniformly within the entire genome, this would alter only the chromosome length, but not the chromosome number.

In favorable instances, the highly repetitive DNA can be separated from the rest of the DNA by equilibrium density gradient centrifugations of the DNA in Ag^+ - Cs_2SO_4 or CsCl in analytical or preparative ultracentrifuges. Due to the high proportion of AT- or GC-base pairs, the highly repetitive DNA then appears as a light or heavy "satellite", respectively. The satellite DNAs constitute a

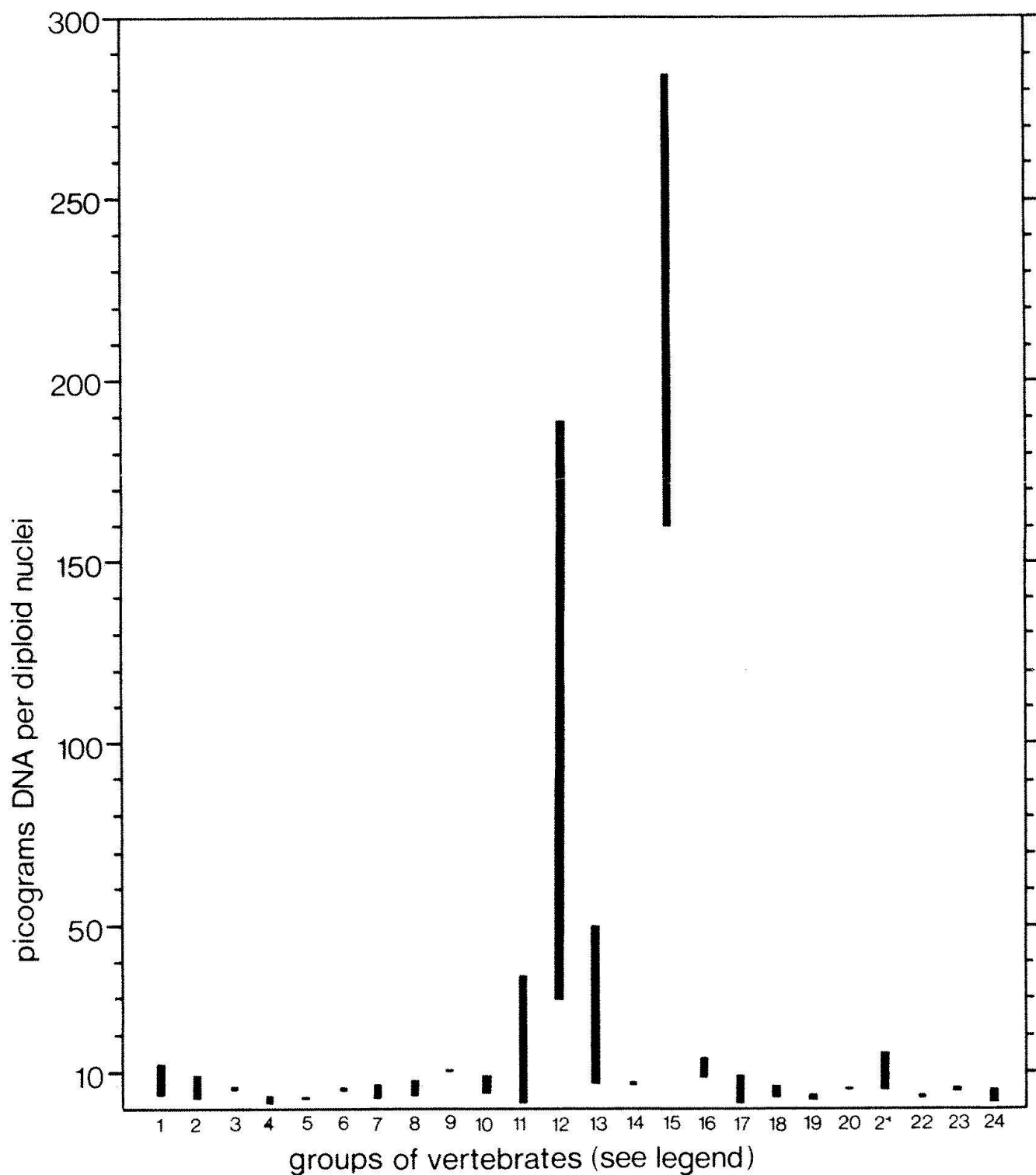


Fig. 2. Minimum and maximum DNA contents in vertebrates. The data are compiled by Morescalchi (1977). Note the extremely high DNA values and interspecific variability in the Dipnoi (15) and the Amphibia (11, 12, 13). Mammalia: (1) Eutheria, (2) Marsupialia, (3) Monotremata. Aves: (4) Carinatae, (5) Ratitae. Reptilia: (6) Crocodilia, (7) Ophidia, (8) Sauria, (9) Rhyncocephalia, (10) Chelonia. Amphibia: (11) Anura, (12) Urodela, (13) Apoda. Osteichthyes: (14) Latimeria, (15) Dipnoi, (16) Polypterini, (17) Teleostei, (18) Chondrostei, (19) Holostei. Chondrichthyes: (20) Batoidea, (21) Selachii, (22) Holocephali. Agnatha: (23) Myxinoidea, (24) Petromyzonta.

readily available and pure fraction of DNA, whose chromosomal location can be made readily visible by the so-called in situ hybridization of radioactive complementary RNA or DNA (for reviews see Gall and Pardue, 1969; Hennig, 1973, 1976). The experiments using in situ hybridization have demonstrated that satellite DNA is located predominantly in the constitutive heterochromatin of the chromosomes (see next section). Thus satellite DNAs were localized in the constitutive heterochromatin in several species of the genus *Plethodon* by Macgregor (1973) and in *Xenopus* (Anura, Pipidae) by Pardue (1974).

Banding methods in amphibian cytogenetics

The methods of chromosome analysis newly developed in the past decade on the one hand permit exact studies on the karyological relationships among the species, and on the other hand they produce precise information on the fine structure of the chromosomes. In a few cases, it was even possible to obtain information about the function of specific chromosome regions. An almost complete review of these new methods was written by Bostock and Sumner (1978) and Dutrillaux (1975). These methods were primarily developed on the metaphase chromosomes of mammals and later used with great success on the lower vertebrates as well. A preliminary account of the vertebrate species studied shows that in comparison with the enormous number of publications on mammalian species, there are only few completed studies on amphibians or other lower vertebrates (reptiles and fish) available to date. However, with these modern methods of cytogenetics a great number of data about these organisms will become known in the next years.

DNA-base specific fluorochromes, which produce characteristic transverse bands along the metaphase chromosomes of higher vertebrates are increasingly used to characterize the karyotypes. Each chromosome pair exhibits its own pattern of transverse bands. This permits a more precise identification of chromosomal rearrangements (inversions, translocations, etc.) which took place in the course of karyological evolution than was possible with conventional methods. Such

DNA-base specific fluorochromes are, for instance, the AT-specific quinacrine mustard and Hoechst 33258 or the GC-specific mithramycin and chromomycin A₃. Those banding patterns produced by the staining with the AT-specific fluorochromes (Q-bands) are usually exactly the reverse of the patterns produced with the GC-specific fluorochromes (R-bands). The use of these fluorochromes on the chromosomes of the lower vertebrates (amphibians, fish) showed a remarkable difference to the results obtained on the chromosomes of the higher vertebrates. None of the euchromatic chromosome regions of any of the amphibian species examined to date revealed any such multiple banding patterns. The euchromatin mainly fluoresces with a uniform intensity (Fig. 3a-d). All of those chromosome regions found to fluoresce significantly stronger or weaker than the euchromatin (Fig. 3a-d) could, after closer analysis, be identified as constitutive heterochromatin. It was also not possible to induce multiple bands in the euchromatic chromosome regions (G-bands) by enzymatically treating amphibian chromosomes with trypsin (Seabright, 1971) or pronase (Dutrillaux et al., 1971). The lack of such multiple Q-, R- and G-bands in the euchromatic regions of amphibian chromosomes can be partially attributed to the extremely strong spiralisation of the chromosomes in the metaphases. The distances between the individual bands in the euchromatin of the amphibian metaphase chromosomes is probably too slight to be resolved with a light microscope. Thus, the comparison between the chromosomes of man (as a representative of the mammals) and several Anura showed the average DNA-content per μm chromosome length to be a factor of 1.5 to 3 higher in the metaphases of Anura (Schmid, 1978a). It is also possible, however, that those additional factors thought responsible for the occurrence of the banding patterns in higher vertebrates (Comings et al., 1975) are missing on the amphibian chromosomes. Staining the amphibian chromosomes with the various fluorochromes also revealed yet other significant differences to the chromosomes of the higher vertebrates. Thus, in all families of Anura and Urodela examined to date, a remarkably large number of species was found possessing chromosomes with quina-

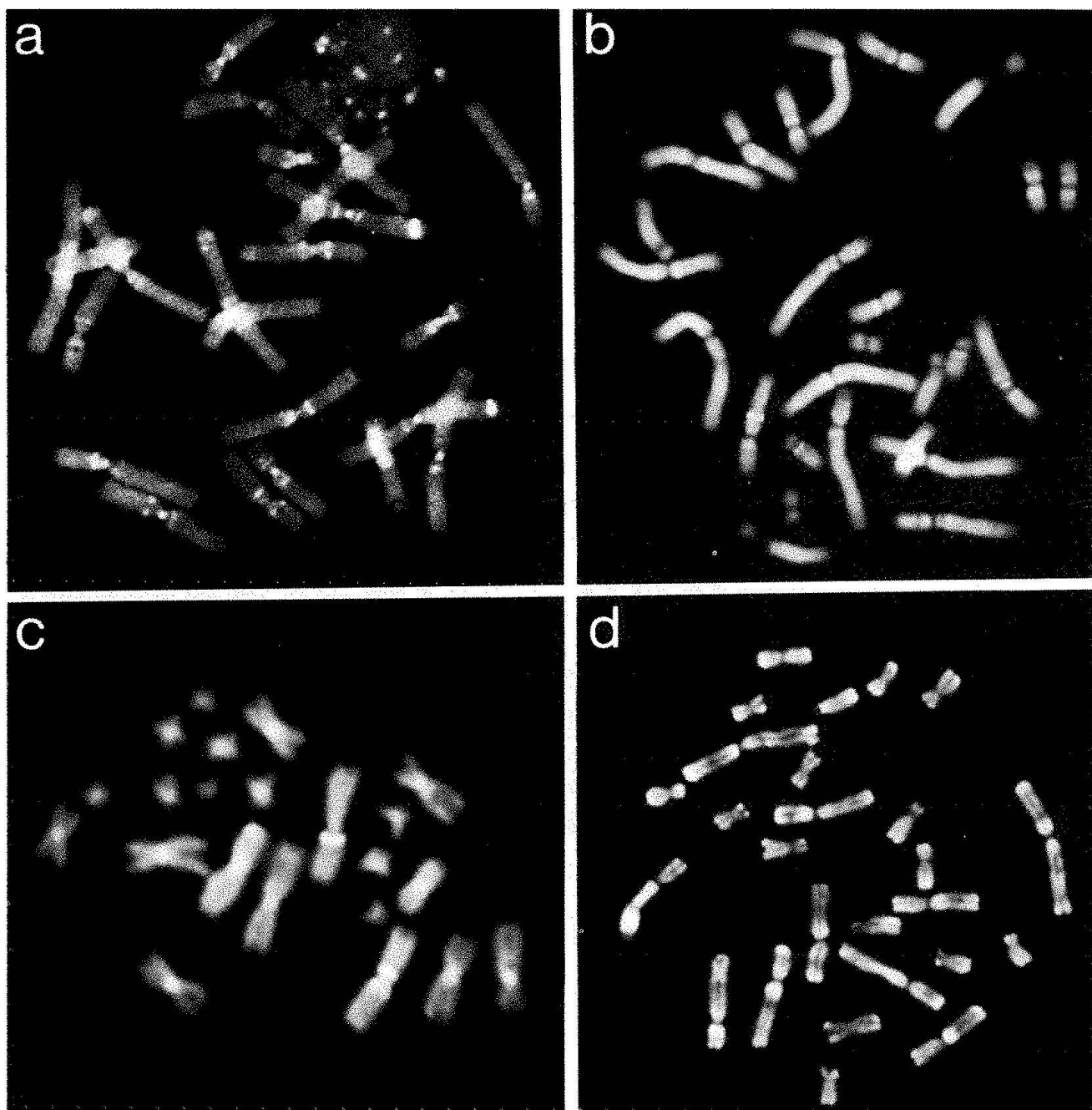


Fig. 3. Metaphases of four amphibian species stained with (a, b) quinacrine mustard and (c, d) mithramycin. (a) *Triturus alpestris* (Urodela, Salamandridae). (b) *Pachymedusa dachnicolor* (Anura, Hylidae). (c) *Bufo americanus* (Anura, Bufonidae). (d) *Rana catesbeiana* (Anura, Ranidae). Note the very brightly fluorescing AT-rich heterochromatic regions in (a, b) and GC-rich heterochromatic regions in (c, d). The euchromatic chromosome regions fluoresce with uniform intensity by comparison.

crine-bright and consequently AT-rich constitutive heterochromatin (Schmid, 1978a, b, 1980; Schmid et al., 1979). The quinacrine mustard-stained chromosomes of *Triturus alpestris* (Fig. 3a), *Pachymedusa dachnicolor* (Fig. 3b) and *Bufo americanus* (Fig. 4b) are shown as examples for this. Species with AT-rich heterochromatic chromosome regions are very rare in mammals (Jalal et al., 1974). Most of the constitutive heterochromatic

chromosome regions of the Amphibia are GC-rich, as the stainings with the GC-specific fluorochromes mithramycin and chromomycin A₃ revealed (Figs. 3c, d; 4c, f). In the karyotypes of all amphibian species investigated, the regions fluorescing the brightest with GC-specific fluorochromes (Fig. 4k) are the nucleolus organizer regions (see below). The nucleolus organizers of mammals do not display any remarkably bright fluorescence

following treatment with these two GC-specific fluorochromes (Schweizer, 1976; Schnedl et al., 1977). It is conceivable that several factors in the Amphibia join to cause the mithramycin- or chromomycin A₃-fluorescence of the nucleolus organizers: the very high number of ribosomal genes (e.g. about 450 repeating units in the nucleolus organizers of *Xenopus laevis*; Brown and Dawid, 1968), the higher spiralization of the chromatin and a very high fraction of GC-base pairs in the sequences separating the ribosomal genes from each other ("spacer sequences": about 73% GC-content in *X. laevis*; Brown et al., 1972).

The most customary method for staining all heterochromatic chromosome regions, independent of their AT- or GC-content, is probably the denaturation-reassociation-technique (C-band-technique; see Bostock and Sumner, 1978). Since this staining is done with common Giemsa, the chromosomes can be analysed under the bright-field microscope (Fig. 4a, e, i). The number heterochromatic regions on the amphibian chromosomes is, compared with the chromosomes of other vertebrates, relatively high (see below). Since in addition the diploid chromosome number of Amphibia rarely exceeds the value of $2n = 30$ in most species, the chromosomes can be fairly well identified with these C-bands. The comparison between the C-bands and the banding patterns induced with AT- and GC-specific fluoro-

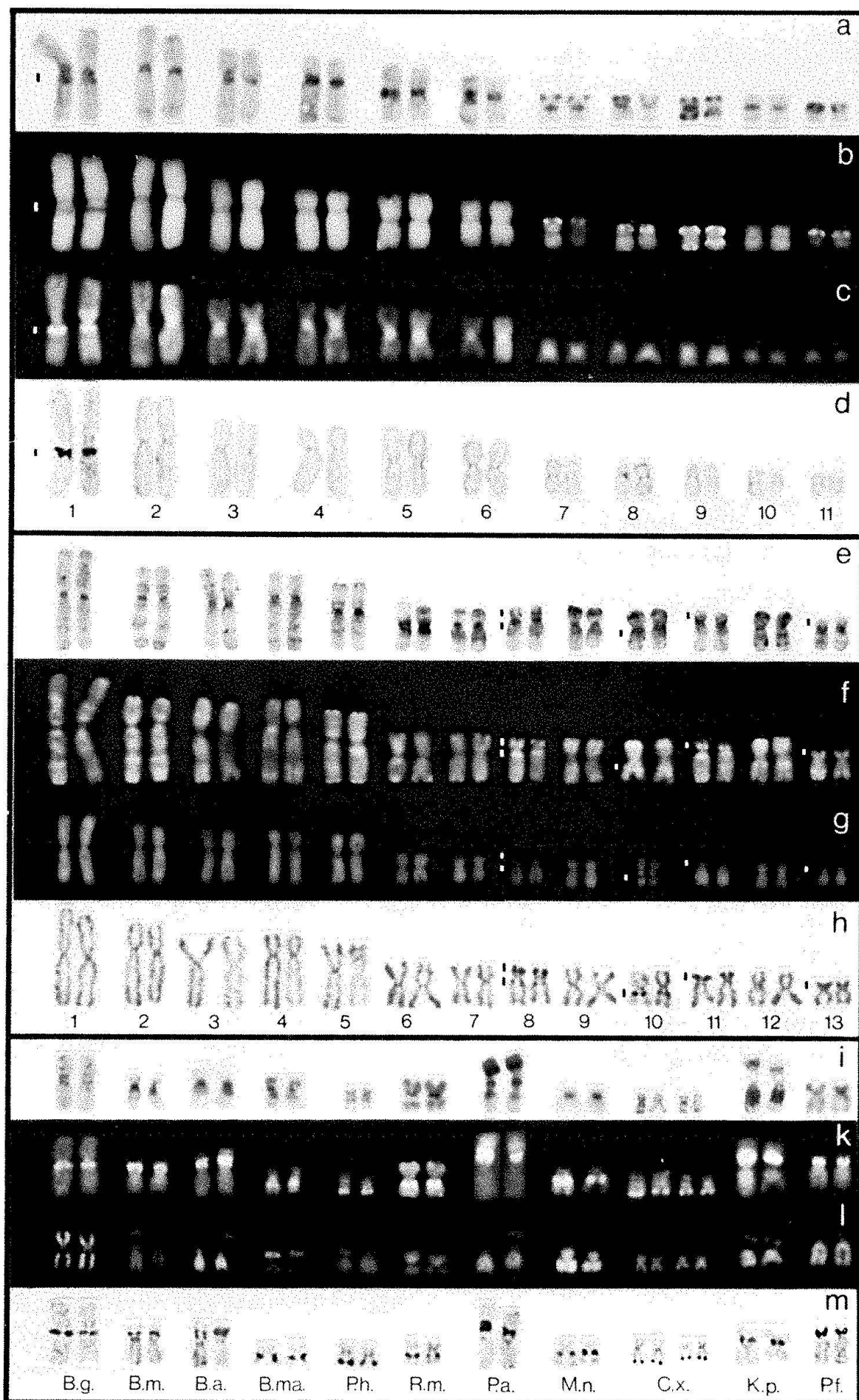
chromes permits definitive statements about the distribution of the constitutive heterochromatin as well as its chemical composition (Schmid, 1980a). A summary of the staining reactions of the constitutive heterochromatin with the different banding methods and the base compositions deduced therefrom is given in table 2.

The AgNO₃-staining method developed five years ago (Goodpasture and Bloom, 1976) serves to specifically demonstrate the nucleolus organizer regions in the interphase cell nucleus and on the metaphase chromosomes (Fig. 4d, h, m). The term nucleolus organizer region denotes that position of the genes responsible for the formation of nucleoli in the interphase nucleus (synthesis of ribosomal 18s and 28s RNA). These nucleoli are occasionally apparent as secondary constrictions in the chromosomes. AgNO₃-staining does not label the ribosomal genes (rDNA) itself, but rather ribonucleoproteins, which accumulate at the nucleoli of the interphase cell nuclei and in the nucleolus organizer regions of the metaphase chromosomes which had been active in the preceding interphase (Schwarzacher et al., 1978). Homologous chromosomes rather frequently have considerable differences in the size of their silver-stained nucleolus organizers (Fig. 4d, h, m). The position of the nucleolus organizers and their number in the karyotypes of Amphibia will be discussed further on in the paper.

Tab. 2. Summary of the differential stainability of the various chromatin categories in 26 species of Anura investigated and the DNA base compositions deduced therefrom.

Chromatin class	Differential stainability ^{a)}						Presumed DNA base composition
	C-bands (Giemsa)	Fluorochromes AT-specific		Quinacrine mustard (Q-bands)	GC-specific		
		DAPI	Hoechst 33258			Mithramycin	Chromomycin A ₃
Euchromatin	—	—	—	—	—	—	
Heterochromatin	+	+	+	+	—	—	AT-rich
	+	—	—	—	+	+	GC-rich
	+ —	—	—	—	+	+	GC-rich
	+	—	—	—	—	—	AT + GC-rich (?)
Nucleolus organizer regions	+ or —	—	—	—	++	++	GC-rich

^{a)}Differential stainability implies a positive reaction of the chromatin of the metaphase chromosomes. The euchromatin shows a uniform and weak reaction to all stains (—). Some C-bands show a very weak reaction to the denaturation-reassociation technique; this class is designated with + —. These data were taken from Schmid (1980a).



Constitutive heterochromatin

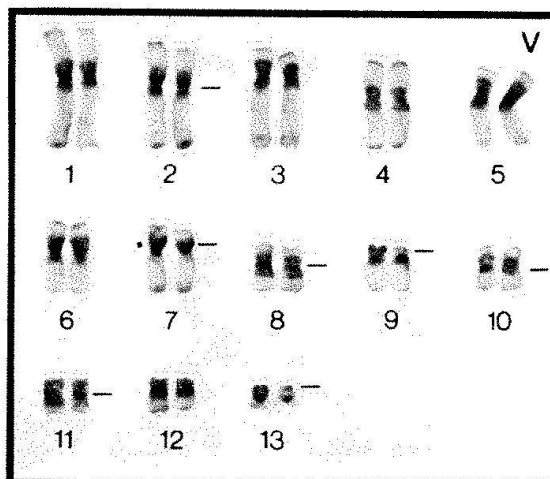
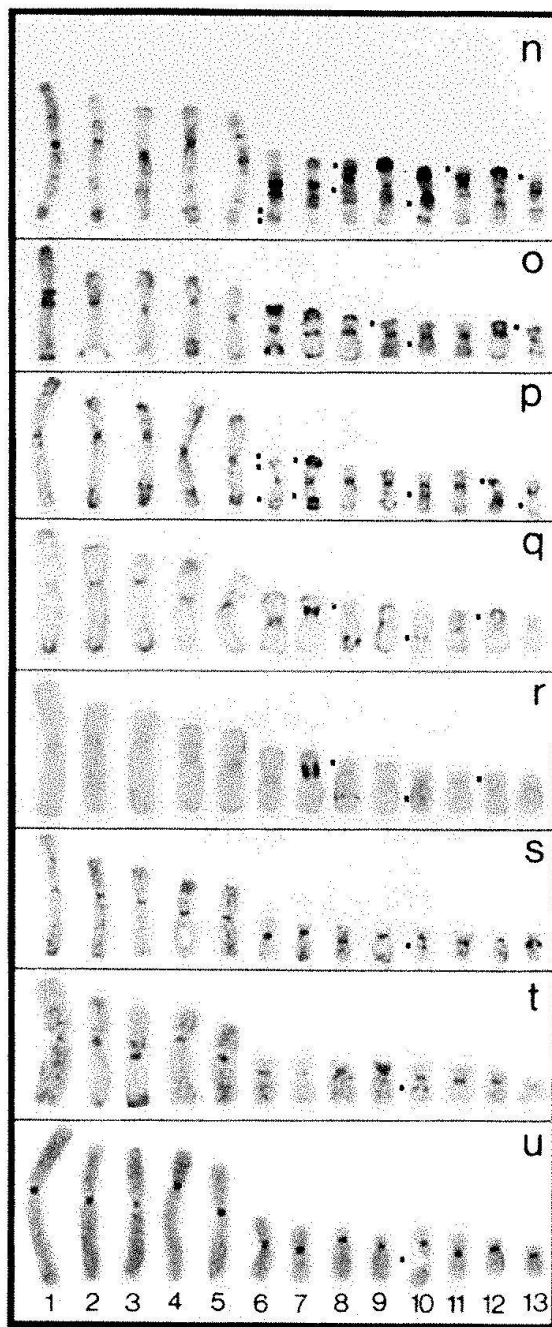
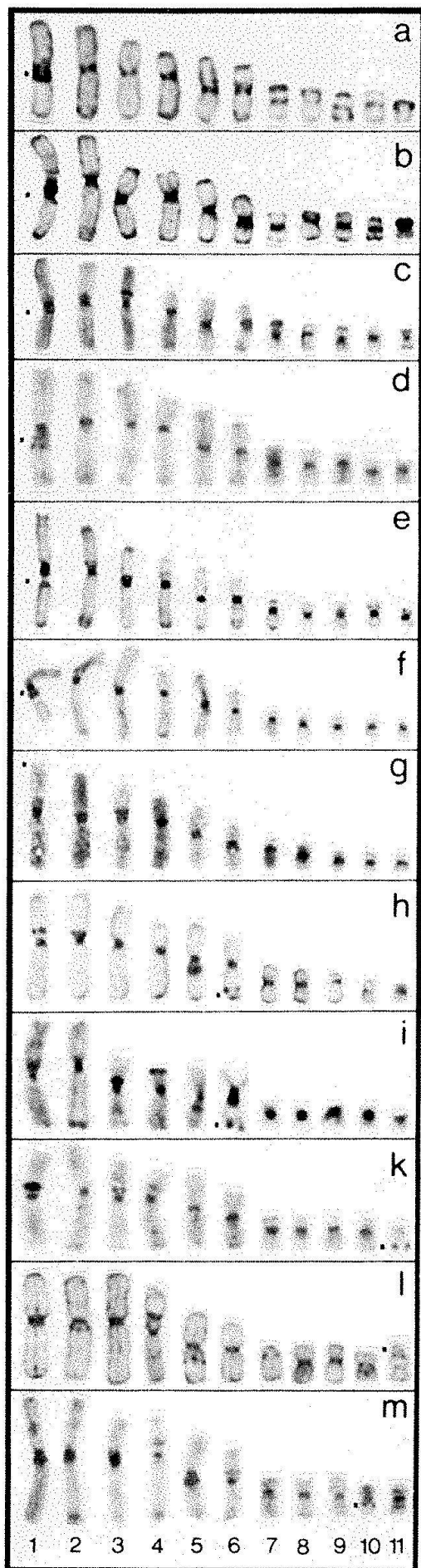
There are several characteristic features of the constitutive heterochromatin of the eucaryotic chromosomes: late DNA replication in the S-phase, condensed state in interphase nuclei, very large amounts of repetitive DNA sequences, differential staining with banding techniques, enhanced frequency of spontaneous or induced breakages, low crossover frequency in meiosis and genetic inertness. However, it is established that no class of constitutive heterochromatin possesses all of these features. It can therefore not be excluded that some of the heterochromatic chromosomal regions in the amphibian species studied to date were not revealed by the banding techniques used. A summary of the differential staining of the various chromatin classes with the different staining techniques employed is shown in table 2.

The amphibian chromosomes differ from most karyotypes in the other classes of vertebrates in the high frequency of constitutively heterochromatic regions. On most of the chromosomes analyzed the number of heterochromatic bands (C-bands) is largely independent of the length or the DNA-content of the chromosomes (Schmid, 1978a, b). The small chromosomes can contain just as many or even more heterochromatic regions as the largest chromosomes of the karyotypes (Fig. 5). This holds true for the highly evolved as well as for the primitive groups of Amphibia. Three heterochromatic regions can almost always be discerned on the chromosomes of the Anura: the centric region and the two telomeres. There are in addition occasionally 1-3 interstitial heterochromatic bands. The nucleolus organizer regions are always associated with the constitutive heterochromatin.

The interspecies-comparisons of the chromosomal position of the constitutive heterochromatin are of great importance. It has been shown, that although many species within each genus have a uniform basic banding pattern, there are always strong deviations from it in individual species (Schmid, 1978a, b; King, 1980). Thus, for instance although the chromosome morphology between the species from the genus *Bufo* with its $2n = 22$ chromosomes is very similar in general, the occurrence of large, brightly fluorescing heterochromatic regions (Fig. 4b) is restricted entirely to the chromosomes of the North American species. *Xenopus laevis* and *X. muelleri* also exhibit few differences with regard to chromosome morphology, yet only *X. muelleri* possesses extraordinarily large AT-rich heterochromatic regions (Pardue, 1974). *Rana erythraea* (Fig. 5u) can be mentioned as a further example, possessing significantly more interstitial heterochromatin than any of the other *Rana* species (Fig. 5 o-u). One of the more unusual features of Australian Hylidae of the genus *Litoria* is the shared similarity in gross chromosome morphology between the species, contrasted to the extensive C-banding variation (King, 1980). These examples were chosen to demonstrate that the heterochromatic patterns on the chromosomes of an amphibian species can change very rapidly. A connection between the heterochromatic pattern on the chromosomes and any evolutionary parameters could, except for the heteromorphic sex chromosomes (see below), not be established. It is absolutely possible that the distribution and amount of constitutive heterochromatin are very variable properties, which have significantly contributed to the chromosomal isolation mechanisms in evolution.

Fig. 4. Comparison of various banding methods performed on the chromosomes of several species of Anura. (a-d) Diploid karyotypes of *Bufo americanus*. (e-h) Diploid karyotypes of *Rana erythraea*. (i-m) Chromosome pairs of 11 anuran species on whom the nucleolus organizer regions are stained. Bufonidae: (B.g.) *Bufo garmani*. (B.m.) *B. marinus*. (B.a.) *Bufo arenarum*. (B.ma.) *B. mauritanicus*. (P.h.) *Pedostibes hosii*. Ranidae: (R.m.) *Rana macrodon*. (P.a.) *Pyxicephalus adspersus*. Rhacophoridae: (C.x.) *Chiromantis xerampelina*. Microhylidae: (K.p.) *Kaloula pulchra*. Pelobatidae: (P.f.) *Pelobates fuscus*.

(a, e, i) C-bands after the denaturation-reassociation-method. (b, g, l) Q-bands after direct staining with quinacrine mustard; note the brightly fluorescing (AT-rich) heterochromatic regions. (c, f, k) Direct staining with mithramycin; note the brightly fluorescing (GC-rich) heterochromatic regions. Compare the opposite banding patterns of the quinacrine- and mithramycin-stained heterochromatic bands. (d, h, m) AgNO_3 -staining for the specific labeling of the nucleolus organizer regions. Note that the nucleolus organizer regions which stained strongly with Ag show an extremely bright fluorescence with mithramycin (c, f, k). In (a-h) the nucleolus organizers are marked by dots to the left of the corresponding chromosomes.



Considerable differences can be found between the heterochromatic regions of homologous chromosomes in individual animals (Schmid, 1978a, b). This intra-individual variability is a general property of constitutive heterochromatin and is also found in all other vertebrate classes. It is attributed to unequal cross-over between the heterochromatic regions in meiosis. Fig. 5v shows several such variable heterochromatic regions in the karyotype of *Pachymedusa dachnicolor*. If, however, these heteromorphisms are restricted to one and the same chromosome pair in only one sex of a certain species, they may also be heteromorphic sex chromosomes (see below).

As already described for the chromosomes of other vertebrates, the constitutive heterochromatin in Amphibia is extremely heterogeneous. Thus, a denaturation in alkali for different lengths of time can be used for demonstrating specific heterochromatic regions, as is shown in the example of *Rana catesbeiana* (Fig. 5q, r).

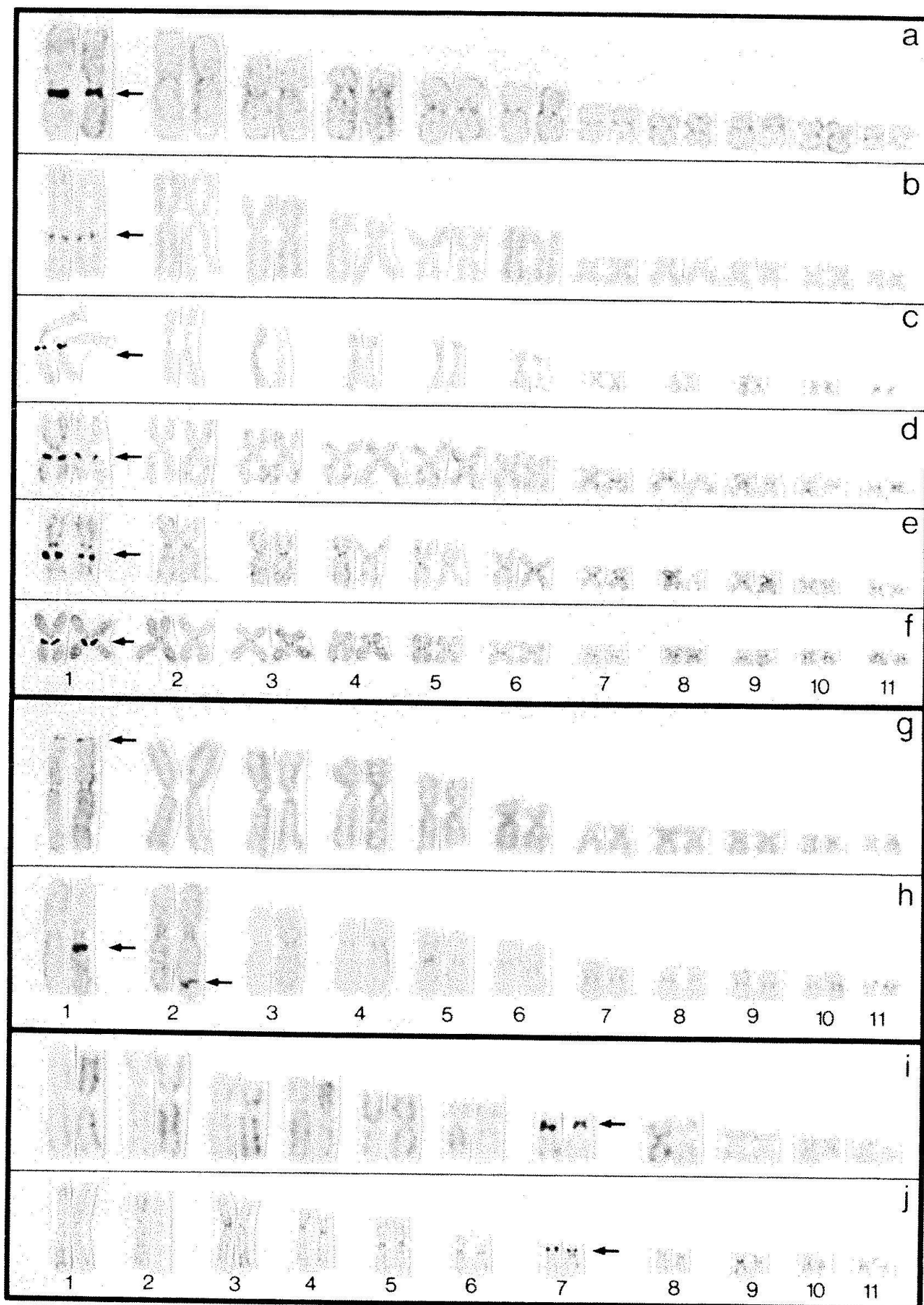
The analysis of urodelan chromosomes with the C-band technique and fluorochromes has hitherto been limited almost entirely to species of the family Salamandridae (genus *Triturus*) (Mancino et al., 1977; Ragghianti et al., 1978; Schmid and Krone, 1976; Schmid et al., 1979). In these species, the heterochromatic regions are primarily concentrated at the centric, para-centric and interstitial portions of the chromosomes (Fig. 9c-f). On the other hand, important experiments are being at this time performed on mitotic chromosomes and lampbrush chromosomes of the female meiosis of *Triturus* with the in situ hybridization technique of intermediately and highly repetitive DNA. This permits the precise determina-

tion of the chromosomal position (highly repetitive DNA is preferentially localised in the constitutive heterochromatin) of these DNA sequences (Macgregor and Andrews, 1977; Macgregor, 1979).

Nucleolus organizer regions (NORs)

The AgNO_3 staining method permits a quick and easy localization of the chromosomal NORs and thus opens a new way for interspecies comparison. It is feasible that karyotypes with one single homologous pair of NORs are more primitive than those, in which the NORs are scattered over several chromosomes (Hsu et al., 1975). Accordingly, the number of NORs has remained constant in the anuran family of Bufonidae despite multiple speciation (Fig. 6, 7). Although the NORs have reached the most chromosome pairs as whole packages by means of translocations (Fig. 6h) and inversions (Fig. 6g), they were not distributed in the genome as smaller units. In the karyotypes of species belonging to the same or closely related species-groups, the silver-stained NORs are always localized in the same chromosome regions. In North American toads (Fig. 6a-f) the pericentric region on the largest chromosome appears to be preferred as NOR. One single pericentric inversion on the same chromosome seems to have shifted the NORs in a terminal position (Fig. 6g). In contrast, the NORs in the South American toads are localized in the short arms of the chromosomes 7 (Fig. 6i, j), and are situated in different chromosomes in the Eurasian species (Fig. 7a-e). The NOR-carrying chromosomes No. 6 in those African toads with $2n = 20$ chromosomes (Fig. 7g-i) could have originat-

Fig. 5. The distribution of the constitutive heterochromatin (C-bands) on the chromosomes of various species of (a-m) Bufonidae, (n-u) Ranidae and (v) Hylidae. (a-u) Haploid karyotypes and (v) diploid karyotype. (a) *Bufo americanus*. (b) *B. fowleri*. (c) *B. terrestris*. (d) *B. valliceps*. (e) *B. compactilis*. (f) *B. punctatus*. (g) *B. boreas*. (h) *B. bufo*. (i) *B. viridis*. (k) *B. calamita*. (l) *B. parvus*. (m) *B. mauritanicus*. (n) *Rana erythraea*. (o) *R. sphenoccephala*. (p) *R. palustris*. (q, r) *R. catesbeiana*. (s) *R. ridibunda*. (t) *R. temporaria*. (u) *R. esculenta* and (v) *Pachymedusa dachnicolor*. The points on the left side of the chromosomes mark the position of the nucleolus organizer regions (compare with Figs. 6-8). Note the frequent localization of the constitutive heterochromatin in the centric regions and telomeres of the chromosomes. The nucleolus organizers are always associated with heterochromatin. (q, r) Demonstrates the different sensitivity of individual C-bands by prolonged pretreatment with alkali in *Rana catesbeiana*: (q) 5 min denaturation of the chromosomes in $\text{Ba}(\text{OH})_2$ results in a maximum number of C-bands; (r) 20 min denaturation leaves only the C-bands in chromosomes No. 7 and 8 remaining. (v) In the diploid karyotype of *Pachymedusa dachnicolor* those heterochromatic regions with variations between the homologous chromosomes are indicated by arrows.



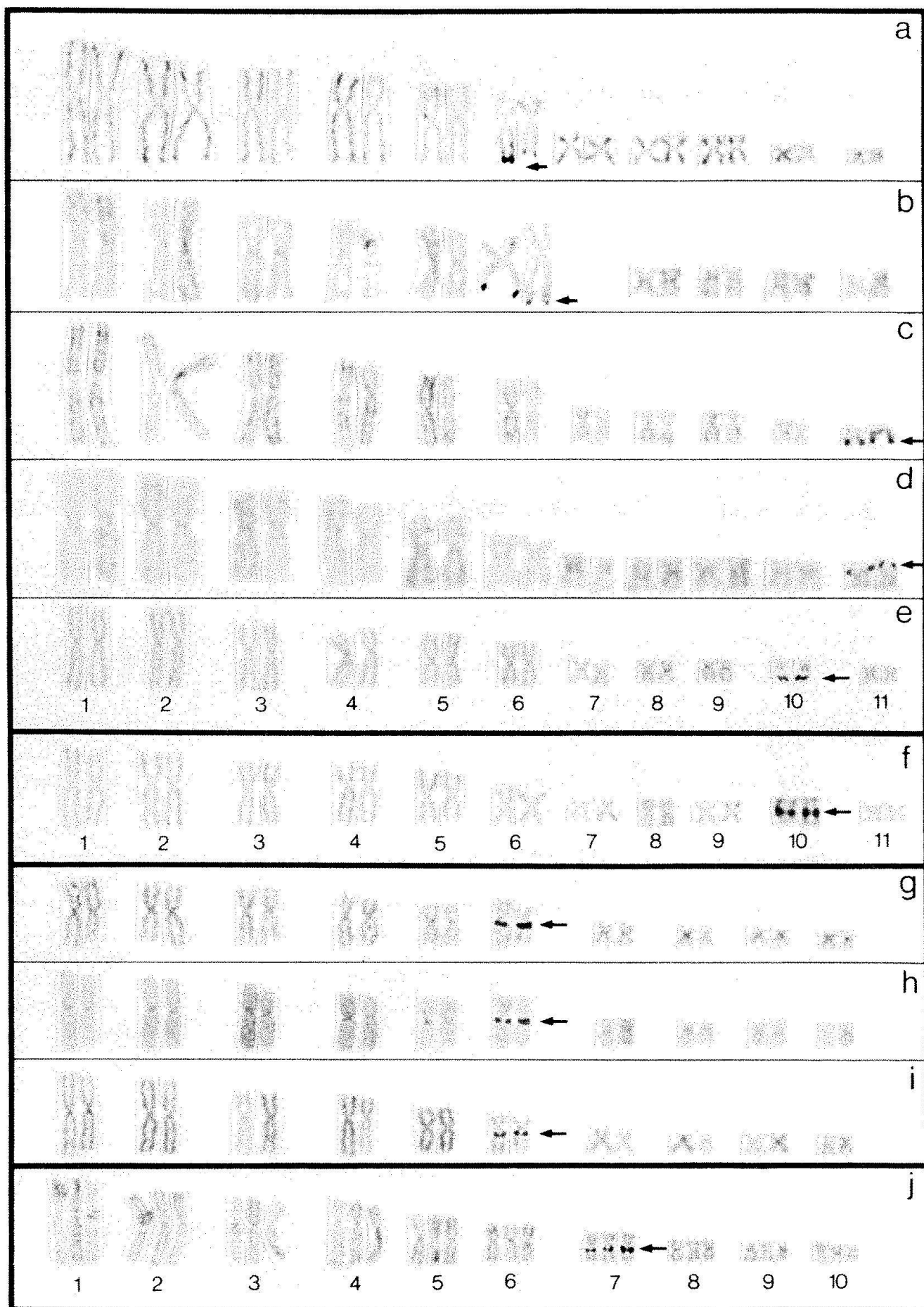
ed from the African species with $2n = 22$ chromosomes (Fig. 7f) by way of a fusion of the two small chromosomes, one of which contained the NOR. The genus *Rana* shows that other situations can also exist in the distribution of the NORs: most of the frogs of this genus have 26 metacentric and submetacentric chromosomes with 5 larger and 8 smaller pairs. They all have a pair of large NORs in the long arm of chromosome No. 10 (Fig. 8a–g). This position of the NORs would accordingly have remained preserved during evolution. Surprisingly, however some species have between 2 and 5 pairs of additional small NORs on the various smaller chromosome pairs (Fig. 8d–g). Since the morphology of the chromosomes remained very constant during the evolution of the *Rana*-karyotypes and since the large “standard NORs” in the chromosome 10 were preserved, one can duly ask in what way the additional NORs could have come to be in so many different positions in the karyotypes. Translocations and inversions could hardly have been responsible, as these would have altered the karyotypes of most species in the most various manners. One possible explanation is the mechanism of amplification of ribosomal cistrons in the Amphibia. It is known that during oogenesis the 18s and 28s rDNA is selectively amplified and used for the extrachromosomal nucleoli in the oocyte. There also exists the possibility, although as yet without experimental evidence, that these extrachromosomal rDNA might become reintegrated at various additional sites on the chromosomes (Buongiorno-Nardelli et al., 1972; Hourcade et al., 1974). This reintegration does not alter the morphology of the chromosomes. These examples show that a careful analysis of the localization of NORs can pose new questions about the evolution of amphibian karyotypes.

Sex chromosomes in Amphibia

Although numerous careful cytogenetic studies were performed with conventional cytogenetic methods (for reviews see Morescalchi, 1973; Singh, 1974) and with modern techniques, heteromorphic sex chromosomes could only be determined in very few species. These were all discovered in the last two years. It can be said in advance, that no uniform type of sex determination exists for either Anura or Urodela. Both orders exhibit the XX/XY-type as well as the ZZ/ZW-type of chromosomal sex determination.

In the Urodela, sex-specific chromosomes were determined in the family Salamandridae. Thus, in *Triturus alpestris* and *T. vulgaris* (Fig. 9c–f) the male animals have one heteromorphic chromosome pair, of which only one homologue displays heterochromatic telomeres in the long arms; the telomeres of the other homologue are euchromatic. In the female animals, this chromosome pair is found to be homomorphic and contains no telomeric heterochromatin (Fig. 9c–f). The cross-over frequency between the heteromorphic chromosome arms in the male meiosis of these species is highly reduced. In the male meiosis of *Triturus vulgaris*, the heteromorphic chromosomes No. 5 form bivalents with chiasmata exclusively in the short arms (Fig. 10a, b). After the chiasmata terminalize in the late diakinesis stage, the short arms of chromosomes No. 5 are always paired end-to-end, whereas the heteromorphic long arms point into opposite directions. During the meiosis of *Triturus alpestris*, the heteromorphic chromosomes 4 form bivalents with chiasmata in the long and short arms (Fig. 10e, f), as well as bivalents with the chiasmata exclusively in the short arms (Fig. 10c, d). Whenever chiasmata are present on both chromosome arms, the paired

Fig. 6. AgNO₃-stained nucleolus organizers (see arrows) in the diploid karyotypes of (a) *Bufo americanus*, (b) *B. fowleri*, (c) *B. terrestris*, (d) *B. valliceps*, (e) *B. compactilis* and (f) *B. punctatus*. All *Bufo*-species in (a–f) have their nucleolus organizers in the proximal portion of the long arms of the chromosomes No. 1. By way of a pericentric inversion, these nucleolus organizers can reach the telomeres of the short arms, as is the case in (g) *Bufo boreas*. Row (h) shows an exceptional karyotype of a *Bufo americanus* in which a reciprocal translocation had occurred between one chromosome No. 1 and 2: this places one of the nucleolus organizers onto a different chromosome. The karyotype of this animal was also examined by C-banding, which confirmed the reciprocal translocation. All *Bufo*-species in (a–h) are from North America. The two species in (i) *Bufo arenarum* and (j) *B. marinus* on the other hand are from South America; their nucleolus organizers are localized in the short arms of the chromosomes No. 7.



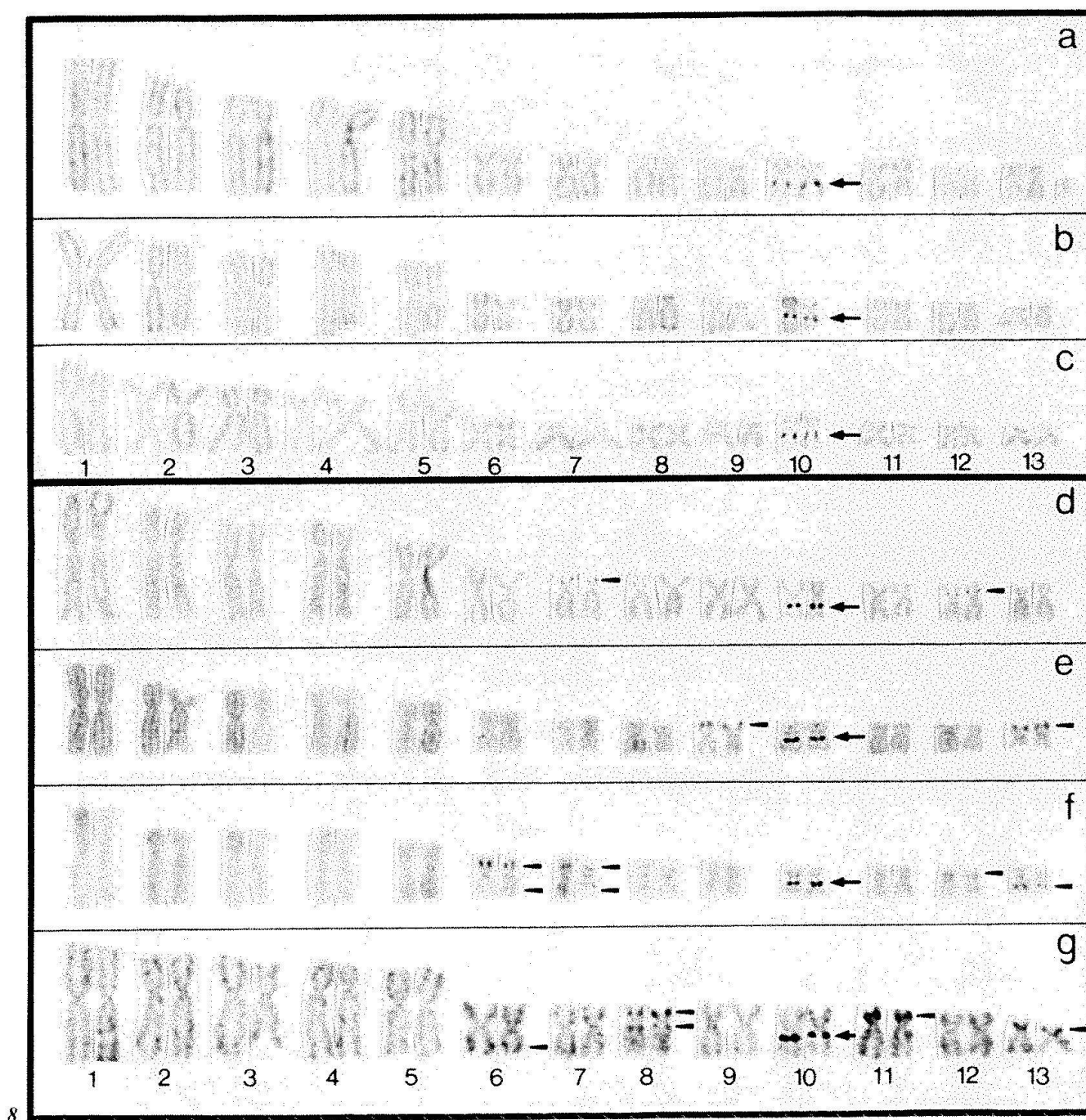
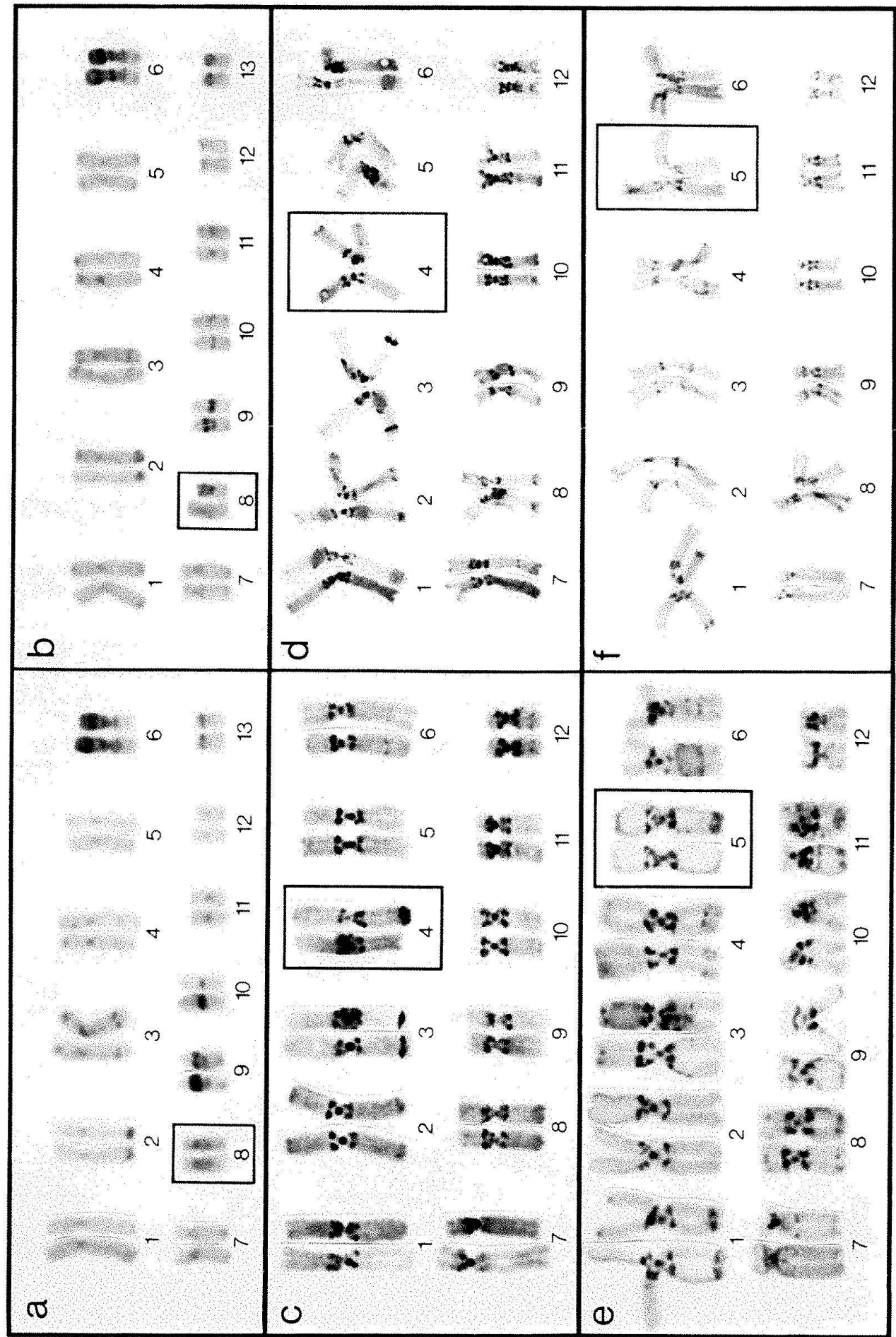


Fig. 8. AgNO₃-stained nucleolus organizers (see arrows) in the diploid karyotypes of (a) *Rana temporaria*, (b) *R. esculenta*, (c) *R. ridibunda*, (d) *R. catesbeiana*, (e) *R. sphenoccephala*, (f) *R. palustris* and (g) *R. erythraea*. The species (a-c) are indigenous to Central Europe, the species (d-f) to North America and (g) to Southeast Asia. All species have a large nucleolus organizer in the long arm of chromosome No. 10. In addition to this, this species in (d) display small nucleolus organizers in several chromosome pairs. Also note the supernumerary B-chromosome in the karyotype of (a) *Rana temporaria*.

Fig. 7. AgNO₃-stained nucleolus organizers (see arrows) in the diploid karyotypes of (a) *Bufo viridis*, (b) *B. bufo*, (c) *B. calamita*, (d) *B. parvus* and (e) *Pedostibes hosii*. These species are indigenous to the Eurasian region. They each possess one pair of nucleolus organizers. (f) *Bufo mauritanicus* is an African species possessing, like the *Bufo*-species in America, Europe and Asia $2n=22$ chromosomes. The African species (g) *Bufo garmani*, (h) *B. poweri* and (i) *B. regularis* on the other hand only have $2n=20$ chromosomes. In all three species, the nucleolus organizers are localized in the long arms of the chromosomes No. 6. Row (j) shows an exceptional triploid karyotype found in an animal classified as *Bufo poweri* (?). Note that the nucleolus organizers in this animal are localized in chromosome No. 7.



chromosomes 4 form ring-like bivalents after the chiasmata have terminalized (Fig. 10f). Whenever the chiasmata are located exclusively on the short arms, however, end-to-end paired bivalents, whose heteromorphic regions point into opposite directions, must develop (Fig. 10d). The homology between the long arms of the sex-specific chromosomes No. 4 of *Triturus alpestris* would therefore have been largely preserved. The homology of the long arms of the sex-specific chromosomes No. 5 of *Triturus vulgaris*, on the other hand, would be completely lost. The differentiation of the long chromosome arms has not influenced the homology between the short arms of the sex-specific chromosomes of these species. The C-band patterns and the pairing configurations of the sex-specific chromosomes in the male meiosis indicate that these urodelan species possess an XX/XY-type of sex determination. A review of the literature on experimental species hybrids, on the gonadic structure of haploid and polyploid animals and on sex-linked genes provided further evidence in favour of male heterogamety in *Triturus* (Schmid et al., 1979). Another case of XX/XY-type of sex determination was found in the family Proteidae: in the neotenic, perennibranch species *Necturus maculosus*, Sessions (1980) was able to demonstrate highly differentiated sex chromosomes in the males. The X and Y chromosomes differ greatly in size and morphology, the X being one of the largest biarmed chromosomes in the karyotype, the Y on the contrary being diminutive and composed almost entirely of constitutive heterochromatin. In the family Plethodontidae, certain neotropical bolitoglossines (*Thorius*, *Oedipina* and *Chiropterotriton*) have heteromorphic XX/XY-sex chromosomes (Léon and Kezer, 1978). Contrasting with this situation, there is a ZZ/ZW-type of sex determination without heteromorphic somatic sex chromosomes in *Pleurodeles*

waltlii (Salamandridae) and *Ambystoma mexicanum* (Ambystomatidae), as shown by the analysis of the sex of the progeny of sex-reversed females (Gallien, 1954; Humphrey, 1945).

In the Anura, the cytogenetic studies on the occurrence of heteromorphic sex chromosomes are marked by conflicting results. Although sex chromosomes were described in a total of 15 anuran species in the studies performed with the conventional techniques, none of these findings could stand up to a detailed re-examination with the improved methods (Singh, 1974; Schmid, 1980b). Non-cytogenetic methods showed that there is no uniform type of genetic sex determination in Anura. Thus, in *Xenopus laevis*, female heterogamety was clearly determined by analysing the sex of the progeny of sex-reversed females (Chang and Witschi, 1955). According to the study of Ponse (1942) on hermaphrodite animals, the females of *Bufo bufo* also seem to be heterogametic. On the other hand, investigations of the sex of parthenogenetically bred frogs and sex-reversal experiments in *Rana* and *Bombina* have always shown the male sex to be heterogametic (Kawamura and Nishioka, 1977). The only certified heteromorphic sex chromosomes in Anura to date were found in the South African frog *Pyxicephalus adspersus* (Ranidae) (Fig. 10a, b). All of the male animals of this species hitherto examined had ZZ sex chromosomes and all female animals had ZW sex chromosomes (Schmid, 1980). The W chromosome is considerably smaller than the Z chromosome and consists to a great portion of constitutive heterochromatin. The fact that of the heteromorphic sex chromosomes found in Amphibia to date it is always the Y- or W sex chromosome and never the X- or Z sex chromosome which constitutes the derived chromosome (with an increased amount of constitutive heterochromatin) indicates that they went through the

Fig. 9. Examples of heteromorphic sex chromosomes in Amphibia. The karyotypes show the pattern of the constitutive heterochromatin (C-bands). Male karyotypes are displayed in the left half, female karyotypes on the right. The sex chromosomes are framed. (a, b) *Pyxicephalus adspersus* from South Africa. (c, d) *Triturus alpestris* and (e, f) *Triturus vulgaris* from Central Europe. Note in (b) the highly heteromorphic sex chromosomes. No. 8 in the female sex of *Pyxicephalus adspersus* (ZW sex chromosomes). In (c) *Triturus alpestris* and (e) *T. vulgaris* the heteromorphism of the sex chromosomes is restricted to a small region of the telomeres in the long arms of the chromosomes No. 4 and No. 5, respectively (XY sex chromosomes). This small heteromorphism does not exist in the female karyotypes (d, f).

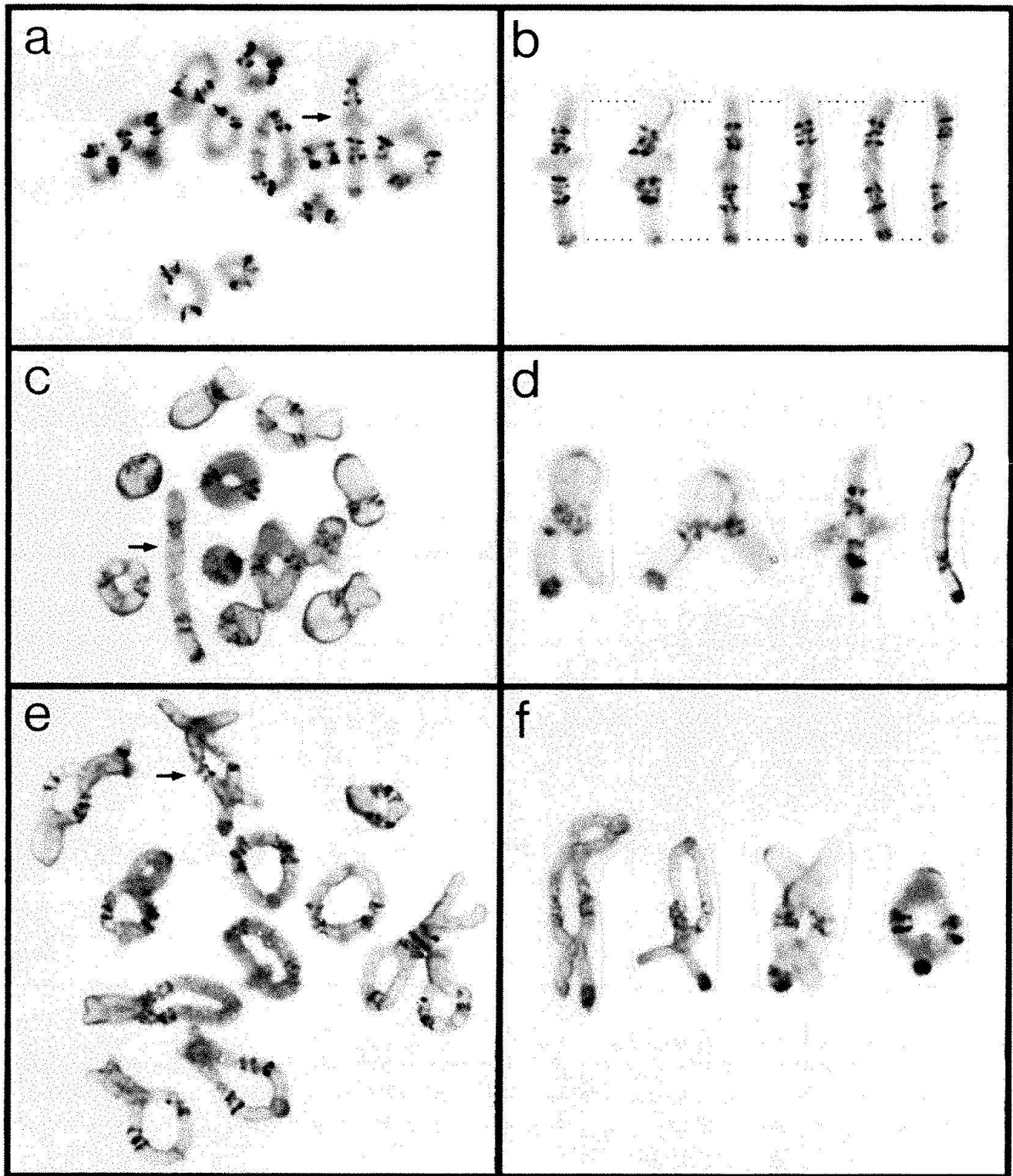


Fig. 10. Meiotic chromosomes from the male diakinesis of (a, b) *Triturus vulgaris* and (c-f) *Triturus alpestris*. The chromosomes exhibit the pattern of constitutive heterochromatin (C-bands). (a, c, e) represent complete diakineses, (b, d, f) each show several examples of paired XY sex chromosomes from different diakineses. In (a, b) *Triturus vulgaris* the XY sex chromosomes always pair end-to-end with their short arms, while the heteromorphic long arms point into the opposite direction. This is also the case in a part of the XY sex chromosomes from (c, d) *Triturus alpestris*; in some diakineses of this species, however, an additional chiasma is localized in the long arms of the XY bivalent (e, f). This permits the conclusion that the genetic homology still existing between the long arms of the sex chromosomes of *Triturus alpestris* is greater than that between the sex chromosomes of *Triturus vulgaris*.

same stages in their morphological and molecular differentiation as did the sex chromosomes of snakes, birds and mammals (Singh et al., 1976, 1980).

Rates of chromosomal- and protein evolution in Amphibia

Wilson et al. (1974) compared the relative rates of protein (albumin) evolution and chromosomal evolution in Bufonidae, Ranidae, Hylidae (i.e. highly evolved Anura) and mammals. It was found that the average rate of change in the chromosome number was about 20 times faster in mammals than in frogs. Mammals differing in only 6 albumin units had a 50% chance of having a different chromosome number, whereas in frogs the same amount of molecular difference occurred between species of identical chromosome number. Assuming that the rate of mutant substitutions in albumin was the same in mammals as in frogs (1.7 units per 10^6 years), the estimated rate of change in the chromosome number was calculated to be 1 every 3.5×10^6 years in mammals, whereas in frogs it was only 1 every 70×10^6 years (!). Since, however, these investigations were exclusively conducted on those families of Anura with extremely conservative karyotypes, they are not necessarily representative of the Amphibia. Those groups distinguished by a very variable diploid chromosome number should also be studied under this aspect. Our understanding of the chromosomal evolution in Amphibia will in the coming years be considerably expanded by the combination of the cytogenetic data and serological and biochemical methods of investigation.

Acknowledgments

I am very indebted to Miss Christine Klett for her excellent technical assistance and to Professor Dr. W. Krone and Professor Dr. W. Engel for their support in this work. This study was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft.

References

- Baldari, C.T., Amaldi, F.: DNA reassociation kinetics in relation to genome size in four amphibian species. *Chromosoma* 59: 13-22 (1976).
- Barrio, A., Pistol de Rubel, D.: Encuesta cariotípica de poblaciones argentino-uruguayas de *Odontophrynus americanus* (Anura, Leptodactylidae) relacionada con otros rasgos taxonómicos. *Physis* 31: 281-291 (1972).
- Barrio, A., Rinaldi de Chieri, P.: Relaciones cariosistémicas de los Ceratophryidae de la Argentina (Amphibia, Anura). *Physis* 30: 321-329 (1970a).
- Barrio, A., Rinaldi de Chieri, P.: Estudios citogenéticos sobre el *Pleurodema* y sus consecuencias evolutivas (Amphibia-Anura-Leptodactylidae). *Physis* 30: 309-319 (1970b).
- Batistic, R.F., Soma, M., Beçak, M.L., Beçak, W.: Further studies on polyploid amphibians: a diploid population of *Phyllomedusa burmeisteri*. *J. Hered.* 66: 160-162 (1975).
- Beçak, M.L., Beçak, W., Rabello, M.N.: Cytological evidence of constant tetraploidy in the bisexual South American frog *Odontophrynus americanus*. *Chromosoma* 19: 188-193 (1966).
- Beçak, M.L., Beçak, W., Rabello, M.N.: Further studies on polyploid amphibians (Ceratophryidae). I. Mitotic and meiotic aspects. *Chromosoma* 22: 192-201 (1967).
- Beçak, M.L., Denaro, L., Beçak, W.: Polyploidy and mechanisms of karyotypic diversification in Amphibia. *Cytogenetics* 9: 225-238 (1970).
- Bogart, J.P.: Chromosomes of the South American amphibian family Ceratophryidae with a reconsideration of the taxonomic status of *Odontophrynus americanus*. *Can. J. Genet. Cytol.* 9: 531-542 (1967).
- Bogart, J.P.: Systematic problems in the amphibian family Leptodactylidae (Anura) as indicated by karyotypic analysis. *Cytogenetics* 9: 369-383 (1970).
- Bogart, J.P.: Evolutionary implications of polyploidy in amphibians and reptiles. In: Polyploidy. Biological relevance. (W.H. Lewis, ed.), pp. 341-378. Plenum Press: New York 1980.
- Bogart, J.P., Tandy, M.: Polyploid amphibians: three more diploid-tetraploid cryptic species of frogs. *Science* 193: 334-335 (1976).
- Bogart, J.P., Wassermann, A.O.: Diploid-polyploid cryptic species pair: a possible clue to evolution by polyploidization in anuran amphibians. *Cytogenetics* 11: 7-24 (1972).
- Bostock, C.J., Sumner, A.T.: The eukaryotic chromosome. North Holland Publishing Company: Amsterdam-New York-Oxford 1978.
- Britten, R.J., Davidson, E.H.: Repetitive and non-repetitive DNA sequences and a speculation on the origins of evolutionary novelty. *Quart. Rev. Biol.* 46: 111-138 (1971).
- Britten, R.J., Kohne, D.E.: Repeated sequences in DNA. *Science* 161: 529-540 (1968).
- Brown, D.D., Dawid, I.B.: Specific gene amplification in oocytes. *Science* 160: 272-280 (1968).
- Brown, D.D., Wensink, P.C., Jordan, E.: A comparison of the ribosomal DNAs of *Xenopus laevis* and *Xenopus mulleri*: the evolution of tandem genes. *J. Mol. Biol.* 63: 57-73 (1972).
- Buongiorno-Nardelli, M., Amaldi, F., Lava-Sanchez, P.A.: Amplification as a rectification mechanism for the redundant rRNA genes. *Nature New Biol.* 238: 134-137 (1972).
- Chang, C.Y., Witschi, E.: Breeding of sex-reversed

- males of *Xenopus laevis* Daudin. *Proc. Soc. exp. Biol. and Med.* 89: 150-152 (1955).
- Comings, D.E.: The structure and function of chromatin. *Advanc. Hum. Genet.* 3: 237-431 (1975).
- Commoner, B.: DNA and the chemistry of inheritance. *Am. Scientist* 52: 365-388 (1964).
- Downs, F.L.: Unisexual Ambystoma from the Bass Islands of Lake Erie. *Ocass. Pap. Mus. Zool. Univ. Mich.* 685: 1-36 (1978).
- Dutrillaux, B.: Sur la nature et l'origine des chromosomes humains. *Monogr. Annal. Génét. L'Expansion Scientifique*: Paris 1975.
- Dutrillaux, B., de Grouchy, J., Finaz, C., Lejeune, J.: Mise en évidence de la structure fine des chromosomes humains par digestion enzymatique (pronase en particulier). *C.R. Acad. Sci.* 273: 587-588 (1971).
- Ferrier, V., Jaylet, A.: Induction of triploidy in the newt *Pleurodeles waltlii* by heat shock or hydrostatic pressure. Interpretation of the different types of ploidy using a chromosomal marker. *Chromosoma* 69: 47-63 (1978).
- Gall, J.G., Pardue, M.L.: Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc. nat. Acad. Sci.* 63: 378-383 (1969).
- Gallien, L.: Démonstration de l'homogamétie du sexe mâle chez le Triton *Pleurodeles waltlii* Michah. par l'étude de la descendance d'animaux à sexe physiologique inversé, après un traitement hormonal gynogène (benzoate d'oestradiol). *C. R. Acad. Sci.* 238: 402-404 (1954).
- Goin, O.B., Goin, C.J., Bachmann, K.: DNA and amphibian life history. *Copeia* 1968: 532-540 (1968).
- Goodpasture, C., Bloom, S.E.: Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma* 53: 37-50 (1975).
- Günther, R.: Der Karyotyp von *Rana ridibunda* und das Vorkommen von Triploidie bei *Rana esculenta* L. (Anura, Amphibia). *Biol. Zbl.* 89: 327-342 (1970).
- Günther, R.: Zum natürlichen Vorkommen und zur Morphologie triploider Teichfrösche. *Rana esculenta* L. in der DDR (Anura, Ranidae). *Mitt. Zool. Mus. Berl.* 51: 145-158 (1975).
- Hennig, W.: Molecular hybridization of DNA and RNA in situ. *Intern. Rev. Cytol.* 36: 1-44 (1973).
- Hennig, W.: In situ hybridization of nucleic acids. *Trends Biochem. Sci.* 1: 285-288 (1976).
- Hourcade, D., Dressler, D., Wolfson, J.: The nucleolus and the rolling circle. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 38: 537-550 (1974).
- Hsu, T.C., Spirito, S.E., Pardue, M.L.: Distribution of 18S+28S ribosomal genes in mammalian genomes. *Chromosoma* 53: 25-36 (1975).
- Humphrey, R.R.: Sex determination in ambystomid salamanders: a study of the progeny of females experimentally converted into males. *Am. J. Anat.* 76: 33-66 (1945).
- Jalal, S.M., Clark, R.W., Hsu, T.C., Pathak, S.: Cytological differentiation of constitutive heterochromatin. *Chromosoma* 48: 391-403 (1974).
- Kawamura, T., Nishioka, M.: Aspects of the reproductive biology of Japanese anurans. In: *The reproductive biology of amphibians*. (D.H. Taylor, S.I. Guttman, eds.), pp. 103-139. Plenum Publishing Corporation: New York-London 1977.
- King, M.: C-banding studies on Australian hyliid frogs: secondary constriction structure and the concept of euchromatin transformation. *Chromosoma* 80: 191-217 (1980).
- León, P.E., Kezer, J.: Localisation of 5S RNA genes on chromosomes of plethodontid salamanders. *Chromosoma* 65: 213-230 (1978).
- Macgregor, H.C.: In situ hybridization of highly repetitive DNA to chromosomes of *Triturus cristatus*. *Chromosoma* 71: 57-64 (1979).
- Macgregor, H.C., Andrews, C.: The arrangement and expression of "middle repetitive" DNA sequences on lampbrush chromosomes of *Triturus*. *Chromosoma* 63: 109-126 (1977).
- Macgregor, H.C., Horner, H., Owen, C.A., Parker, I.: Observations on centromeric heterochromatin and satellite DNA in salamanders of the genus *Plethodon*. *Chromosoma* 43: 329-348 (1973).
- Mancino, G., Ragghianti, M., Bucci-Innocenti, S.: Cytotaxonomy and cytogenetics in European newt species. In: *The reproductive biology of amphibians*. (D.H. Taylor and S.I. Guttman, eds.), pp. 411-447. Plenum Publishing Corporation: New York-London 1977.
- Matthey, R.: L'évolution de la formule chromosomale chez les vertébrés. *Experientia* 1: 50-56, 78-86 (1945).
- Mazik, E.Yu., Kadyrova, B.K., Toktosunov, A.T.: Peculiarities of the karyotype of the green toad (*Bufo viridis*) of Kirghizia. *Zool. Zh.* 55: 1740-1742 (in Russian).
- Mizuno, S., Macgregor, H.C.: Chromosomes, DNA sequences and evolution in salamanders of the genus *Plethodon*. *Chromosoma* 48: 239-296 (1974).
- Morescalchi, A.: Note citotassonomiche su *Ascaphus truei* Stejn. (Amphibia, Salientia). *Atti. Soc. pelorit. Sci. fis. mat. nat.* 13: 23-30 (1976).
- Morescalchi, A.: Il cromosomi de alcuni Pipidae (Amphibia, Salientia). *Experientia* 24: 81-82 (1968).
- Morescalchi, A.: The karyotypes of two specimens of *Leiopelma hochstetteri* Fitz. (Amphibia, Salientia). *Caryologia* 21: 37-46 (1968).
- Morescalchi, A.: Comparative karyology of the Amphibia. *Boll. Zool.* 38: 317-320 (1971).
- Morescalchi, A.: Amphibia. In: *Cytotaxonomy and vertebrate evolution*. (A.B. Chiarelli, E. Capanna, eds.), pp. 233-348. Academic Press: London-New York 1973.
- Morescalchi, A.: Chromosome evolution in the caudate Amphibia. In: *Evolutionary biology* 8. (T. Dobzhansky, M.K. Hecht, W.C. Steere, eds.), pp. 338-387. Plenum Press: New York 1975.
- Morescalchi, A.: New developments in vertebrate cytology. I. Cytotaxonomy of the amphibians. *Genetica* 50: 179-193 (1979).
- Morescalchi, A.: Phylogenetic aspects of karyological evidence. In: *Major patterns in vertebrate evolution*. (M.K. Hecht, P.C. Goody, B.M. Hecht, eds.), pp. 149-165. Plenum Publishing Corporation: New York 1977.
- Morescalchi, A., Olmo, E.: Sirenids: a family of polyploid urodeles? *Experientia* 30: 491-492 (1974).
- Morescalchi, A., Serra, V.: DNA renaturation kinetics in some paedogenetic urodeles. *Experientia* 30: 487-489 (1974).

- Ohno, S.: Evolution by gene duplication. Springer: Berlin 1970.
- Pardue, M.L.: Localization of repeated DNA sequences in *Xenopus* chromosomes. Cold Spr. Harbor Symp. quant. Biol. 38, 475-482 (1974).
- Pisanetz, Ye.M.: New polyploid species of *Bufo danatensis* Pisanetz, sp. nov., from the Turkmen SSR. Sopov. Akad. Nauk. Ukr. Rsp. Ser. B. Heol. Biol. Nauky 3, 277-282 (1978) (in Ukrainian).
- Ponse, K.: Sur la digamétie du crapaud hermaphrodite. Rev. Suisse Zool. 49, 185-189 (1942).
- Ragghianti, M., Bucci-Innocenti, S., Mancino, G.: Karyology of the carpathian newt *Triturus montandoni* and cytotaxonomic considerations on the species group *T. vulgaris* (Urodela: Salamandridae). Caryologia 31: 243-256 (1978).
- Romer, A.S.: Vertebrate Palaeontology. University of Chicago Press: Chicago 1966.
- Schmalhausen, I.I.: The origin of terrestrial vertebrates. Academic Press: New York 1968.
- Schmid, M.: Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. Chromosoma 66: 361-388 (1978a).
- Schmid, M.: Chromosome banding in Amphibia. II. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in Ranidae, Microhylidae and Rhacophoridae. Chromosoma 68: 131-148 (1978b).
- Schmid, M.: Chromosome banding in Amphibia. IV. Differentiation of GC- and AT-rich chromosome regions in Anura. Chromosoma 77: 83-103 (1980a).
- Schmid, M.: Chromosome banding in Amphibia. V. Highly differentiated ZW/ZZ sex chromosomes and exceptional genome size in *Pyxicephalus adspersus* (Anura, Ranidae). Chromosoma 80: 69-96 (1980b).
- Schmid, M., Krone, W.: The relationship of a specific chromosomal region to the development of the acrosome. Chromosoma 56: 327-347 (1976).
- Schmid, M., Olert, J., Klett, C.: Chromosome banding in Amphibia. III. Sex chromosomes in *Triturus*. Chromosoma 71: 29-55 (1979).
- Schnedl, W., Breitenbach, M., Mikelsaar, A.-V., Stranzinger, G.: Mithramycin and DIPI: a pair of fluorochromes specific for GC- and AT-rich DNA respectively. Hum. Genet. 36: 299-305 (1977).
- Schwarzacher, H.G., Mikelsaar, A.-V., Schnedl, W.: The nature of the Ag-staining of nucleolus organizer regions. Electron- and light-microscopic studies on human cells in interphase, mitosis, and meiosis. Cytogenet. Cell Genet. 20: 24-39 (1978).
- Schweizer, D.: Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. Chromosoma 58: 307-324 (1976).
- Seabright, M.: The use of proteolytic enzymes for the mapping of structural rearrangements in the chromosomes of man. Chromosoma 36, 204-210 (1972).
- Sessions, S.K.: Evidence for a highly differentiated sex chromosome heteromorphism in the salamander *Necturus maculosus* (Rafinesque). Chromosoma 77: 157-168 (1980).
- Seto, T., Nussbaum, R.A.: Mitotic and meiotic chromosomes of *Ichthyophis orthoplicatus* Taylor (Amphibia: Gymnophiona). Caryologia 29: 317-331 (1976).
- Singh, L.: Present status of sex chromosomes in amphibians. The Nucleus 17, 17-27 (1974).
- Singh, L., Purdom, I.F., Jones, K.W.: Satellite DNA and evolution of sex chromosomes. Chromosoma 59: 43-62 (1976).
- Singh, L., Purdom, I.F., Jones, K.W.: Sex chromosome associated satellite DNA: evolution and conservation. Chromosoma 79: 137-157 (1980).
- Stephenson, E.M., Robinson, E.S., Stephenson, N.G.: Karyotypic variation within the genus *Leiopelma* (Amphibia: Anura). Can. J. Genet. Cytol. 14, 691-702 (1972).
- Stephenson, E.M., Robinson, E.S., Stephenson, N.G.: Inter-specific relationships of *Leiopelma* (Amphibia: Anura): further karyological evidence. Experientia 30: 1248-1250 (1974).
- Straus, N.A.: Comparative DNA renaturation kinetics in amphibians. Proc. Nat. Acad. Sci. 68: 799-802 (1971).
- Thiébaud, C.H., Fischberg, M.: DNA content in the genus *Xenopus*. Chromosoma 59: 253-257 (1977).
- Tompkins, R.: Triploid and gynogenetic diploid *Xenopus laevis*. J. Exp. Zool. 203, 251-256 (1978).
- Tymowska, J., Fischberg, M.: The karyotype of *Xenopus wittei* Tinsley, Kobel, and Fischberg, another tetraploid anuran species (Pipidae). Cytogenet. Cell Genet. 28: 208-212 (1980a).
- Tymowska, J., Fischberg, M.: The karyotype of the hexaploid species *Xenopus ruwenzoriensis* Fischberg and Kobel (Anura: Pipidae). Cytogenet. Cell Genet. 27, 39-44 (1980b).
- Tymowska, J., Fischberg, M., Tinsley, R.C.: The karyotype of the tetraploid species *Xenopus vestitus* Laurent (Anura: Pipidae). Cytogenet. Cell Genet. 19: 344-354 (1977).
- Uzzel, T.: Natural triploidy in salamanders related to *Ambystoma jeffersonianum*. Science 139: 113-115 (1963).
- Wassermann, A.O.: Polyploidy in the common tree toad *Hyla versicolor* Le Conte. Science 167: 385-386 (1970).
- Wilson, A.C., Sarich, V.M., Maxson, L.R.: The importance of gene rearrangement in evolution: evidence from studies on rates of chromosomal, protein, and anatomical evolution. Proc. Nat. Acad. Sci. 71: 3028-3030 (1974).
- Ziswiler, V.: Die Wirbeltiere 1. Thieme: Stuttgart 1976.

Address of the author:

Dr. Michael Schmid
Institut für Humangenetik
Universität Würzburg
Koellikerstraße 2
D-8700 Würzburg

Polyploide, haploide, aneuploide *Xenopus*

Hans Rudolf Kobel

Abweichungen von der Diploidie stellen bei Säugetieren meistens eine letale genetische Konstitution dar. Befunde sind hauptsächlich vom Menschen bekannt (Friedrich & Nielsen, 1973; Boué et al., 1974), wo Triploidie und autosomale Trisomien zu spontanem Abortus oder zu stark verminderter Lebensfähigkeit, begleitet von charakteristischen Syndromen, führen. Amphibien, besonders die Afrikanischen Krallenfrösche der Gattung *Xenopus* eignen sich vorzüglich, um solche abweichende Zustände experimentell zu erzeugen.

Polyploidie

Triploide Individuen können durch Blockierung der zweiten meiotischen Reifeteilung der Eier erzeugt werden, und zwar mittels Hitze (Smith, 1958), Kälte (Kawahara, 1978) oder Druck (Müller et al., 1978; Tompkins, 1978). Höher polyploide (tetraploide, pentaploide) Tiere lassen sich auf analoge Weise mit Hilfe der spontan von Artbastarden produzierten, diploiden Eier herstellen (Tab. 1). Diploide Eier entstehen aus spontan endoreduplizierten Oozyten, wobei sich die verdoppelten Chromosomen jeder Art für sich zu Bivalenten paaren; die Meiose teilt somit dem Eikern je einen vollständigen Chromosomensatz beider Arten zu (Kobel & Du Pasquier, 1975; Müller, 1977). Solcherart experimentell entstandene Polyploide sind normal lebensfähig.

Die Arten der Gattung *Xenopus* selbst stellen bezüglich sowohl der Chromosomenzahl (Tymowska, 1976) wie auch der DNA-Menge (Thiébaud & Fischberg, 1977) eine polyploide Reihe in den Verhältnissen 2:4:8:12 dar, wobei die Mehrzahl der Arten polyploide sind (Tab. 1). Aus verschiedenen Gründen bezeichnen wir jedoch Arten mit $2n = 36$ weiterhin als diploid, Arten mit $2n = 72$ und

$2n = 108$ aber als polyploid, da deren Chromosomensätze Vielfache des 36er Karyotyps sind.

Haploidie

Befruchtung der Eier mit UV-bestrahlten Spermien führt zu gynogenetischer Entwicklung; einzig der Eikern steuert genetische Information bei. Analog lassen sich androgenetische Zygoten durch Bestrahlung des Eikernes herstellen. Haploidie bewirkt bei *Xenopus* charakteristische Entwicklungsstörungen, welche als Haploidie-Syndrom bekannt sind und in Verlauf der Embryogenese zum Tode führen (Hamilton, 1963). Haploidie ist bei *Xenopus* Arten aller Ploidiestufen letal (Tab. 1); getestet wurden *X. l. laevis* $2n = 36$, *X. vestitus* $2n = 72$ und *X. ruwenzoriensis* $2n = 108$. Ausnahme ist letztere Art mit der höchsten Chromosomenzahl, bei welcher ein geringer Prozentsatz haploider Tiere die Metamorphose überlebt. Polyploide *Xenopus* Arten sind offenbar in funktioneller Hinsicht diploidisiert, d.h. viele Gene sind trotz der multiplizierten Chromosomenzahl nur als einzelne Allelenpaare vorhanden (Verlust überzähliger Allele durch Mutation?). Die Ursachen der Letalität bei haploider Konstitution sind unbekannt.

Aneuploidie

Mit Hilfe der speziellen Chromosomenverteilung bei triploiden Bastard-Oozyten lassen sich hypo- und hyperdiploide Zygoten herstellen (Tab. 2). Triploide Bastardweibchen, welche 2 Chromosomensätze der Art A und 1 der Art B enthalten, entstehen bei der Befruchtung endoreduplizierter diploider Eier von Bastardweibchen AB mit Spermien der Art A. In den Oozyten solcher Tiere

Tab.1 Experimentelle und natürliche Polyploidie bei *Xenopus*, sowie Haploidie durch gynogenetische Entwicklung von 3 Arten verschiedenen Polyploidie-Grades (*X.l.laevis* $2n = 36$, *X.vestitus* $2n = 72$, *X.ruwenzoriensis* $2n = 108$). Pk = zweiter Polkörper, Sp = Spermium.

Experimentell (♀;♂ 2n = 36)						Anzahl Chromosomen	Natürliche Arten		
Diploide Oozyten			Endoreduplizierte Bastard-Oozyten				Anzahl Arten	Gynogenetische Entwicklung	
Ei	Pk	Sp	Ei	Pk	Sp				
+	-	-				letal	18	1 (2n=20)	letal
-	-	+							
+	-	+				lebensfähig	36	7	letal
+	+	-	+	-	-				
+	+	+	+	-	+				
			+	+	-				
			+	+	+				
							54	3	letal; bedingt lebensfähig
						72			
						90			
						108			
								1	

paaren sich die homologen Chromosomen A zu Bivalenten, wogegen die Chromosomen B als Univalente verbleiben (Müller, pers. Mitteilung). Bivalente Chromosomenpaare werden während der Reifeteilungen normal, univalente Einzelchromosomen aber zufällig verteilt. Nach der Meiose enthält der Kern solcher Eier somit einen vollständigen Chromosomensatz der Art A und zusätzlich eine variable Anzahl zufällig zugeteilter Chromosomen der Art B. Durch Befruchtung mit Spermien der Art A entstehen Zygoten mit überzähligen Chromosomen (hyperdiploide mit Trisomien), durch Befruchtung mit UV-bestrahlten Spermien solche mit zu wenig Chromosomen (hypodiploide mit Monosomien). Hypodiploide sind alle letal; häufig ist auch das Haploidie-Syndrom zu beobachten. Hyperdiploide zeigen eine hohe Sterblichkeit, etwa die Hälfte der Embryonen überleben als Kaulquappen, 2-3% als Adulte. Bei adulten hyperdiploiden *Xenopus* wurden bis jetzt 8-16 überzählige Chromosomen festgestellt (Kobel et al., 1979).

Abweichungen von der normalen diploiden Konstitution wirken sich also bei *Xenopus* wesentlich anders aus als bei Säugetieren; nicht nur mehrfache Polyploidie, sondern

auch Aneuploidie mit einer Vielzahl von Trisomien ist mit Lebensfähigkeit vereinbar. Warum *Xenopus* in Vergleich zu Säugern oder auch *Drosophila* eine so viel grössere Toleranz gegenüber Abweichungen von der Diploidie aufweisen, ist vorläufig unbekannt. Erklärungsversuche wie z.B. genetische Inaktivität überzähliger, artfremder Chromosomen oder ganzer Chromosomensätze, konnten widerlegt werden (Du Pasquier et al., 1977; Du Pasquier & Kobel, 1979; Kobel & Du Pasquier, 1979). Andererseits könnten *Xenopus* für manche Gene poly-

Tab.2 Produktion von hypo- und hyperdiploiden Zygoten mittels triploider *Xenopus* Bastardweibchen

Triploide Bastardweibchen zwischen den Arten A und B ($2n = 36$) (Genetische Konstitution: $18A + 18A + 18B$ Chromosomen)

Oozyten	: $18AA$ Bivalente + $18B$ Univalente
Meiose	: Bivalente = normale, Univalente = zufällige Chromosomenverteilung
Eikerne	: $18A + (0-18) B$ Chromosomen
Zygoten	
gynogenetisch	: $18A + (0-18) B$ = hypodiploid, Monosomien, letal
befruchtet	: $36AA + (0-18) B$
mit Sperm. A	= hyperdiploid, Trisomien, bedingt lebensfähig

ploid sein, wobei die Genbalance durch eine Gendosis mehr oder weniger nicht wesentlich gestört würde. Bei Arten mit 36 Chromosomen bestehen Hinweise sowohl für eine polyallele Konstitution bestimmter Gene, wie auch für das Vorhandensein nur 1 Allelenpaares andere Gene betreffend.

Praktische Anwendung finden hyperdiploide Bastarde in der Genkartierung bei *Xenopus* (Kobel & Du Pasquier, 1979), und endoreduplizierte Eier von Bastardweibchen zur Herstellung von Klonen isogener diplo- und tetraploider Frösche (Kobel & Du Pasquier, 1975; 1977).

Literatur

- Boué J.G. and Boué A.: Chromosomal anomalies in early spontaneous abortion. In: Developmental biology and pathology. Gropp A. and Benirschke K. (eds.), p.193. Berlin, Heidelberg, New York: Springer 1976.
- Du Pasquier L., Miggiano V.C., Kobel H.R. and Fischberg M.: The genetic control of histocompatibility reactions in natural and laboratory-made polyploid individuals of the Clawed Toad *Xenopus*. *Immunogenetics* 5: 129-141 (1977).
- Du Pasquier L. and Kobel H.R.: Histocompatibility antigens and immunoglobulin genes in the Clawed Toad: Expression and linkage studies in recombinant and hyperdiploid *Xenopus* hybrids. *Immunogenetics* 8: 299-310 (1979).
- Friedrich U. and Nielsen J.: Chromosome studies in 5049 consecutive newborn children. *Clin. Genet.* 4: 333-343 (1973).
- Hamilton L.: An experimental analysis of the development of the haploid syndrome in embryos of *Xenopus laevis*. *J. Embryol. Exptl. Morphol.* 11: 267-278 (1963).
- Kawahara H.: Production of triploid and gynogenetic diploid *Xenopus* by cold treatment. *Develop., Growth and Differ.* 20: 227-236 (1978).
- Kobel H.R. and Du Pasquier L.: Production of large clones of histocompatible, fully identical Clawed Toads (*Xenopus*). *Immunogenetics* 2: 87-91 (1975).
- Kobel H.R. and Du Pasquier L.: Strains and species of *Xenopus* for immunological research. In: Symp. Dev. Immunobiol.; Solomon J.B. and Horton J.D. (eds.), p.299 (Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam-New York-Oxford, 1977).
- Kobel H.R. and Du Pasquier L.: Hyperdiploid species hybrids for gene mapping in *Xenopus*. *Nature* 279: 157-158 (1979).
- Kobel H.R., Egens de Sasso M. and Zlotowsky Ch.: Developmental capacity of aneuploid *Xenopus* species hybrids. *Differentiation* 14: 51-58 (1979).
- Müller W.P.: Diplotene chromosomes of *Xenopus* hybrid oocytes. *Chromosoma (Berl.)* 59: 273-282 (1977).
- Müller W.P., Thiébaud Ch., Ricard L. and Fischberg M.: The induction of triploidy by pressure in *Xenopus laevis*. *Rev. Suisse Zool.* 85: 20-26 (1978).
- Smith S.: Induction of triploidy in the South African clawed frog, *Xenopus laevis* (Daudin). *Nature* 181: 290 (1958).
- Thiébaud Ch. and Fischberg M.: DNA content in the genus *Xenopus*. *Chromosoma (Berl.)* 59: 253-257 (1977).
- Tompkins R.: Triploid and gynogenetic diploid *Xenopus laevis*. *J. Exp. Zool.* 203: 251-256 (1978).
- Tymowska J.: A karyotype analysis of the genus *Xenopus* (Anura, Pipidae). Ph.D. Thesis No. 1781, University of Geneva 1976.

Adresse des Autors:

Dr. Hans Rudolf Kobel
Laboratoire de Génétique animale et végétale
Université de Genève
Route de Malagnou
1224 Chêne-Bougeries

Karyologische Entwicklungen in der Klasse Reptilia

Walter Sachsse

Die sogenannten Kriechtiere besitzen im Gegensatz zu anderen Tierklassen gerade kaum Merkmale, die sie verbinden und gleichzeitig gegen andere absetzen, wie zum Beispiel Federn oder Milch. Als Reptilien werden die ältesten noch lebenden Amnioten, überwiegend wechselwarm, mit beschuppter, oft verdickter Haut zusammengefasst. Im Baum der Evolution sind sie mindestens seit der Trias vorhanden, die einen nur noch in Resten lebenden Fossilien, die anderen mit noch stärker artenbildender Verästelung, so dass sie insgesamt heute doch mehr Arten besitzen als die Säuger (Carroll, 1969, Gorman, 1973, Webb und Elgood, 1979). Sie sind also so fragmentarisch in den rezenten Gruppen (die auch keine verwandtschaftlichen Verbindungen zu den niederen oder den höheren Formen mehr erkennen lassen), dass man sie schwer als in sich geschlossene Klasse bezeichnen kann. Im Gegensatz dazu haben sich im Karyotyp überraschenderweise eine Reihe von Übereinstimmungen erwiesen (Morescalchi, 1970; Olmo et al., 1980). Das provozierte Fragen, nämlich ob das Zufall ist, oder ob wir die wesentlichen strukturellen Unterschiede des Genoms noch nicht aufdecken konnten, oder ob überhaupt – genetisch ketzerisch – von der Physiologie her konvergente Beeinflussungen des äusseren Aspekts des Chromosomensatzes eingetreten sind. Heute sieht es zum Beispiel noch wie ein Witz aus, dass viele Fledermäuse aus der relativ einheitlichen Kerngrösse der Säuger herausfallen und mit etwa halb soviel Chromatin ziemlich genau im Bereich der Vögel liegen.

Die Krokodile mit 21 Arten, die einzige noch lebende Brückenechse und unter den Schildkröten die knapp 50 Halswenderarten der südlichen Halbkugel sind mehr oder minder Relikte aus der Trias. Zu dieser Zeit sind aber auch schon die Gruppen ursprünglich entstanden, die dann seit dem Tertiär noch

einmal – für Reptilien! – eine in fast alle ökologischen Nischen über die Erde ausstrahlende Artbildung erfahren haben, nämlich die Halsberger-Schildkröten mit 180 Arten, die Echsen mit rund 3000 und die Schlangen mit rund 2500 (Pianka, 1977; Webb et al., 1979).

Die einer genetischen Untersuchung vorauszuschickenden Fortpflanzungsstrategien sind noch weitgehend unbekannt, es gibt bei den Reptilien keine domestizierenden Arten wie in den anderen Klassen. Erste Versuche mit Schildkröten, Krokodilen und Echsen bewegen sich noch überwiegend im Methodisch-empirischen (Sachsse, 1975; Sachsse u. Schmidt, 1976) (Cole und Townsend, 1977). Aufgrund des sehr langsamen Generationszyklus wird aber niemals die Züchtbarkeit wie bei anderen Tieren erreicht werden. – Die Meeresschildkröten sind diejenigen, die mit hohen Eizahlen, – oft fast synchron produziert – natürlich nicht absolut den Amphibien vergleichbar – um ihr Überleben kämpfen. Dies beruht auf der zwingend terrestrischen Eiablage, die nicht, wie zum Beispiel bei den stammesgeschichtlich jungen Seeschlangen (Hydrophiidae), durch Viviparie umgangen werden konnte (Abb. 1). – Auch embryologisch gibt es aufgrund der sehr frühen Abspaltungen im Wirbeltierstamm nur wenig Ansatzpunkte, Verwandtschaftsbeziehungen herzustellen, zum Beispiel den zwischen Krokodilen und Vögeln (Walker, 1972). Embryonen von Reptilien zeigen schon in relativ frühen Stadien (s. Abb. 2 von der Suppenschildkröte, *Chelonia mydas*) ihren ganz spezifischen Bauplan. Zum Kern, dem Karyon, nun 3 Fragen:

1. Welche Grösse, also was ergibt die quantitative DNS-Bestimmung?
2. Wie ist das Chromosomenkomplement strukturell aufgebaut?

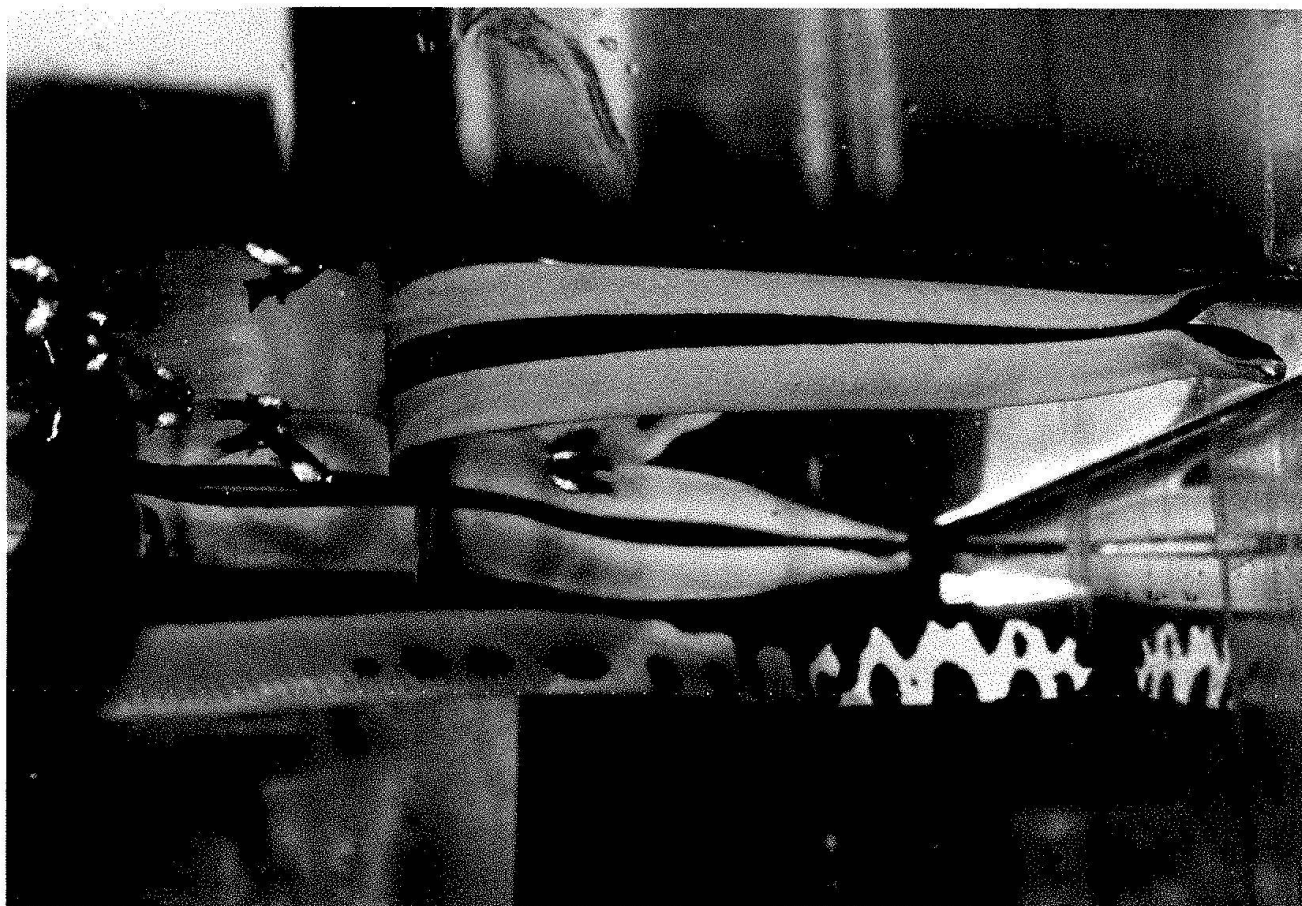


Abb. 1. *Pelamis platurus*, pelagisch lebende, giftige Seeschlange.

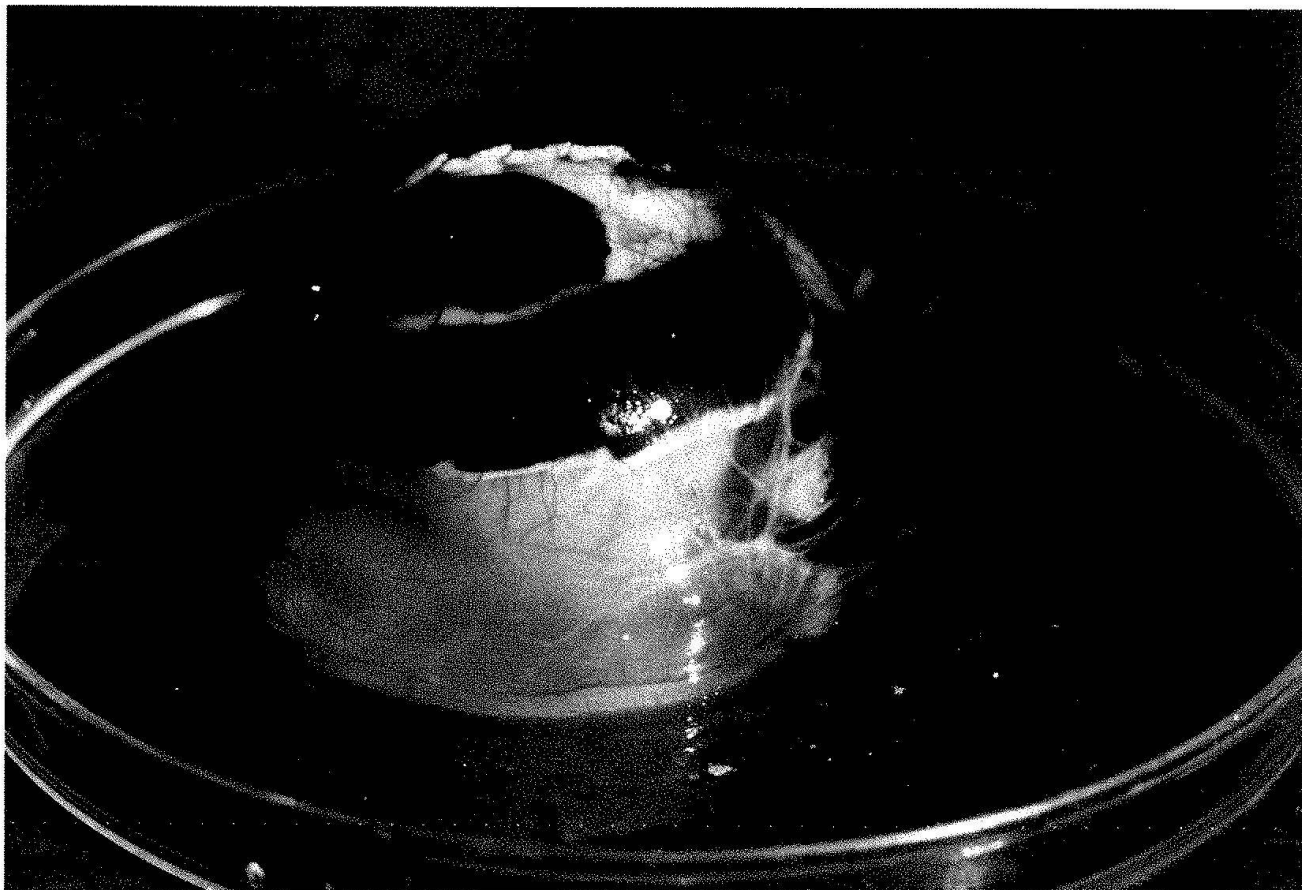


Abb. 2. *Chelonia mydas*. Embryo der Suppenschildkröte.

3. Was für Funktionen ausser der Vererbung sind an die Chromosomen gebunden, was ist da heute schon ablesbar?

In der Entwicklung der Kerngrösse zeichnen sich stets 2 Trends ab: zunächst der Zuegewinn an Material während der Höherentwicklung innerhalb des Organismenreiches (Ohno, 1970), dann aber bei der Spezialisierung innerhalb bestehender, grösserer Gruppen eine parallellaufende Reduktion des Chromatins. Hinegardner (1968) hat das in grossem Umfang für die Knochenfische, Bachmann (1972) für die Vögel gezeigt. Die Position der Reptilien im Organismenreich aufgrund ihrer Kerngrösse ist am besten aus Abb. 3 zu ersehen. Neuere Befunde als 1975 haben die dort dargestellte Bandbreite für Reptilien erweitert, zum Beispiel im Vergleich zu den sehr eng beieinander liegenden Vögeln, bei denen sich der höchste zum niedrigsten Wert wie 1,3:1 verhält, bei den Säugern wie 1:2. Die Reptilien liegen zwar mit ihrer Kerngrösse (2 c jeweils) nach der derzeitigen Kenntnis zwischen 2 und 11 pg/Kern, aber doch unvergleichlich enger beieinander und niedriger als die meisten aquatilen Vertebraten. Diese Beobachtung ist so

auffallend, dass man wiederum geneigt ist, nach einer Korrelation zur Physiologie, zum Zellstoffwechsel zu suchen.

Die interspezifische Variation ist bei den Reptilien sehr niedrig innerhalb der Familien, ebenso noch innerhalb der Ordnungen; die noch höchsten Unterschiede zeigen die Schildkröten, die, gemeinsam mit der Brückenechse (*Sphenodon punctatus*) überhaupt am meisten DNS besitzen. Hinweisende Korrelationen zwischen phylogenetischer Stellung und DNS-Gehalt sind bisher nicht zu erkennen, wahrscheinlich deswegen, weil sich das Chromatin in den einzelnen Gruppen auf verschiedene Art und Weise entwickelt hat. In der Hauptsache gehen die Unterschiede zulasten der Fraktionen repetitiver DNS-Sequenzen, so dass die eigentliche Erbmaterie relativ unangetastet bleibt (Olmo et al., 1980). Dies ist in ähnlicher Weise bei den erdgeschichtlich im Vergleich zu den Säugern schon älteren und stärker spezialisierten Vögeln der Fall (Bachmann, 1972).

Aus diesem Grunde des Verhältnisses «wichtiger zu unwichtiger DNS» – was zur Chromosomenstruktur nun überleitet – ist es immer von grossem Interesse, für vergleichende

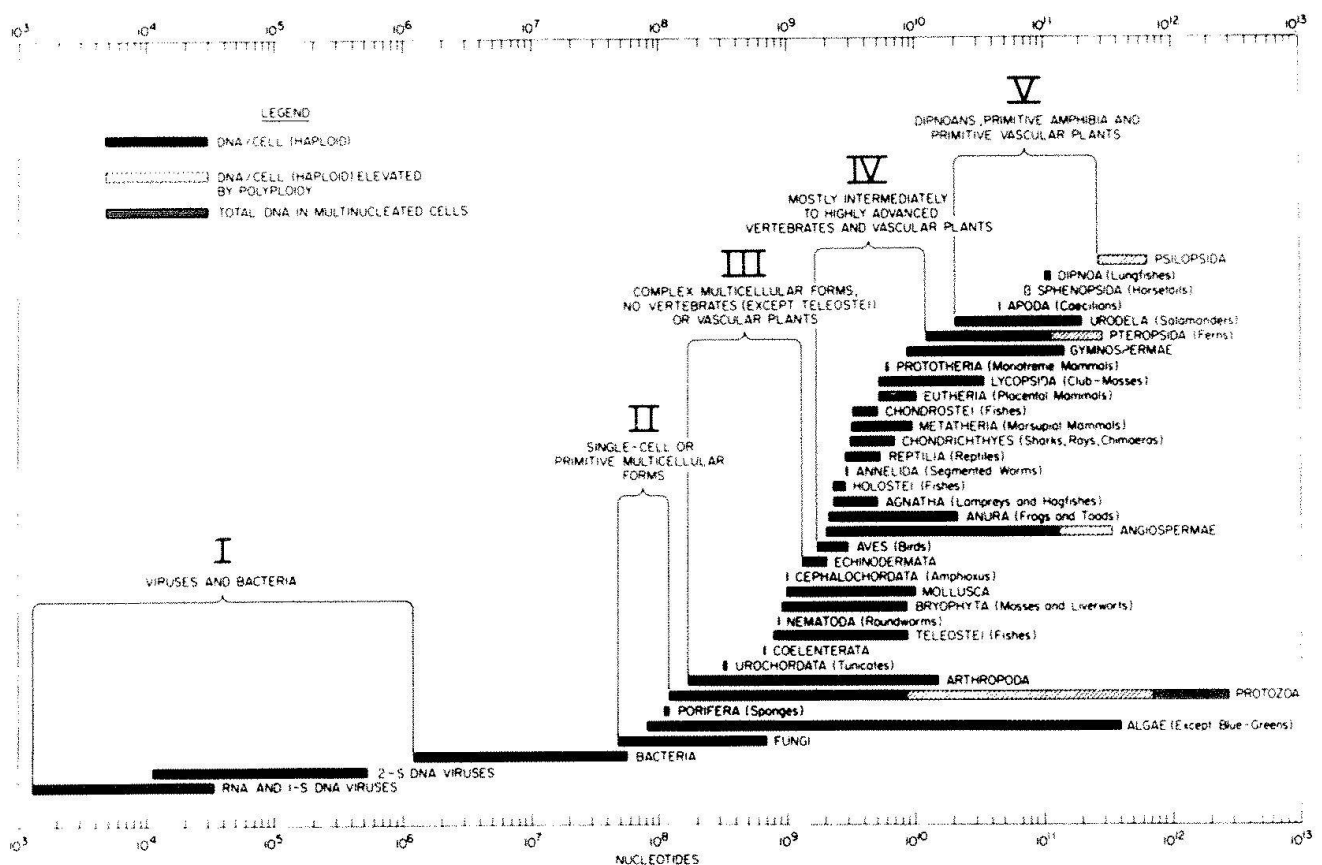


Abb. 3. DNS-Mengen im Organismenreich (aus: John, B. and Lewis, K.R.: Chromosome Hierarchy, S. 24, 1975).

Untersuchungen zur Evolution die DNS quantitativ zu bestimmen. Viel älter sind aber die Versuche der Darstellung des Chromosomensatzes, auch bei den Reptilien; erwähnt seien Matthey (1931), Risley (1936) und Makino und Momma (1949) hier, sowie schliesslich die Übersicht von Matthey «The Chromosomes of the Vertebrates» (1951). Die entscheidenden methodischen Verbesserungen kamen aber Ende der 50er Jahre; erst seither können Zählbarkeit und strukturelle Darstellung als zuverlässig gelten. Hsu und Benirschke geben nun einen Chromosomen-Atlas heraus, dessen erste Reptilien enthaltende Folge 1971 erschien.

Cohen und Gans haben 1970 alle 21 lebenden Krokodil-Arten karyotypiert und fanden $2n$ 30–42 Chromosomen, als Fundamentalzahl (= freie Arme) aber nur 56–62, also eine viel geringere Streubreite, so dass sich das Hauptgewicht der Diskussion auf die zentrischen Fusionen und Fissionen legt; die Verfasser präsentieren einen «karyologischen Stammbaum» der Krokodile mit Translokations- und Inversions-Schritten zwischen den einzelnen Arten, wobei die gesamte Darstellung noch auf konventioneller Färbung beruht. – Ebenso wenig wie hier sind bei der Brückenechse, $2n=36$, typische von den Makrochromosomen scharf abgesetzte Mikrochromosomen zu erkennen (Wylie et al., 1968). Bei den Chromosomen-Darstellungen fiel als erstes die ausgeprägte Einförmigkeit auf (Übersicht bei M. Schmidt, 1976), die einige Untersucher vielleicht verleitete, sie nicht interspezifisch, sondern gleich mit anderen Ordnungen und Klassen zu vergleichen (Takagi und Sasaki, 1974). Diese relativ äusserlichen Ähnlichkeiten konnten aber mit Entschiedenheit widerlegt werden, sobald die Bandierungsmethoden zur Verfügung standen (Stock und Mengden, 1975). Die meisten Schildkröten haben diploid zwischen 50 und 56 Chromosomen, wobei es innerhalb von Gattungen und auch Familien meistens kaum Unterschiede gibt; es liegt also wie bei den Vögeln ein sehr konservativer Karyotyp vor. Um so frappierender war der Befund, dass bei den altweltlichen südamerikanischen Podocnemis, zu den schon genannten Halswendern gehörig, $2n$ nur 26–28 beträgt (Ayres et al., 1969, Killebrew, 1975). Dabei ist, was die Bauplanunterschiede anbetrifft, der entscheidende Punkt beim Einziehen des

Halses (was die beiden Unterordnungen unterscheidet) gleichermassen der 8. Halswirbel. Gravierende Unterschiede bestehen also kaum. – Methodisch stossen die genannten Bandierungen, die ja (seit 1970) einen ersten Schritt in die Chromosomenstruktur ausmachen, immer noch auf zunehmende Schwierigkeiten, je weiter man sich in der Phylogenie von den Säugern entfernt; vielleicht ist dies durch andere Kondensationsmuster des Chromatins bedingt. Weiter ist zur cytogenetischen Technik zu sagen, dass zum Beispiel Schildkröten-Gewebe verschiedenster Organherkunft unter variierenden Kulturbedingungen bereits nach ganz wenigen Passagen Karyotypveränderungen zeigen (Kurrle, 1977; Huang und Clark, 1967). – Meiosestudien bei Schildkröten (Bickham, 1970) stehen bisher noch zu solitär im wissenschaftlichen Raum, um Rückschlüsse zu ziehen.

Die Schlangen bieten karyologisch – wie auch in der Morphologie und Physiologie – ein sehr einheitliches Bild mit einem relativ kleinen Kerninhalt und einer abgesetzten Aufteilung in Makro- und Mikrochromosomen, ähnlich den Vögeln, so dass hier öfters eine Verwandtschaft gefordert worden ist (Becak et al., 1964; Becak und Becak, 1969). Hierzu passt auch die Entdeckung des ZW-Geschlechtsbestimmungsmechanismus (Kobel, 1962; Becak et al., 1962) mit einem Z, das etwa 10% des haploiden Genoms ausmacht, wohl unverändert seit 180 Millionen Jahren. Bezüglich der morphologischen Erkennbarkeit der Gonosomen zeichnet sich von primitiven Schlangen wie zum Beispiel Boidae bis zu hochspezialisierten, zum Beispiel Viperidae eine Entwicklung ab. Durch Translokationen sind bei einzelnen Arten und deren Lokalformen multiple Gonosomen, vergleichbar Ereignissen in der Säuger-evolution, aufgetreten, zum Beispiel beim indischen Krait (*Bungarus fasciatus*) $Z_1Z_1Z_2Z_2\delta$, $Z_1Z_2W\eta$ und $ZZ\delta$, $ZW_1W_2\eta$ (Singh et al., 1970). Nachdem beim Säuger Weibchen das 2. X-Chromosom aus Gründen der Dosiskompensation inaktiviert wird (Ohno, 1967) hat man naturgemäss auch bei ZW-geschlechtsbestimmten Tieren nach Z-Inaktivierungen gesucht, aber keine Dosiskompensation (auch mangels Markergenen) finden können, sondern man ist ganz im Gegenteil darauf gestossen, dass das W-Chromosom asynchron repliziert wird

und die Funktion der Nukleolus-Organisation übernimmt (Ray-Chaudhuri et al., 1971). Untersuchungen der Satelliten III-DNS bei Schlangen haben eine Konzentration auf dem W nachweisen können, die bei Arten ganz verschiedener Familien der Serpentes konserviert worden ist (Singh et al., 1976; Singh et al., 1979). – Bei den Vögeln werden die weitgehend heterochromatischen Mikrochromosomen, die 30–42% des Karyotyps ausmachen, als Nukleolus-Organisatoren betrachtet (Ray-Chaudhuri, 1973).

Sehr viel uneinheitlicher sind die Echsen, sowohl in der Diversifikation der Physiologie als auch in der des Karyotyps. Daher wurden schon polyphyletische Entstehungsweisen für einzelne Charaktere vermutet, zum Beispiel eben für die Gonosomen, wo man dann auch sowohl ZW als auch XY gefunden hat (zum Beispiel Hall, 1965; Gorman und Atkins, 1968; Bhatnagar und Yoniss, 1976). Gänzlich überholt sind jedenfalls die früheren, (bis etwa 1960!) wissenschaftlichen Ansichten, als man Reptilien und Vögel als Sauropsiden zusammen nahm und ihnen noch im Beginn der neuen Cytogenetik die Hälfte der DNS-Menge der Säuger und die ZW-Geschlechtsbestimmung vereinheitlichend zuschrieb (zum Beispiel Oguma, 1937; zahlreiche alte Lehrbücher). Bei den bisher untersuchten Echsen hat man keineswegs so häufig erkennbare Heterosomen gefunden wie bei den Schlangen (zum Beispiel Dallai und Talluri, 1969 bei Skinken; Cole und Lowe, 1967). Am häufigsten findet man in der so heterogenen Unterordnung Sauria aber ähnlich den Schlangen, wenn auch nicht so ausgeprägt, einen Karyotyp mit Makro- und Mikrochromosomen; ähnlich verhält es sich bei den nun extra gestellten Doppelschleichen (*Amphisbaenia*) (Huang et al., 1967).

Zur Verkleinerung des Karyotyps – auffällig bei den Schuppenkriechtieren und den Vögeln zum Beispiel – mit wachsender Spezialisierung hat Bachmann (1972) in einem Diagramm gezeigt, dass innerhalb der einzelnen grösseren Gruppen die Zahl rezenter Arten sich umgekehrt proportional zur Genomgrösse verhält; man kann also zur Spezialisierung auch noch Artbildung hinzusetzen. Die Verkleinerung des Genoms bei konservativer Einheitlichkeit innerhalb ganzer Klassen steht im Kontrast zu neueren Be-

rechnungen, dass den chromosomalen Umstrukturierungen doch eine grössere (vielleicht grösser als die der Mutationen?) Rolle in der Evolution zukommt (Wilson et al., 1974). Da sich die wesentlichen Schwankungen und Umstrukturierungen im Karyotyp der genannten Gruppen auch noch im heterochromatischen Bereich abspielen, wird man zu der Frage hingeleitet, ob diese Tiere bald am Ende ihrer Entwicklungsmöglichkeiten angelangt sind?

Ein interessanter Zusammenhang, in den die Chromosomen ausser der Weitergabe des Erbmaterials einbezogen sind, berührt die bei den Echsen in ganz verschiedenen Familien nachgewiesene Parthenogenese. Für ein natürliches Vorkommen dieses Phänomens handelt es sich hier wohl um die höchste Evolutionsstufe; bei Vögeln beobachtete man sie hin und wieder als vitalitätsmindernde Abnormität erblich bei einzelnen, stark domestizierten Rassen, wie zum Beispiel der Pute Beltsville small white und dem Huhn dark cornish (Olsen, 1975) – in Natur bei Reptilien hat Darevskij das Phänomen bei den kaukasischen Felseidechsen, *Lacerta saxicola* entdeckt und zahlreiche anhängende Fragen bearbeitet (Darevskij, 1958; Uzzell und Darevskij, 1974). In den meisten Fällen hat sich zeigen lassen, dass die «nur ♀♀-Population», die oft extreme ökologische Nischen dicht besiedeln, aus der Hybridisierung von zwei bisexuellen, also normalen Arten entstehen. Uzzell hat allgemein für die bei Fischen, Amphibien und Reptilien vorkommenden Fälle von Parthenogenese dargelegt, wie die normale Meiose bei bisexueller Fortpflanzung während einer unisexuellen überbrückt oder umgangen wird (1970). Es ist wahrscheinlich, dass solche Populationen relativ kürzer existieren, da sie in ihrer genetischen Einheitlichkeit weniger anpassungsfähig sind. Man weiß, dass mit Parthenogenese Hand in Hand oft Polyploidie einhergeht. Dies erstreckt sich auch auf die Echsen, nämlich auf die schon erwähnte Gattung *Lacerta*, auf einige Geckonen, nämlich *Hemidactylus garnotii* (Kluge und Eckhardt, 1969) und auf *Cnemidophorus* (Pennock, 1965). Diese neuweltliche Gattung ist wohl am besten untersucht; 12 von 40 *Cnemidophorus*-Arten sind parthenogenetisch. Viele sind chromosomal gut zu unterscheiden, aber Heterosomen besitzen sie nicht.

Inzwischen laufen an *Cnemidophorus* zahlreiche Felduntersuchungen mit «screening» auf cytogenetische Ausnahmeexemplare (zum Beispiel Kreuzungen im Randgebiet), ökologische Studien, Laborzuchten mit Versuchen über genetische Kompatibilität von Transplantaten und vieles andere mehr (Cole, 1974; Wright und Lowe, 1968; Cole und Townsend, 1977). Die Gefangenschaftsnachzucht aus Kreuzungen von triploiden Weibchen mit normal bisexuellen (also diploiden) Männchen ergab lebensfähige, tetraploide Junge (Cole, 1979).

Ein weiterer Ausblick für die Forschung im Hinblick auf die Funktionsbezogenheit von Chromosomen ist die Beobachtung von King und Hayman (1978) über die saisonale Schwankung der Chiasma-Häufigkeit bei *Phyllodactylus marmoratus*. Es handelt sich um ein Tier, bei dem die Chiasmata nicht terminalisiert werden. Die für die Befruchtung wesentlichen Spermatozoen bekommen die Komplemente mit der niedrigsten totalen, aber der höchsten interstitiellen Chiasmazahl, und diese unterliegt eben Umwelteinflüssen. Es sei daran erinnert, dass die Chiasmabildung ein wesentlicher Forschungsgegenstand zur Ermittlung der Ursache von numerischen Chromosomenaberrationen beim Menschen ist.

Als letztes Kapitel der Chromosomen-Funktion sei – weil noch gänzlich ungeklärt – die Geschlechtsbestimmung diskutiert. Ursprünglich galt als Lehrmeinung, dass so hoch entwickelte Wirbeltiere wie Reptilien eine genetische Geschlechtsbestimmung besitzen. Dies wurde gestützt durch die Beobachtung, dass sie exogen (zum Beispiel durch Hormonbehandlung) schwer in das andere Geschlecht umzuwandeln sind. Daher vermutete man, dass, vergleichbar primitiveren Schlangen und Echsen, ihre Gonosomen lichtoptisch noch nicht unterscheidbar sind. Eine Bestätigung erfuhr das, als Bull et al. (1974) bei den 2 *Staurotypus*-Arten im männlichen Geschlecht bei einem Chromosomenpaar einen deutlichen Längenunterschied fanden und damit diesen Schildkröten die männliche Heterogametie zuschrieben.

Im Gegensatz dazu stellte nun Pieau die These auf (1975), die Inkubationstemperatur bestimme das Geschlecht. Seine etwas zu geringen Zahlen von *Emys orbicularis* und *Testudo graeca* blieben nicht unwiderspro-

chen. Yntema (1976) bestätigte aber den Befund im Detail an *Chelydra serpentina* und machte den berechtigten Vorschlag, man solle die Temperatur-Beeinflussbarkeit der Geschlechtsbestimmung bei *Staurotypus triporcatus* oder *S. salvinii* untersuchen. Weitere Serien kamen hinzu; zum Teil auch angesichts der Naturschutzbestrebungen bei Seeschildkröten, mehr Weibchen als Männchen zu erzeugen. Die gesamten Ergebnisse hat Bull in seinem Übersichtsartikel «Sex Determination in Reptiles» (1980) zusammengefasst und von allen Aspekten her im Detail diskutiert. Dem Verfasser erscheinen jedoch die genetischen Modelle, basierend auf multifaktoriellen Mechanismen, die in Abhängigkeit von der Umwelt ein gleichzeitiges Funktionieren von genetischer und temperaturbedingter Geschlechtsbestimmung zeigen sollen, noch nicht ganz überzeugend. Gefunden hat man die temperaturabhängige Geschlechtsbestimmung bisher bei 2 Familien von Echsen und 5 Familien von Schildkröten; untersucht aber unbeeinflussbar war eine Schlange, eine Schildkröte und eine Echse. Dabei ist es interessanterweise so, dass bei den Schildkröten bei niedrigen (noch physiologischen) Temperaturen Männchen entstehen, bei hohen Weibchen, bei den Echsen dagegen genau umgekehrt. Die Schwellentemperatur, die in einem bestimmten determinierenden Abschnitt der Eientwicklung beide Geschlechter schlüpfen lässt, umfasst meistens nur 1 bis 2 °C und liegt zwischen 27 und 31 °C. – Von Sites et al. (1979) wurde dagegen die Hypothese aufgestellt, dass das X-Chromosom bei *Staurotypus* nicht dasjenige Gonosom sei, das noch im wesentlichen dem ursprünglichen Autosom entspreche und damit das Y-Chromosom als abgeleitet zu betrachten wäre, sondern dass das männliche, heterogametische Geschlecht intermediär sei zwischen einer Ahnenform mit 2 Y-ähnlichen Chromosomen und den weiterentwickelten Weibchen; die Autoren gingen dabei davon aus, dass *Chelydra* die Urform und *Staurotypus* die höher evoluierte sei. Die aufgestellte chromosomale Evolution hier erfordert jedoch eine grössere Anzahl, nicht so schnell wahrscheinlicher Umstrukturierungen.

Da bei Reptilien die klassische Kreuzungs- und Mutationsgenetik praktisch entfällt, bleibt zu hoffen, dass die geduldige Verfol-

gung der eingeschlagenen, technischen Wege sowie der Einsatz molekularbiologischer Techniken schliesslich zur Klärung der zur Zeit nicht lösbaren Rätsel führen.

Literatur

- Ayres, M., Sampaio, M.M., Barros, R.M.S., Dias, L.B., and Cunha, O.R.: A karyological study of turtles from the Brazilian Amazon Region. *Cytogenetics* 8: 401-409 (1969).
- Bachmann, K., Harrington, B.A., and Craig, J.P.: Genome Size in Birds. *Chromosoma* 37: 405-416 (1972).
- Becak, W., Becak, M.L., and Nazareth, H.R.S.: Karyotyp studies of South American snakes (*Boa constrictor amarali* and *Bothrops jararaca*). *Cytogenetics* 1: 305-313 (1962).
- Becak, W., Becak, M.L., Nazareth, H.R.S., and Ohno, S.: Close karyological kinship between the reptilian suborder Serpentes and the class Aves. *Chromosoma* 15: 606-617 (1964).
- Becak, W. and Becak, M.L.: Cytotaxonomy and chromosomal evolution in Serpentes. *Cytogenetics* 8: 247 (1969).
- Benirschke, K. and Hsu, T.C. (Coord. Eds): *Chromosome Atlas: Fish, Amphibians, Reptiles and Birds* Vol. I. (Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1971).
- Bhatnagar, A.N. and Yoniss, Y.T.: A proof of female heterogamety in a lacertid lizard *Ophisops elegans*. *Cytologia* 41: 507-511 (1976).
- Bickham, J.W.: A meiotic analysis of four species of turtles. *Genetica, S'Gravenhage* 46: 193-198 (1976).
- Bull, J.J.: Sex Determination in Reptiles. *The Quarterly Review of Biology* 55(1): 3-21 (1980).
- Bull, J.J., Moon, R.G., and Legler, J.M.: Male heterogamety in kinosternid turtles (genus *Staurotypus*) (1974). *Cytogenetics and Cell Genetics* 13: 419-425 (1974).
- Carroll, R.L.: Origin of Reptiles in: *Biology of the Reptilia*, Eds. Gans, C., Bellairs, A. d'A., and Parsons T.S., S. 1-44. (Academic Press, London-New York, 1969).
- Cohen, M.M. and Gans, C.: The chromosomes of the order Crocodylia. *Cytogenetics* 9: 81-105 (1970).
- Cole, C.J.: Evolution of Parthenogenetic species of reptiles. Paper on the International Symposium on Intersexuality in The Animal Kingdom, R. Reinboth, Hrsg., Mainz, July 8-12 (1974).
- Cole, C.J.: Chromosome inheritance in parthenogenetic lizards and evolution of allopolyploidy in reptiles. *Journal of Heredity* 70(2): 45-102 (1979).
- Cole, C.J. and Lowe, C.H.: Sex chromosomes in Lizards. *Science* 155: 1028-1029 (1967).
- Cole, C.J. and Townsend, C.R.: Parthenogenetic reptiles: a new subject for laboratory research. *Experientia* 33(3): 285-289 (1977).
- Dallai, R. and Talluri, M.V.: A karyological study of three species of Scincidae (Reptilia). *Chromosoma* 27: 86-94 (1969).
- Darevskij, I.S.: Natural Parthenogenesis in certain subspecies of Rocky Lizards *Lacerta saxicola* Eversmann. *Bull. Ammenian SSR Academy of Zool. Sciences*, 5.V.1958 (1958).
- Gorman, G.: The chromosomes of the reptilia, a cytotoxic interpretation in: *Cytotaxonomy and Vertebrate Evolution*, Eds. Chiarelli und Capanza, E., pp. 349-424. (Academic Press, New York, 1973).
- Gorman, G.C. and Atkins, L.: Confirmation of an X-Y sex determining mechanism in Lizards (*Anolis*). *Copeia* 1968: 159-160 (1968).
- Hall, W.P.: Preliminary chromosome Studies of some Nevada Test Site Lizards, 45th ann. Meet. Amer. Soc. Ichthyol. Herpetol., Lawrence, Kansas (1965).
- Hinegardner, R.: Evolution of cellular DNA content in teleost fishes. *American Naturalist* 102: 517-523 (1968).
- Huang, C.C., Clark, H.F., and Gans, C.: Karyological studies on fifteen forms of *Amphisbaenians* (*Amphisbaenia-Reptilia*). *Chromosoma* 22(1): 1-15 (1967).
- Killebrew, F.C.: Mitotic Chromosomes of Turtles: 1. The Pelomedusidae. *Journal of Herpetology* 9(3): 281-285 (1975).
- King, M. and Hayman, D.: Seasonal Variation of Chiasma Frequency in *Phyllodactylus marmoratus* (Gray). (*Gekkonidae-Reptilia*). *Chromosoma* 69: 131-154 (1978).
- Kluge, A.G. and Eckhardt, M.J.: *Hemidactylus garnotii*, a triploid all-female species of gekkonid lizard. *Copeia* 4: 651-664 (1969).
- Kobel, H.R.: Heterochromosomen bei *Vipera berus* L. (*Viperidae, Serpentes*). *Experientia* 18: 173-174 (1962).
- Kurrle, R.: Gewebekultur bei Schildkröten. Erarbeitung von in vitro-Methoden für cytogenetische Fragestellungen. Diplomarbeit bei den Naturwiss. Fachbereichen der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, April, 1977.
- Makino, S. and Momma, E.: An idiogram study of the chromosomes in some species of reptiles. *Cytologia* 15: 96-108 (1949).
- Matthey, R.: Chromosomes de reptiles: Sauriens, ophiidiens chéloniens. *Revue Suisse Zoologique* 38: 117-186 (1931).
- Matthey, R.: The chromosomes of the vertebrates. *Advances in Genetics* 4: 159-180 (1951).
- Morescalchi, A.: Karyology and vertebrate phylogeny. *Bolletino di Zoologia* 37: 1 (1970).
- Oguma, K.: Studies on Sauropsid Chromosomes. III. The chromosomes of the soft-shelled turtle *Amida japonica* as additional proof of female heterogamety in the reptilia. *J. Genet.* 34(2): 247-264 (1937).
- Ohno, S.: Sex Chromosomes and Sex-linked Genes. *Monogr. Endocrinol.* 1 (Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1967).
- Ohno, S.: Evolution by Gene Duplication (Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1970).
- Olmo, E., Morescalchi, A., and Stingo, V.: DNA evolution in Reptiles. 7th International Chromosome Conference Oxford, August 26th-30th (1980).
- Olsen, M.W.: Avian parthenogenesis. U.S. Dept. of Agriculture, ARS-NE-65 (1975).
- Pieau, C.: Effects des variations therminiques sur la différenciation du sexe chez les vertebres. *Bull. Soc. Zool.* 100: 67-76 (1975).

- Pennoek, L.A.: Triploidy in parthenogenetic species of the teiid lizard, genus *Cnemidophorus*. *Science* 149: 539-540 (1965).
- Pianka, E.R.: Reptilian Species Diversity in: *Biology of the Reptilia Vol 7*, Eds. C. Gans, D.W. Tinkle, pp.1-34 (Academic Press, London-New York, 1977).
- Ray-Chaudhuri, S.P., Singh, L., and Sharma, T.: Evolution of sex chromosomes and formation of W-chromatin in snakes. *Chromosoma* 33: 239-251 (1971).
- Ray-Chaudhuri, R.: Cytotaxonomy and Chromosome Evolution in Birds, in: *Cytotaxonomy and Vertebrate Evolution*, Eds. A.B. Chiarelli und E. Capanna, pp.425-483 (Academic Press, London-New York 1973).
- Risley, P.L.: The chromosomes of the male musk turtle, *Sternotherus odoratus* L.. *Cytologia* 7: 232-241 (1936).
- Sachsse, W.: Our knowledge in regard to breeding of Turtles. *Bull. Soc. Zool.* 101(4): 739-741 (1975).
- Sachsse, W. und Schmidt, A.A.: Nachzucht in der zweiten Generation von *Staurotypus salvinii* mit weiteren Beobachtungen zum Fortpflanzungsverhalten (Testudines, Kinosternidae). *Salamandra* 12(1): 5-16 (1976).
- Schmidt, M.: Chromosomendarstellungen aus embryonalen und postembryonalen Geweben von Schildkröten. Diplomarbeit bei den Naturwiss. Fachbereichen der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Juli (1976).
- Singh, L., Purdom, I.F., and Jones, K.W.: Satellite DNA and Evolution of Sex Chromosomes. *Chromosoma* 59: 43-62 (1976).
- Singh, L., Purdom, I.F., and Jones, K.W.: Behaviour of sex chromosome associated satellite DNA's in somatic and germ cells in snakes. *Chromosoma* 71(2): 167-181 (1979).
- Singh, L., Ray-Chaudhuri, S.P., Majumdar, K., Purdom, I.F., and Jones, K.W.: Sex specific chromosome polymorphisms in the common Indian krait, *Bungarus caeruleus* Schneider, (Ophidia, Elapidae). *Chromosoma* 73(1): 93-108 (1979).
- Sites, J.W., Bickham, J.W., and Haiduk, M.W.: Derived Chromosome in the Turtle Genus *Staurotypus*. *Science* 206: 1410-1412 (1979).
- Stock, A.D. and Mengden, G.A.: Chromosome banding pattern conservatism in birds and nonhomology of chromosome banding patterns between birds, turtles, snakes and amphibians. *Chromosoma* 50: 69-77 (1975).
- Takagi, N. and Sasaki, M.: A phylogenetic study of bird karyotypes. *Chromosoma* 46: 91-120 (1974).
- Uzzell, Th.: Meiotic mechanisms of naturally occurring unisexual vertebrates. *Amer. Natur.* 104(939): 433-445 (1970).
- Uzzell, T.M. and Darewskij, J.S.: Proof of hybrid origin of parthenogenetic species of the Caucasian rock lizards of the genus *Lacerta*. *J. Obshch. Biol.* 35(4): 553-561 (1974).
- Walker, A.D.: New light on the origin of birds and crocodiles. *Nature* 237: 257-263 (1972).
- Webb, J.E., Wallwork, J.A., and Elgood, J.H.: *Guide to Living Reptiles*. Life Sciences (MacMillan Press, London 1979/80).
- Wilson, A.C., Sarich, V.M., and Maxson, L.R.: The importance of gene rearrangement in evolution: Evidence from studies on rates of chromosomal protein and anatomical evolution. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 71: 3028-3030 (1974).
- Wright, J.W. and Lowe, C.H.: Weeds, polyploids, parthenogenesis and geographical and ecological distribution of all female species of *Cnemidophorus*. *Copeia* 1968: 128-138 (1968).
- Wylie, A.P., Veale, A.M.O., and Sands, V.E.: The chromosomes of the Tuatara. *Proc. Univ. Otago Med. School* 46: 22-23 (1968).
- Yntema, C.L.: Effects of incubation temperatures on sexual differentiation in the turtle, *Chelydra serpentina*. *J. Morphol.* 150: 453-461 (1976).

Adresse des Autors:

Prof. Dr. Walter Sachsse
Genetisches Institut der Universität Mainz
D-6500 Mainz

Die gonadendifferenzierende Funktion von H-Y Antigen während der Vertebratenevolution

Ulrich Müller

Als H-Y Antigen (kurz: H-Y) bezeichnet man eine oder mehrere antigene Determinanten, die mit einem auf möglichst identischem genetischen Hintergrund erzeugten Antiserum, dem H-Y Antiserum, reagieren. Das H-Y Antiserum wird in der Regel durch Immunisierung weiblicher Tiere mit Haut- oder Milzzellen männlicher Tiere desselben isogenen Nagerstammes (Maus, Ratte) gewonnen. Da sich die beiden Geschlechter in isogenen Inzuchtstämmen genetisch nur durch das Y-Chromosom unterscheiden, müssen die Antikörper gegen ein Antigen oder Antigene auf den männlichen Zellen gerichtet sein, die in irgend einer Weise vom Y-Chromosom genetisch kontrolliert werden. Darauf soll das «Y» bei der Bezeichnung H-Y Antigen hinweisen; das «H» bedeutet «Histokompatibilitätsantigen».

H-Y findet sich auf fast allen Zellen nicht nur männlicher Nager, sondern aller untersuchter männlicher, nicht jedoch weiblicher Säuger. Darüber hinaus kann H-Y in niedrigeren Vertebraten wie Vögeln (Wachtel u. Mitarb., 1975a), Reptilien (Zaborski u. Mitarb., 1979), Amphibien (Wachtel u. Mitarb., 1975a) und Fischen (Müller und Wolf, 1979, Pechan u. Mitarb., 1975) geschlechtsspezifisch nachgewiesen werden, wobei das H-Y Antiserum entweder ausschliesslich oder aber überwiegend mit Zellen des heterogametischen Geschlechtes reagiert. Offensichtlich ist das durch das H-Y Antiserum definierte H-Y Antigen während der Evolution sehr stabil geblieben. Diese beiden Befunde, die Stabilität von H-Y während der Evolution einerseits und seine Geschlechtsspezifität andererseits sprechen für eine wichtige Aufgabe des Moleküls, die mit der primären Geschlechtsentwicklung, d.h. der Gonadenentwicklung, in Zusammenhang zu stehen scheint (Wachtel u. Mitarb., 1975b, Ohno, 1976). Zahlreiche Befunde machen eine testisdifferenzierende Funktion des H-Y Anti-

gens bei Säugern überaus wahrscheinlich. Hier will ich dies am Beispiel des Auftretens von Rinderzwicken verdeutlichen. Im Anschluss daran sollen Befunde zur Diskussion gestellt werden, die eine Rolle von H-Y bei der Gonadendifferenzierung auch niederer Vertebraten wahrscheinlich machen.

Das Auftreten von Zwicken ist seit langem als Beispiel abnormer Geschlechtsentwicklung bei Säugern bekannt. Bereits im 18. Jahrhundert wird berichtet, dass weibliche Kälber, die als Zwilling eines männlichen geboren werden, steril sind (Hunter, 1779). Die betroffenen Tiere zeigen starke Virilisierungserscheinungen der inneren Genitalien. Die Gonaden imponieren als Ootestes oder kleine Testes. Differenzierungsprodukte der Müllerschen Gänge wie Uteri und Tuben sind häufig rudimentär oder fehlen ganz. Statt dessen finden sich Epididymis und Ductus deferens, die Derivate der Wolffschen Gänge (siehe Jost u. Mitarb., 1973).

Wie lässt sich diese partielle Geschlechtsumkehr erklären?

Die Kreisläufe von Rinderzwicken sind durch Anastomosen miteinander verbunden. Somit können Komponenten des männlichen Tieres in das weibliche gelangen und die beschriebenen Vermännlichungserscheinungen induzieren. Sowohl zelluläre als auch hormonelle Induktoren werden diskutiert. Die «zelluläre Hypothese» (Fechheimer u. Mitarb., 1963) basiert auf dem Befund, dass männliche Zellen im weiblichen Zwicken nachgewiesen wurden, die Zwicken somit XX/XY Chimären darstellen. Die männlichen Zellen sollten demnach die testikuläre Entwicklung der XX Gonade entweder direkt durch Zellkontakt oder durch virilisierende Stoffe veranlassen, die über kurze Strecken wirken. Diese Hypothesen erscheinen heute zweifelhaft. Das überzeugendste Gegenargument erbrachten die Untersuchungen von Vigier und Mitarbeitern (1976),

die gezeigt haben, dass sich die Virilisierung selbst nach Etablierung des XX/XY Chimärismus durch Unterbindung der Anastomosen verhindern lässt. Es bleibt zur Erklärung des Zwicken-Phänomens die «hormonelle Hypothese» (Lillie, 1916). Bis vor kurzem waren jedoch keine Stoffe bekannt, die a) vom männlichen Tier gebildet werden, b) humoral übertragen werden, c) an den Gonaden beider Geschlechter angreifen und so d) schliesslich testisdifferenzierend wirken können. Die seit langem bekannten männlichen Sexualsteroiden sind zwar für die sekundäre Geschlechtsentwicklung, d.h. die Reifung der Wolffschen Gänge, erforderlich, haben jedoch bei Eutherien keinen Einfluss auf die Gonadendifferenzierung (Jost u. Mitarb., 1973, Burns, 1961). Ebenso lässt das die Entwicklung der Müllerschen Gänge unterdrückende Anti-Müllersche Hormon (Josso u. Mitarb., 1973) die Gonadenreifung offenbar unbeeinflusst. Alle zur Unterstützung der hormonellen Hypothese benötigten Bedingungen werden aber von H-Y erfüllt.

Durch in vitro Versuche mit verschiedenen Geweben männlicher Ratten konnte gezeigt werden, dass nur Testiszellen nachweisbare Mengen von H-Y in das Kulturmedium abgeben. Die H-Y-Sekretion ist von Proteinsynthese abhängig und durch den Translations-Inhibitor Cycloheximid hemmbar (Müller u. Mitarb., 1978b). Während H-Y in die Zellmembran aller männlichen Zellen mit Ausnahme diploider Keimzellen (Zenzes u. Mitarb., 1978a) und Erythrozyten (Müller u. Mitarb., 1980b) integriert ist, scheinen nur Sertolizellen H-Y aktiv zu sezernieren. Die Fähigkeit zur H-Y Sekretion ist nicht auf das Embryonalstadium oder Neugeborenenalter beschränkt; selbst Testes adulter Tiere sezernieren H-Y. Das vom Testis gebildete H-Y wird in vivo offenbar in den Nebenhoden abgegeben, wo es reichlich nachweisbar ist. Ausserhalb der Geschlechtswege findet sich freies H-Y im Serum männlicher Säuger (Müller u. Mitarb., 1980b, Wachtel u. Mitarb., 1980b). Dabei ist unbekannt, ob das Molekül vom Testis gebildet, in den Kreislauf gelangt, oder ob es von der Oberfläche nichtgonadaler Zellen in die Umgebung diffundiert. Auch das Serum embryonaler männlicher Rinder und von Zwicken enthält H-Y, nicht jedoch das Serum normaler weiblicher Rinderembryonen (Wachtel u. Mit-

arb., 1980b). Damit werden die beiden ersten oben genannten Anforderungen an eine testis-induzierende Substanz erfüllt: H-Y wird vom Testis sezerniert, findet sich im Serum männlicher Säuger und gelangt bei Rinderzwicken über die Anastomosen vom männlichen in das weibliche Tier.

Damit kommen wir zum dritten Postulat, der Möglichkeit der Interaktion des Testisinduktors mit den gonadalen Zielzellen. Da das gonadale Geschlecht – wie das Beispiel des Rinderzwicken zeigt – nicht unbedingt mit dem chromosomalen übereinstimmen muss, sollten die Gonaden beider genetischer Geschlechter mit einer Bindungsstelle, d.h. einem Rezeptor, für die testisinduzierende Substanz ausgestattet sein. Tatsächlich haben Bindungsstudien mit H-Y bei Ratten ergeben, dass sowohl Testis als auch Ovar exogen zugeführtes H-Y binden, somit mit einem spezifischen Rezeptor ausgestattet sind (Müller u. Mitarb., 1978a; Müller u. Mitarb., 1979a). Für nicht-gonadale Gewebe besteht kein Hinweis auf eine solche Bindungsstelle. Ovarien vom Rind binden ebenfalls H-Y und im Zwicken findet sich H-Y in den Gonaden (Ohno u. Mitarb., 1976). Das Vorhandensein von H-Y in der Zwickengonade mag zum Teil auf eingewanderte männliche Zellen zurückzuführen sein. Diese Erklärung ist zumindest nicht vollständig, da der H-Y Titer in der Freemartingonade dem in normalen Rindertestes vergleichbar ist (Wachtel u. Mitarb., 1980b), eine XX/XY Chimäre jedoch einen niedrigeren Titer erwarten liesse. Theoretisch könnte H-Y jedoch von den eingewanderten männlichen Zellen abgegeben und von den weiblichen gebunden werden (Ohno u. Mitarb., 1976). Dies erscheint unwahrscheinlich, da offenbar nur Sertolizellen H-Y aktiv sezernieren (Zenzes u. Mitarb., 1978a), nicht jedoch andere gonadale oder nicht-gonadale Zellen (Müller u. Mitarb., 1978b). Demnach bleibt als Erklärung des hohen H-Y Titers in der Zwickengonade die Annahme, dass das H-Y über die Anastomosen vom männlichen zum weiblichen Tier humoral gelangt. Dies wird um so wahrscheinlicher, als Ovarien, die in vitro mit männlichem fetalem Kälberserum inkubiert wurden, H-Y positiv werden (Wachtel u. Mitarb., 1980b).

Es bleibt noch die letzte Frage offen: Wirkt H-Y auch testisdifferenzierend? Mit anderen

Worten: Führt die Bildung des H-Y/Rezeptor-Komplexes zur Testisorganisation? Dieses Problem wurde zuerst mit Hilfe von Zell-Reorganisationsexperimenten nach Moscona bearbeitet (Moscona, 1957). Zerlegt man ein Ovar durch Proteolyse in Einzelzellen und belässt die Zellen für 16 bis 24 Stunden bei 37 °C in Rotationskultur, so bilden sich histotypische Reaggregate. Werden die Ovarzellen neugeborener Ratten auf dieselbe Weise, jedoch in Gegenwart von H-Y kultiviert, so bilden sich testikuläre Strukturen (Zenzes u. Mitarb., 1978b). Die zusätzliche Zugabe von H-Y Antiserum hebt die Wirkung von H-Y auf. Die H-Y induzierte Konversion scheint nicht nur morphologisch, sondern auch funktionell zu erfolgen. Im Mosconaexperiment wird der HCG Rezeptor, der nur auf Testiszellen Neugeborener vorhanden ist, auf konvertierten Ovarien ebenfalls nachweisbar (Müller u. Mitarb., 1978c).

Der entwicklungsphysiologisch direkteste Beleg für eine testisinduzierende Wirkung des H-Y wurde durch in vitro-Untersuchungen an indifferenten XX Gonaden von Rinderembryonen in Organkultur erbracht. Die mehrtägige Kultur der XX Gonaden in Anwesenheit von H-Y führt zur Ausbildung testikulärer Strukturen. In Abwesenheit des Differenzierungsfaktors entwickelt sich die Gonade, ihrem genetischen Geschlecht entsprechend, als Ovar (Nagai u. Mitarb., 1979). Für Eutherien ist damit eine massgebliche Rolle des H-Y Antigens bei der Testisdifferenzierung sehr wahrscheinlich. Über die genaueren Wirkungsmechanismen von H-Y bestehen z.Zt. jedoch nur Spekulationen (Ohno, 1976; Müller, 1980).

Im Gegensatz zu den plazentalen Säugern ist die Gonadendifferenzierung bei Marsupialiern und nicht-säugerartigen Vertebraten durch Sexualsteroiden beeinflussbar (siehe Mittwoch, 1973). Das Vorhandensein von H-Y Antigen ist jedoch – wie oben ausgeführt – auch bei diesen Wirbeltierklassen weitgehend auf das heterogametische Geschlecht beschränkt (Gewebe des homogametischen Geschlechts absorbieren, wenn überhaupt, weitaus weniger H-Y Antiserum). Somit typisiert bei Vögeln mit dem ZZ/ZW Mechanismus der Geschlechtsbestimmung das weibliche Geschlecht H-Y positiv, der männliche Vogel ist negativ (Wachtel u. Mitarb., 1975a). Bei Amphibien kommen sowohl der

ZZ/ZW (z.B. bei *Xenopus*) als auch der XX/XY Mechanismus (z.B. bei *Rana*) vor. Entsprechend findet sich H-Y in ersterem Fall im weiblichen, in letzterem im männlichen Geschlecht (Wachtel u. Mitarb., 1975a). Selbst bei bestimmten Fischen wie Zahnkarpfen (Cyprinodontinae) kreuzreagiert das H-Y Antiserum mit dem heterogametischen Geschlecht (Müller und Wolf, 1979; Pechan u. Mitarb., 1979). Bei der Frage nach einer gonadendifferenzierenden Funktion von H-Y bei Nicht-Eutherien ergeben sich somit zwei zusätzliche Probleme. 1. Wirkt H-Y bei Vertebraten mit Heterogametie im weiblichen Geschlecht als Differenzierungsfaktor des Ovars? 2. Besteht eine Beziehung zwischen Sexualsteroiden und H-Y derart, dass H-Y durch diese Hormone induzierbar ist? Zur Beantwortung dieser Fragen haben wir Versuche mit geschlechtskonvertierten «männlichen» (ZZ) Vögeln durchgeführt (Müller u. Mitarb., 1979b; Müller u. Mitarb., 1980a). Die Gabe von Östrogenen am 3. oder 4. Embryonaltag führt bei genetisch männlichen (ZZ) Hühnern und Wachteln zu einer Feminisierung der Gonaden; es wird ein Ovotestis angelegt. Das Ausmass der gonadalen Geschlechtsumkehr erreicht noch während der Embryonalentwicklung ein Maximum. Später entwickelt sich die Gonade normalerweise – dem genetischen Geschlecht entsprechend – wieder in männlicher Richtung. Während die Gonaden normaler männlicher Vogelembryonen definitionsgemäss H-Y-negativ sind, wird in den Gonaden der mit Östrogen behandelten ZZ-Embryonen H-Y nachweisbar. Nicht-gonadale Gewebe bleiben jedoch – im Gegensatz zu normalen weiblichen Vögeln – H-Y negativ. Dem Feminisierungsgrad entsprechend, absorbieren die Gonaden «geschlechtsumgekehrter» männlicher Hühner am 13. Embryonaltag mehr H-Y Antiserum als am 16. Offenbar ist die einmalige Verabreichung von Östrogenen nicht ausreichend, um H-Y permanent zu induzieren. Vielmehr scheint die ständige Anwesenheit weiblicher Sexualsteroiden sowohl für die andauernde Expression des – offensichtlich nicht W-chromosomalen – Strukturgens für H-Y als auch für die normale ovarielle Reifung vonnöten zu sein. Die Befunde legen die Vermutung nahe, dass bei Vögeln H-Y, von Östrogenen reguliert, als

Differenzierungsfaktor bei der Ovaentwicklung wirksam ist. Dies wird um so wahrscheinlicher, als auch die Gonaden von Vögeln mit einem spezifischen Rezeptor für H-Y ausgestattet sind (Wachtel, persönliche Mitteilung), über den die Ovardifferenzierung induziert werden kann, wie im «Moscona-Experiment» mit dissoziierten Gonadenzellen wahrscheinlich gemacht wurde (Zenzes u. Mitarb., in Vorbereitung). Das «primum movens» der Eierstockentwicklung sind bei Vögeln jedoch die Östrogene.

Bei Amphibien lässt sich H-Y in der Gonade des homogametischen Geschlechts ebenfalls induzieren. Dies wurde durch Versuche mit östrogenbehandelten *Xenopus*-Fröschen gezeigt (Wachtel u. Mitarb., 1980a).

Die unterschiedlichen Wirkungen von H-Y, Testisinduktor bei Säugern einerseits und Differenzierungsfaktor des Ovars bei Vögeln und *Xenopus*, andererseits, lässt sich durch verschiedene Prädetermination der Gonadenzellen von XX/XY und ZZ/ZW Organismen erklären. Das Phänomen der Prädetermination soll anhand eines Experiments aus dem Bereich der Endokrinologie verdeutlicht werden: Das luteinisierende Hormon (LH) stimuliert in den ovariellen Luteal-Zellen über einen spezifischen LH-Rezeptor vor allem die Progesteronsynthese. Der LH-Rezeptor lässt sich von Ovarzellen isolieren und in die Zellmembran von Nebennierenrinden-Zellen (NNR-Zellen) einbauen. NNR-Zellen synthetisieren normalerweise unter dem Einfluss von ACTH Cortisol. Gibt man nun zu einer Kultur von NNR-Zellen, auf die der LH-Rezeptor übertragen wurde, das luteinisierende Hormon, so stimuliert es jetzt, dem Zelltyp gemäss, Cortisol (Dufau u. Mitarb., 1978). Entsprechend kann man annehmen, dass H-Y nach Bindung an seinen Rezeptor auf XX/XY Gonadenzellen die Differenzierung des Testis in Gang bringt, auf ZZ/ZW Gonadenzellen hingegen die des Ovars. Gene, die für eine derartige Prädetermination verantwortlich sind, könnten autosomal oder X/Z chromosomal, nicht jedoch Y/W chromosomal sein.

Wie schon erwähnt, ist H-Y auch bei einigen Teleostern geschlechtsspezifisch nachweisbar. Die Geschlechtszugehörigkeit des Individuums ist in dieser Wirbeltierklasse oft jedoch nicht lebenslang festgelegt. Übergänge von einem in das andere Geschlecht sind

bekannt, ebenso wie Hermaphroditismus. Umweltfaktoren und Sexualsteroiden scheint hier eine zentrale Rolle bei der Gonadenentwicklung zuzukommen. Eine Beteiligung des H-Y Antigens an der Organisation der heterogametischen Gonade in Abhängigkeit von den genannten Faktoren ist zu prüfen; bisher ist darüber noch nichts bekannt.

Tab. 1. Regulation des H-Y Antigens in der Vertebratevolution

Vertebraten klasse	chromosomaler Mechanismus der Geschlechts- bestimmung	Regulation der H-Y Genexpression
Eutherien	XX/XY	«konstitutiv» im männlichen Ge- schlecht
Vogel	ZZ/ZW	durch Östrogene in- duzierbar
Amphibien	ZZ/ZW XX/XY	durch Östrogene in- duzierbar durch Testosteron in- duzierbar?
Teleosteer	ZZ/ZW XX/XY	abhängig von ver- schiedenen exogenen und endogenen Fak- toren?

Zusammenfassend lässt sich der evolutionäre Werdegang von H-Y wie folgt beschreiben (Tab. 1). H-Y erscheint geschlechtsspezifisch in einigen Spezies der Knochenfische. Eine Funktion bei der Gonadendifferenzierung ist bisher nicht bekannt. Bei höheren Vertebraten wie Amphibien und Vögeln konnte für das heterogametische Geschlecht eine Rolle des H-Y Antigens bei der Ovardifferenzierung wahrscheinlich gemacht werden. H-Y wirkt hier als Östrogen-abhängiger Differenzierungsfaktor. Bei Eutherien wird H-Y von Sexualsteroiden unabhängig. Es wird offenbar konstitutiv im heterogametischen Geschlecht exprimiert und hat eine entscheidende Funktion bei der Organisation des Testis.

Literatur

- Burns, R. K.: Role of hormones in the differentiation of sex. In *Sex and Internal Secretions*, 3rd edition, Vol. 1, W. C. Young, ed. pp. 76-158 (Williams and Wilkins, Baltimore 1961).

- Dufau, M.L., Hayashi, K., Sala, G., Baukal, A., and Catt, K.J.: Gonadal luteinizing hormone receptors and adenylate cyclase: Transfer of functional ovarian luteinizing hormone receptors to adrenal fasciculata cells. *Proc Natl Acad Sci* 75: 4769-4773 (1978).
- Fechheimer, N.S., Herschler, M.S. and Gilmore, L.O.: Sex chromosome mosaicism in unlike sexed cattle twins. In *Genetics today. Proceedings of the XI International congress of genetics*, Vol. I, S.J. Geerts, ed., p.265 (Macmillan Co., New York 1963).
- Hunter, J.: Account of the freemartin. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond.* 69: 279-293 (1779).
- Josso, N., Picard, J.-Y., and Tran, D.: The Antimüllerian Hormone. *Rec. Prog. Horm. Res.* 33: 117-167 (1977).
- Jost, A., Vigier, B., Prepin, J., and Perchellet, J.-P.: Studies on sex differentiation in mammals. *Rec. Prog. Hormone Res.* 29: 1-41 (1973).
- Lillie, F.R.: The theory of the freemartin. *Science* 43: 611-613 (1916).
- Mittwoch, U.: *Genetics of sex differentiation* (Academic Press, New York 1973).
- Müller, U.: Testis determining H-Y antigen and the induction of the hCG receptor. In *Chorionic Gonadotropin*, Segal, S.J., ed. pp.371-382 (Plenum Press, New York, 1980).
- Müller, U., and Wolf, U.: Cross-reactivity to mammalian anti-H-Y antiserum in teleostean fish. *Differentiation* 14: 185-187 (1979).
- Müller, U., Aschmoneit, I., Zenzes, M.T., and Wolf, U.: Binding studies of H-Y antigen in rat tissues. Indications for a gonad-specific receptor. *Hum. Genet.* 43: 151-157 (1978a).
- Müller, U., Siebers, J.W., Zenzes, M.T., and Wolf, U.: The testis as a secretory organ for H-Y antigen. *Hum. Genet.* 45: 209-213 (1978b).
- Müller, U., Zenzes, M.T., Bauknecht, T., Wolf, U., Siebers, J.W., and Engel, W.: Appearance of hCG-receptor after conversion of newborn ovarian cells into testicular structures by H-Y antigen in vitro. *Hum. Genet.* 45: 203-207 (1978c).
- Müller, U., Wolf, U., Siebers, J.W., and Günther, E.: Evidence for a gonad-specific receptor for H-Y antigen. Binding of exogenous H-Y-antigen to gonadal cells is independent of β_2 -microglobulin. *Cell* 17: 331-335 (1979a).
- Müller, U., Zenzes, M.T., Wolf, U., Engel, W., and Weniger, J.-P.: Appearance of H-W (H-Y) antigen in the gonads of oestradiol sex-reversed male chicken embryos. *Nature* 280: 142-144 (1979b).
- Müller, U., Guichard, A., Reyss-Brion, M., and Scheib, D.: Induction of H-Y antigen in the gonads of male quail embryos by diethylstilbestrol. *Differentiation* 16: 129-133 (1980a).
- Müller, U., Mayerová, A., Siebers, J.W., and Wolf, U.: Phenotypic conversion of human erythrocytes by H-Y antigen. *Hum. Genet.* 56: 177-181 (1980b).
- Moscona, A.A.: The development in vitro of chimaeric aggregates of dissociated chick and mouse cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 43: 184-189 (1957).
- Nagai, Y., Ciccarese, S., and Ohno, S.: The identification of human H-Y antigen and testicular transformation induced by its interaction with the receptor site of bovine fetal ovarian cells. *Differentiation* 13: 155-164 (1979).
- Ohno, S.: Major regulatory genes for mammalian sexual development. *Cell* 7: 315-321 (1976).
- Ohno, S., Christian, L.C., Wachtel, S.S., and Koo, G.C.: Hormon-like role of H-Y antigen in bovine freemartin gonad. *Nature* 261: 597-599 (1976).
- Pechan, P., Wachtel, S.S., and Reinboth, R.: H-Y antigen in the teleost. *Differentiation* 14: 189-192 (1979).
- Vigier, B., Locatelli, A., Prepin, J., du Mesnil, du Buisson, F., et Jost, A.: Les premières manifestations du «freemartinisme» chez le fœtus de Veau ne dépendent pas du chimérisme chromosomique XX/XY. *C.R. Acad. Sci. [D] (Paris)* 282: 1355-1358 (1976).
- Wachtel, S.S., Koo, G.C., and Boyse, E.A.: Evolutionary conservation of H-Y («male») antigen. *Nature* 254: 270-272 (1975a).
- Wachtel, S.S., Ohno, S., Koo, G.C., and Boyse, E.A.: Possible role for H-Y antigen in the primary determination of sex. *Nature* 257: 235-236 (1975b).
- Wachtel, S.S., Bresler, P.A., and Koide, S.S.: Does H-Y antigen induce the heterogametic ovary? *Cell* 20: 859-864 (1980a).
- Wachtel, S.S., Hall, J.L., Müller, U., and Chaganti, R.S.K.: Serum-borne H-Y antigen in the fetal bovine freemartin. *Cell* 21: 917-926 (1980b).
- Zaborski, P., Dorizzi, M., et Pieau, C.: Sur l'utilisation de sérum anti-H-Y de Souris pour la détermination du sexe génétique chez *Emys orbicularis* L. *C.R. Acad. Sci. [D] (Paris)* 288: 353-354 (1979).
- Zenzes, M.T., Müller, U., Aschmoneit, I., and Wolf, U.: Studies on H-Y antigen in different cell fractions of the testis during pubescence. Immature germ cells are H-Y antigen negative. *Hum. Genet.* 45: 297-303 (1978a).
- Zenzes, M.T., Wolf, U., and Engel, W.: Organization in vitro of ovarian cells into testicular structures. *Hum. Genet.* 44: 333-338 (1978b).

Adresse des Auteurs:

Dr. Ulrich Müller
Institut für Humangenetik und
Anthropologie der Universität Freiburg
Albertstrasse 11
D-7800 Freiburg

La formule chromosomique de *Mus setulosus* (Leggada):

Description du caryotype et de la spermatogénèse (bandes Q, C, G et coloration argentique) et quelques considérations sur la différenciation du genre *Mus*

Martine Jotterand-Bellomo

Il nous a semblé intéressant de reprendre l'étude du polymorphisme chromosomique chez les *Mus* (Leggadas) africains à la lumière des méthodes de colorations différentielles. Dans ce travail préliminaire, nous présentons les résultats de l'analyse détaillée du caryotype de *Mus setulosus*, de même qu'une étude méiotique portant sur un *Mus setulosus* de sexe masculin. La comparaison de ces résultats avec ceux obtenus récemment chez plusieurs espèces de *Mus*, ainsi que les conceptions nouvelles de la classification des *Mus* eurasiatiques nous ont amenés à discuter de quelques problèmes relatifs à la taxonomie et à l'évolution du genre *Mus* dans son ensemble.

Matériel et méthode

Les deux Leggadas étudiées (un ♂ et une ♀) appartiennent à l'espèce *Mus setulosus* Gray et proviennent d'Adiopodoumé (Côte d'Ivoire). Elles me sont parvenues grâce à l'amabilité du Prof. P. Vogel (Institut d'Ecologie, Université de Lausanne). L'étude des chromosomes a porté sur des fibroblastes cultivés in vitro à partir de fragments prélevés dans la cage thoracique selon la méthode de Hsu et Kellogg (1960). Les préparations chromosomiques ont été colorées de manière à obtenir des bandes Q (Caspersson, 1969, 1970), des bandes G (Seabright, 1971) et des bandes C (Salamanca, 1974).

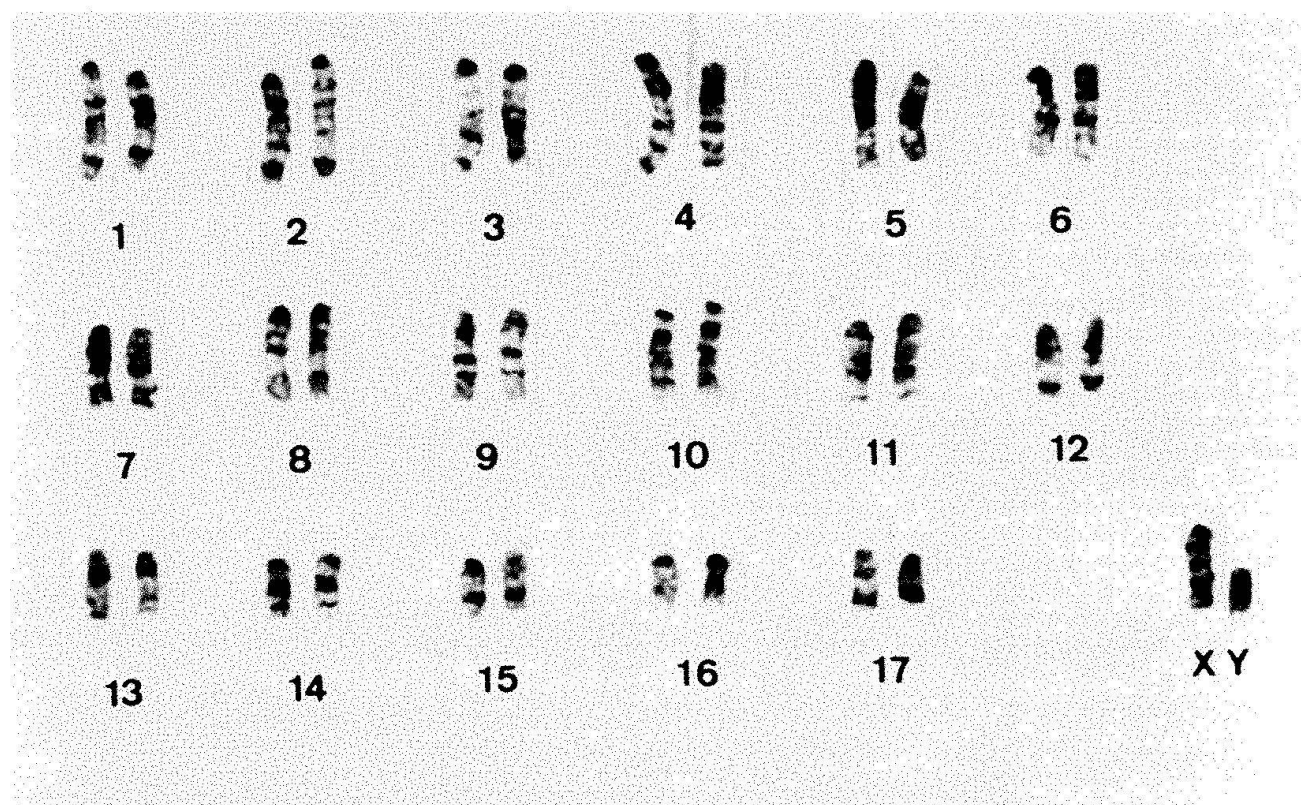


Fig. 1. *Mus setulosus* ♂: $2n = 36, XY$, bandes G.

Chez le mâle, le matériel testiculaire a été préparé selon la méthode de Evans (1964). Les figures chromosomiques ont fait l'objet de plusieurs types de coloration: bandes Q, bandes C et coloration argentique (Howell et Denton, 1978).

Résultats

Le caryotype

Chez les deux *Mus setulosus* étudiés, le nombre chromosomique est égal à 36. Les chromosomes sexuels sont de type XX chez la femelle et XY chez le mâle. Tous les chromosomes sont acrocentriques.

a) Bandes G

La figure 1 se rapporte à *Mus setulosus* ♂, la figure 2 à *Mus setulosus* ♀. Sur la base du nombre et de l'alternance des bandes sombres et des bandes claires, chaque paire chromosomique a pu être identifiée. La comparaison des chromosomes du mâle avec ceux de la femelle a permis de mettre en

évidence les chromosomes sexuels. Faire la description détaillée de l'aspect de chacune des paires serait fastidieux. C'est la raison pour laquelle nous avons établi un schéma rendant compte du «banding pattern» caractéristique de chaque paire (fig.3). Une fois identifiées, les paires autosomiques ont été alignées selon un ordre de taille décroissant, puis numérotées de 1 à 17. Parfois, l'alignement a été difficile en raison de la similitude de grandeur qui existe entre les chromosomes de certaines paires.

Les chromosomes 17 posent un problème d'interprétation. Certaines figures semblent montrer qu'ils sont dotés d'un petit bras court, alors que d'autres laissent supposer qu'il s'agit de chromosomes acrocentriques présentant une bande bien marquée juste en dessous du centromère. La position de la première bande sombre varie d'un homologue à l'autre, l'espace compris entre cette dernière et l'extrémité proximale du chromosome étant plus ou moins grand suivant les 17 considérés.

Le chromosome X présente 4 bandes typiques, l'une située au niveau de la région

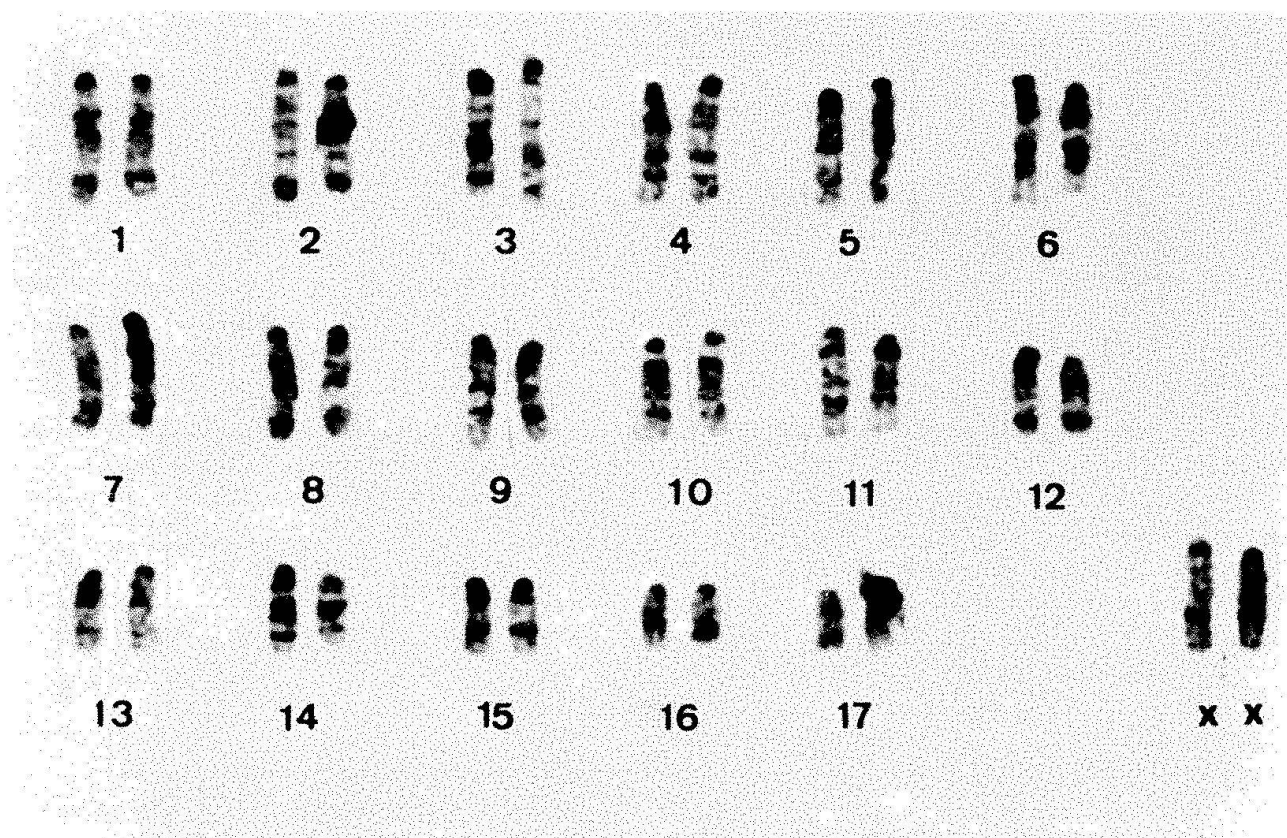


Fig. 2. *Mus setulosus* ♀ : $2n = 36, XX$, bandes G.

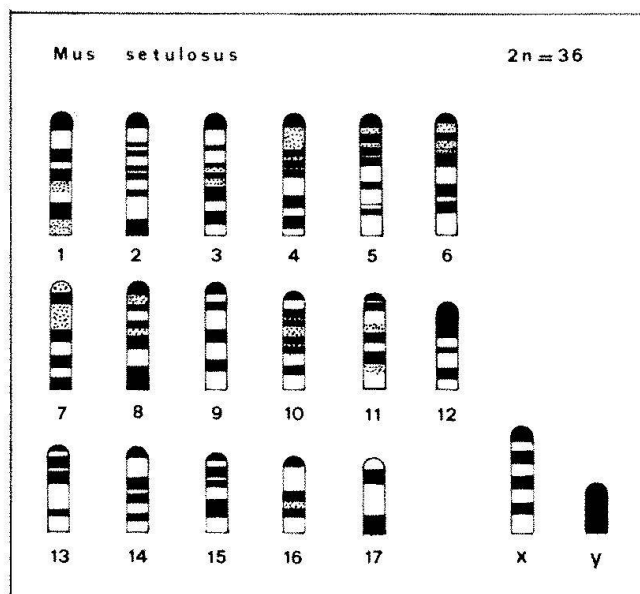


Fig. 3. *Mus setulosus*: schéma de la répartition des bandes G et Q. Les segments noirs correspondent aux bandes G. Les pointillés recouvrent des zones qui, bien que moins colorées que les bandes G, le sont relativement plus que les bandes claires. La répartition des bandes Q est la même que celle des bandes G. Les segments en pointillé fluorescent relativement moins que les bandes Q.

centromérienne, les 3 autres se succédant le long du bras long.

Le chromosome Y est un élément de petite taille qui se colore intensément sur toute sa longueur.

b) Bandes Q (fig. 4)

La répartition des zones fluorescentes et non fluorescentes correspond étroitement à celle des bandes G sombres et claires. Pour la description et la répartition des bandes Q, il est donc possible de se référer à la fig. 3.

Les centromères des chromosomes 1, ainsi que les télomères de la paire 2 fluorescent de manière relativement plus intense que le reste des chromosomes. Le chromosome Y ne présente pas de particularité.

c) Bandes C

Dans le but d'observer la réaction propre à chaque chromosome, toutes les métaphases analysées ont fait l'objet d'une double coloration, d'abord par la moutarde de quina-crène (identification des chromosomes), puis en bandes C. Les fig. 4 et 5 représentent la même métaphase de *Mus setulosus* mâle colorée de ces deux manières.

Les centromères des 17 paires autosomiques, ainsi que ceux des chromosomes sexuels, se colorent de manière intense. Au niveau des paires 5 et 7, la coloration s'étend du centromère jusqu'aux $\frac{2}{3}$ de la longueur du bras long.

Les chromosomes 17 présentent, à leur extrémité proximale, deux bandes sombres dont

l'interprétation pose les mêmes problèmes que ceux évoqués à propos des bandes G. Soit la bande terminale, qui a l'aspect d'une petite boule, correspond à un bras court éventuel et la bande subterminale marque le centromère, soit la bande terminale se situe à l'endroit du centromère et la bande subterminale se situe dans le $\frac{1}{4}$ supérieur du bras long.

Le chromosome X présente 3 bandes caractéristiques, l'une au niveau du centromère, les deux autres situées le long du bras long.

Le chromosome Y se colore uniformément.

La fig. 6 représente les autosomes des paires 5, 7 et 17, de même que les chromosomes sexuels de *Mus setulosus* mâle (4 métaphases) et de *Mus setulosus* femelle (4 métaphases). Le schéma de la coloration en bandes C est constant d'une métaphase à l'autre et, en ce qui concerne les autosomes, d'un sexe à l'autre.

d) Les organisateurs nucléolaires n'ont pas pu être identifiés avec précision. Dans la fig. 7 illustrant une métaphase spermatogoniale, cinq chromosomes présentent un précipité argentique à l'extrémité distale de leurs bras longs. Deux petits points foncés s'observent au niveau de chaque centromère.

La spermatogénèse

a) Coloration argentique

En leptoténie (fig. 8a), les chromosomes sexuels, bien individualisés, se différencient des autosomes qui ne forment qu'une masse

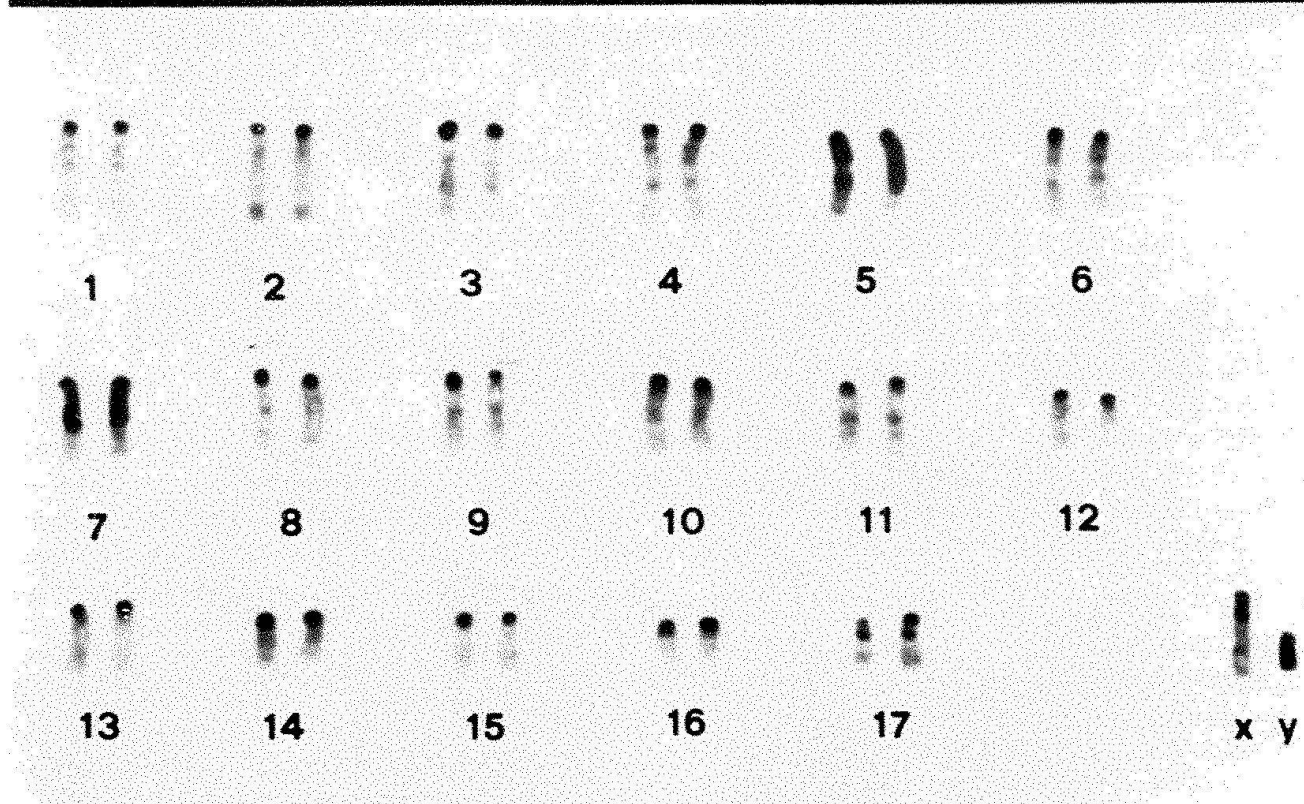
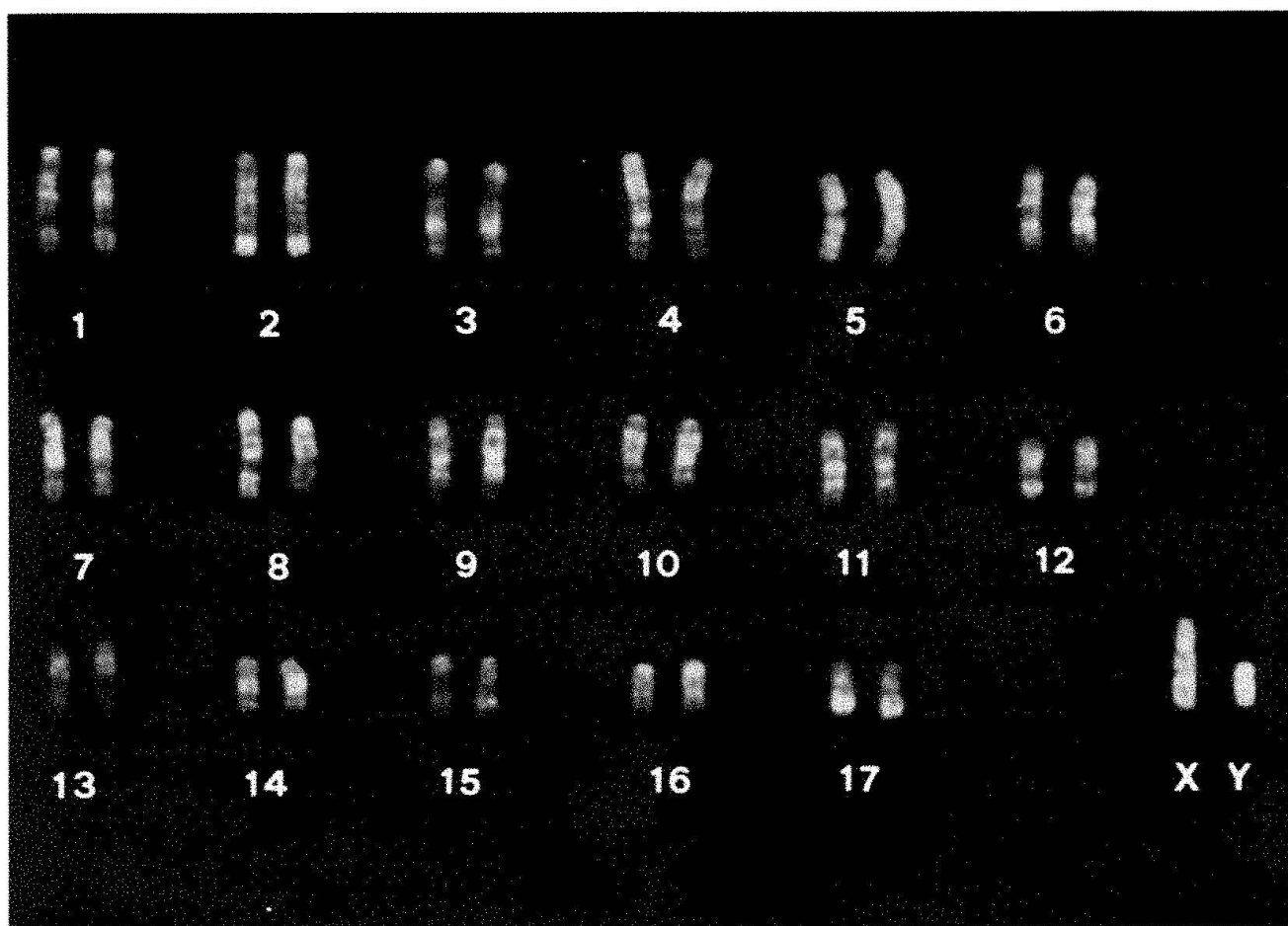


Fig. 4 et 5. *Mus setulosus* ♂: la même métaphase colorée successivement en bandes Q et en bandes C.

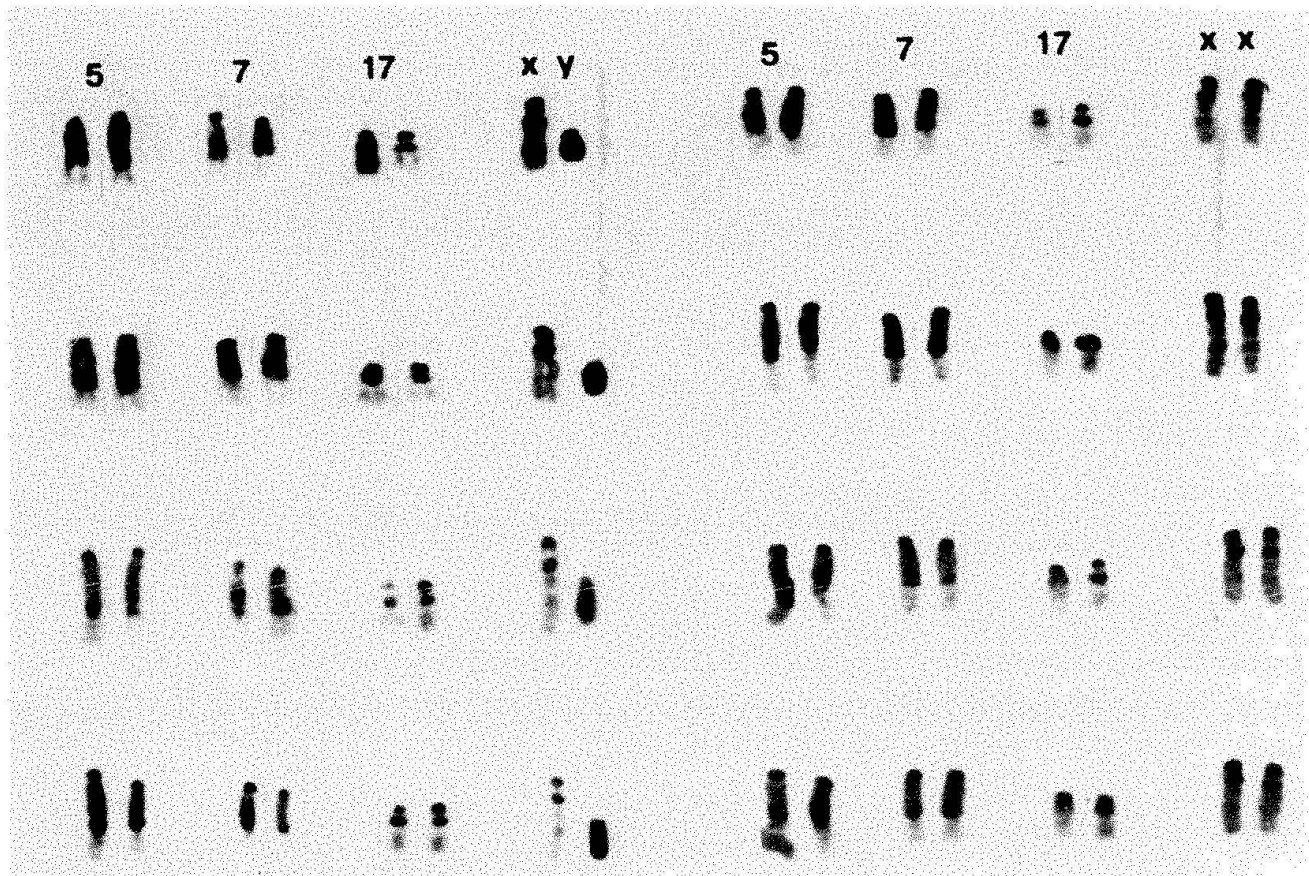


Fig. 6. Les autosomes des paires 5, 7, 17 et les chromosomes sexuels (bandes C) chez un *Mus setulosus* ♂ (4 métaphases) et un *Mus setulosus* ♀ (4 métaphases).

diffuse et compacte. L'X et l'Y se trouvent l'un à côté de l'autre et sont situés à la périphérie du noyau. Ils sont fins et néanmoins plus spiralisés que les autosomes; ils se colorent plus intensément qu'eux. Au niveau du nucléole (nu), on distingue un précipité argentique important.

Au cours de la zygoténie (8b, c, d), les chromosomes sexuels restent à la périphérie du noyau; ils sont enchevêtrés l'un dans l'autre ou situés l'un près de l'autre, mais ne présentent aucun signe d'appariement (fig. 9). Ils se colorent plus intensément que les autosomes. Au niveau de ceux-ci débute le processus de synapsis et des fragments de complexe synaptinémique deviennent visibles. Le grand précipité argentique observé au niveau du nucléole leptotène est fractionné en des Ag-NORS qui sont le plus souvent au nombre de 5 et dont la taille augmente au cours de la zygoténie.

Au cours de la pachyténie se développe la vésicule sexuelle, au niveau de laquelle on

observe un précipité argentique dont l'intensité augmente au fur et à mesure du déroulement du stade. Au sein de la vésicule sexuelle, les chromosomes X et Y peuvent présenter diverses orientations (fig. 8e, f, g). Le chromosome X a généralement l'allure d'un U au sommet duquel il est parfois possible d'observer une structure en «épingle à cheveux» (fig. 9g). Au cours de la pachyténie, le volume de la vésicule sexuelle diminue, et les hétérochromosomes, tout en se contractant, deviennent compacts. Malgré leur proximité les chromosomes X et Y ne s'apparient pas. Au niveau des autosomes, les éléments axiaux des complexes synaptinémiques sont distincts. Le nombre de précipités argentiques est difficile à estimer. Il n'est pas égal à la demi du nombre observé en leptoténie et en zygoténie, ainsi qu'on pourrait s'y attendre en raison de l'appariement synaptique. Au cours de la pachyténie, les blocs argentiques disparaissent alors que les centromères présentent une réaction argentique positive.

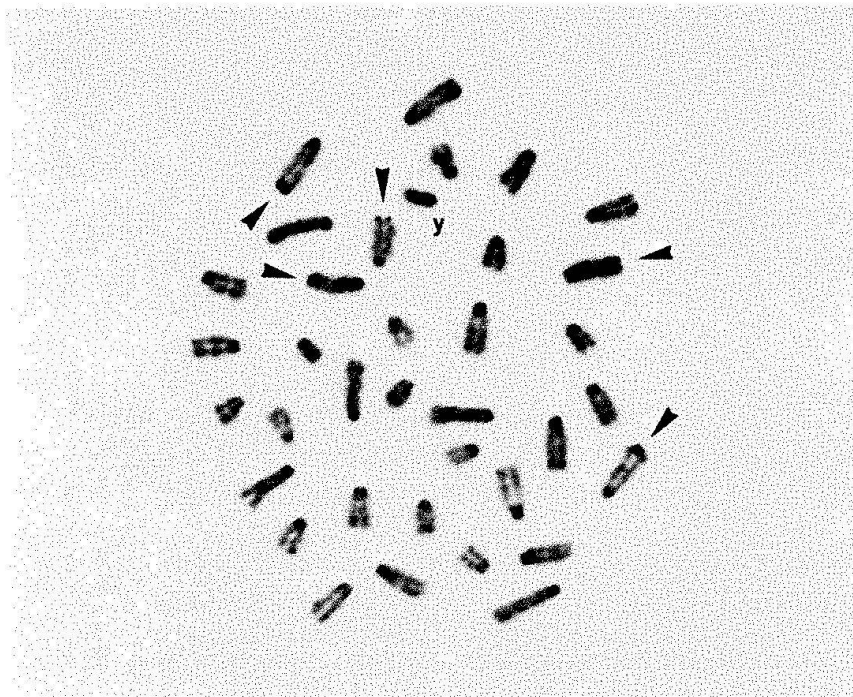


Fig. 7. *Mus setulosus*: métaphase spermatogoniale colorée selon la méthode argentique. Cinq chromosomes présentent un précipité argentique à l'extrémité distale de leurs bras longs (flèches).

En diploténie et en diacinèse (fig. 8h et 8i), l'X et l'Y sont le plus souvent éloignés l'un de l'autre. Parfois, ils sont accolés, mais il s'agit plutôt d'un rapprochement extrême dû à un artéfact technique que d'une association véritable. L'X et l'Y restent relativement plus colorés que les autosomes. Ceux-ci réagissent faiblement à la coloration argentique. On note néanmoins un léger précipité au niveau des centromères. Il n'y a pas trace de nucléoles ou d'Ag-NORS.

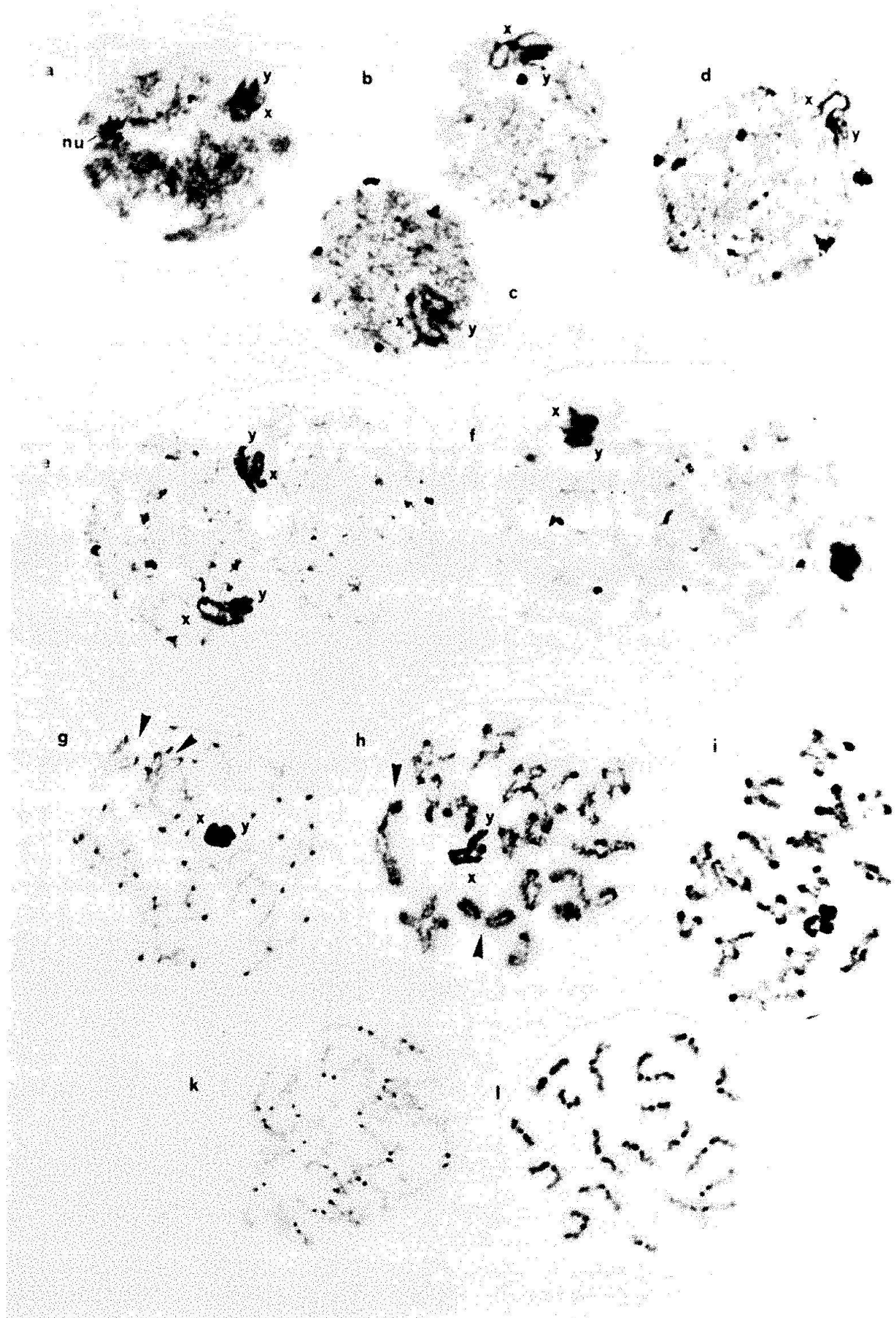
Les fig. 8k et 8l se rapportent à des métaphases II, l'une (8l) plus avancée que l'autre. Là aussi, il n'y a pas d'Ag-NORS et les centromères se colorent positivement.

b) Bandes C

Les fig. 10a, b, c et d se rapportent à des pachyténies, la première étant la moins avancée, ainsi qu'en atteste l'arrangement des autosomes «en bouquet». Dans ces 4 figures, on distingue la vésicule sexuelle (la morphologie de l'X et de l'Y n'est pas claire), les centromères des autosomes et une masse sombre, parfois deux, à l'intérieur desquelles se distinguent deux éléments dont les propriétés hétérochromatiques laissent supposer qu'il s'agit des bivalents 5 et 7. La comparaison de plusieurs noyaux pachytènes montre que la disposition de ces deux bivalents peut varier à l'intérieur de la vésicule. Il n'y a pas

d'appariement au niveau des régions hétérochromatiques des chromosomes 5 et 7. La vésicule hétérochromatique est toujours fortement colorée, ce qui laisse supposer l'accumulation à cet endroit de certains produits de synthèse. En diploténie et diacinèse (fig. 10e, f, g), les tétrades 5 et 7 s'identifient facilement, d'une part en raison de leurs propriétés hétérochromatiques et d'autre part parce que la terminalisation des chiasmats y a lieu beaucoup plus rapidement qu'au niveau des autres autosomes. Dans la figure 10e, les chromosomes X et Y sont dans le prolongement l'un de l'autre. L'identification des zones hétérochromatiques permet de montrer que l'association a lieu entre le télomère du bras long du chromosome X et l'un des télomères du chromosome Y. Dans la fig. f, l'X et l'Y sont proches sans être associés. Dans ce cas, l'Y se trouve à proximité du centromère de l'X. Dans la fig. 10g, l'X ET l'Y sont tout à fait séparés. L'X présente une allure particulière «en anneau» à cause du rapprochement de ses deux télomères. Une telle configuration a été observée à plusieurs reprises.

Les fig. 10h et i se rapportent à deux spermatocytes en métaphase II, l'un doté du chromosome X et l'autre du chromosome Y. A noter les chromosomes 5 et 7 dans les deux métaphases.



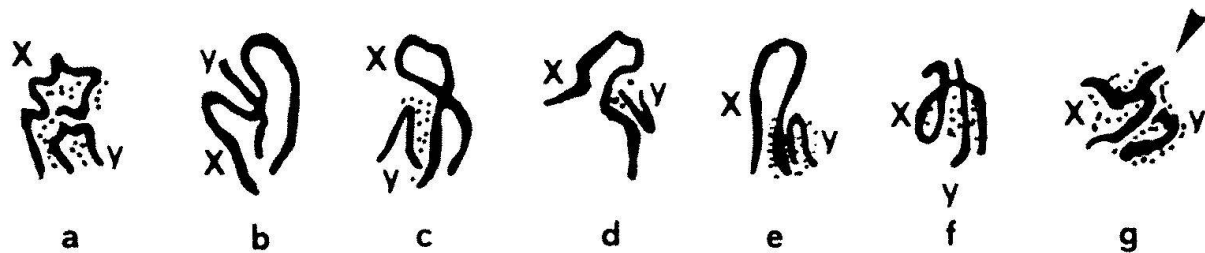


Fig. 9. Représentation graphique de l'X et de l'Y colorés par le nitrate d'argent: a) leptoténie, b, c, d) zygoténie, e, f) pachyténie jeune, g) pachyténie avancée.

Bien que l'X et l'Y restent à proximité l'un de l'autre, il n'y a pas d'appariement. L'X et l'Y peuvent occuper diverses positions l'un par rapport à l'autre. L'X est généralement replié et prend la forme d'un U. Parfois, en pachyténie avancée (g), il est possible de distinguer une structure «en épingle à cheveux» au sommet de la courbe de l'X. L'Y peut être replié ou rectiligne. Les pointillés signalent les zones de coloration argentique intense.

Discussion

La vésicule sexuelle et le comportement méiotique de l'X et de l'Y.

Chez les Mammifères en général, les chromosomes X et Y forment, au cours de la pachyténie, une structure amorphe que l'on appelle la vésicule sexuelle. Comme c'est le cas chez *Mus musculus*, les chromosomes sexuels et la vésicule sexuelle de *M. setulosus* ont la propriété de se colorer intensément en présence de nitrate d'argent, alors que les bivalents autosomiques ne réagissent pas ou presque pas à la coloration argentique. Pathak et Hsu (1979) supposent que cette différence de colorabilité réside dans le fait que les autosomes sont le site d'une transcription intense alors que les chromosomes sexuels sont «inertes». L'X a généralement la forme d'un U au sommet duquel on observe parfois une configuration en «épingle à cheveux». Nous n'avons pas observé un site de synthèse particulier le long du chromosome X comme c'est le cas chez *Mus musculus*.

L'appariement incomplet de l'X et de l'Y représente un phénomène commun chez les Mammifères, indépendant de la taille et de la morphologie des chromosomes sexuels (Pathak, 1980). Par contre, l'absence d'appariement synaptique entre l'X et l'Y représente une situation rare, qui a été décrite jusqu'ici chez 5 espèces de Mammifères seulement, soit *Monodelphis dimidiata* (opossum à queue courte), *Psammomys obesus* (rat des sables), *Didelphis virginiana* (opossum de Virginie), *Baiomys musculus* («southern pigmy mouse») et *Microtus agrestis* (campagnol des champs).

Le comportement méiotique des chromosomes sexuels de *Mus setulosus* ressemble étroitement à celui des hétérochromosomes de *Didelphis virginiana*. Dans notre matériel, il n'a pas été possible de mettre en évidence un complexe synaptinémique entre l'X et l'Y. Dans les figures diploténiques où l'X et l'Y se trouvent situés l'un à côté de l'autre, on a davantage l'impression d'une proximité que d'une association. D'ailleurs, les cas de proximité sont rares puisque sur 37 figures

Fig. 8. *Mus setulosus*: les différents stades de la spermatogénèse selon la coloration argentique. En leptoténie (a), l'X et l'Y se colorent plus intensément que les autosomes. Ils sont situés à la périphérie du noyau. Un précipité argentique important permet de mettre le nucléole (nu) en évidence. Au cours de la zygoténie (b, c, d), les chromosomes sexuels gardent la propriété de se colorer plus intensément que les autosomes. Ils restent en bordure du noyau. Quelques fragments de complexe synaptinémique (CS) apparaissent. On note dans chaque noyau plusieurs précipités argentiques de grande taille. Lors de la pachyténie (e, f, g) apparaît la vésicule sexuelle qui se colore fortement par le nitrate d'argent et au sein de laquelle l'X et l'Y présentent diverses orientations. Au fur et à mesure que la pachyténie avance, les chromosomes sexuels se raccourcissent. Les éléments axiaux des CS sont distincts. Les centromères autosomiques se colorent positivement. Les bivalents 5 et 7 s'identifient facilement (g, flèches); ils ne présentent pas de chiasmas au niveau des zones hétérochromatiques. Entre e et g, le nombre et la taille des précipités argentiques diminuent. En diploténie et diacinèse (h, i), les chromosomes sexuels sont contractés et se colorent vivement. La terminalisation des chiasmas s'effectue très rapidement au niveau des bivalents 5 et 7 (h). Les centromères se colorent positivement. Il n'y a pas d'Ag-NOR. En métaphases II (k, l), les centromères se colorent positivement; il n'y a pas trace de nucléole ou d'Ag-NOR.



analysées, 24 révèlent des chromosomes tout à fait séparés, 9 des chromosomes sexuels proches, mais non associés, et 4 montrent l'X et l'Y dans le prolongement l'un de l'autre.

Solari et Ashley (1977) proposent qu'il n'y a pas formation de complexe synaptinémique entre l'X et l'Y de *Psammomys obesus* parce que les régions d'appariement ont été déplacées ou modifiées par l'addition de matériel hétérochromatique à l'extrémité de l'X. Chez *Mus setulosus*, le chromosome X présente une bande hétérochromatique subterminale et l'Y est entièrement hétérochromatique. L'absence d'appariement pourrait résulter de la nature des extrémités distales de l'X et de l'Y. En effet, Gropp et al. (1969) chez *Erinaceus europaeus* et Zenzes et Wolff (1971) chez *Microtus agrestis* ont démontré qu'il n'y a pas formation de chiasma au niveau des zones hétérochromatiques lors de la prophase de première division méiotique.

Se basant sur leurs observations portant chez *Baiomys musculus* et *Didelphis virginiana*, Pathak et al. (1980) pensent qu'en l'absence de complexe synaptinémique, les télomères eux-mêmes peuvent constituer une zone d'appariement entre les chromosomes sexuels. Le repli des bras chromosomiques et l'association des télomères autologues montrent qu'il existe autant d'homologie entre les télomères de l'X qu'entre les télomères de l'X et de l'Y. Les télomères de l'X de *Mus setulosus* manifestent une telle homologie car il n'est pas rare de trouver des figures diplo-téniques ou diacinétiques où cet élément, replié sur lui-même, prend la forme d'un anneau.

Le comportement méiotique des chromosomes des paires 5 et 7.

Gagné (1972, 73, 74) et Stahl (1974) ont montré qu'au cours des stades zygotènes et pachytènes de la spermatogénèse humaine, les zones hétérochromatiques des chromo-

somes 1, 9 et 16 sont associées à des paramères, sortes de vésicules ayant l'aspect de petits nucléoles. Les mêmes observations ont été faites sur les ovocytes humains au même stade. L'hétérochromatine constitutive, dont l'activité de transcription est nulle dans les cellules somatiques, pourrait être le site d'une synthèse active au cours de la prophase de la première division méiotique. La grande ressemblance qu'il y a entre nucléoles et paramères a laissé supposer que ceux-ci pourraient consister en r-RNA et en protéines ribosomales. Des expériences d'hybridation in situ ont montré qu'il ne s'agit pas de r-RNA 18 S ou 28 S.

Le comportement méiotique des segments hétérochromatiques des paires 5 et 7 de *Mus setulosus* ressemble à celui de l'hétérochromatine des chromosomes humains 1, 9 et 16. S'il n'est pas possible de mettre en évidence des paramères analogues à ceux observés par Gagné et Stahl, la coloration en bandes C de même que la coloration argentique révèlent l'accumulation de matériel de synthèse au niveau de ces deux bivalents qui, dans la plupart des figures, se trouvent proches l'un de l'autre, voire enchevêtrés.

L'activité des NORS au cours de la spermatogénèse

La coloration argentique constitue un test de l'activité des organisateurs nucléolaires car seuls les NORS qui sont en phase de synthèse ou qui l'ont été précédemment se colorent positivement. Hofgärtner et al. (1979) ont montré que la synthèse du RNA ribosomal et la coloration argentique déclinent au cours de la fin de la pachyténie, pour devenir imperceptible en diploténie, en diacinèse et lors des métaphases I et II. Il en va de même chez *Mus setulosus* où, de la pachyténie au premier stade de la spermiogénèse, il n'y a pas d'Ag-NORS décelables. De la diploténie à la métaphase II, les centromères se colorent

Fig. 10. *Mus setulosus*: les différents stades de la spermatogénèse selon la coloration en bandes C. Dans les noyaux pachytènes (a, b, c, d), on observe deux vésicules, la vésicule sexuelle (VS), où il est difficile de préciser le contour de l'X et de l'Y, et une vésicule sombre à l'intérieur de laquelle se distinguent deux éléments hétérochromatiques (bivalents 5 et 7). En diacinèse et métaphase I (e, f, g), les tétrades 5 et 7 s'identifient facilement (flèches). L'X et l'Y ne sont pas associés, même s'ils se situent dans le prolongement l'un de l'autre. A noter l'X en anneau (g). Les figures h et i se rapportent à deux spermatocytes en métaphase II, l'un doté d'un X (h), l'autre d'un Y (i). Dans les deux cas, les chromosomes 5 et 7 s'identifient aisément (flèches). De la prophase à la métaphase II, les centromères se colorent intensément.

positivement à l'image de ce qui se passe chez *Mus musculus* (Pathak et al. 1979).

Le genre Mus: taxonomie et évolution

Ellermann (1941, 1947) répartit les *Mus* qu'il considère comme un genre parfaitement naturel en six groupes, dont trois groupes eurasiatiques *booduga/dunni*, *cervicolor/musculus*, *platythrix* et trois groupes africains *bufotriton*, *minutoides* et *tenellus*.

L'hypothèse classique de la différenciation des espèces du genre *Mus* (Jotterand 1971) repose sur deux critères, les données cytogénétiques traditionnelles et les données statistiques (Matthey, 1958-1970) selon lesquelles chez les Euthériens plus du 50% des formules chromosomiques sont situées dans le «spectre des valeurs modales» (2n compris entre 40 et 56). Chez les Muridae, le 62,6% des espèces sont comprises dans cette bande et les valeurs inférieures à 40 ne se rencontrent que dans le 5,5% des cas. Il était donc tentant d'attribuer un caractère primitif aux formes ayant les nombres diploïdes les plus élevés, donc de considérer *Mus dunni* comme la souris la plus proche de l'ancêtre du genre (Matthey et Petter, 1968), dont auraient dérivé les *Mus* des groupes *musculus* et *booduga* puis, plus loin, ceux du groupe *platythrix* et les *Mus* africains.

Des arguments modernes relevant de l'écologie, des ectoparasites, de la cytologie et de la morphologie montrent que Ellermann est allé trop loin dans son désir de simplifier la classification des *Mus*. Marshall (1977) propose de répartir les souris asiatiques en 3 sous-genres: *Pyromys* («spiny-mice») qui groupe les espèces *saxicola*, *platythrix*, *shortridgei*, *phillipsi* et *fernandosi*, *Coelomys* («shrew mice») avec *M. pahari*, *M. mayori*, *M. crociduroides*, *M. vulcani*, *M. famulus* et *Mus* constitué par *M. caroli*, *M. cervicolor*, *M. cookii*, *M. dunni*, *M. booduga*, *M. booduga fulvidiventris*, *M. booduga lepidoides*, *Mus musculus* et sous-espèces, *M. poschiavinus*.

Les données cytogénétiques relatives à ces 3 entités systématiques sont nombreuses, tout en étant incomplètes.

Si les données traditionnelles ont permis de formuler un schéma simple et satisfaisant de la différenciation des *Mus* eurasiatiques, les résultats actuels sont beaucoup plus difficiles à interpréter. Non seulement, ils ne permet-

tent pas de confirmer les hypothèses précédentes, mais encore ils ne suggèrent aucune relation caryologique simple entre les trois entités systématiques de Marshall.

Le sous-genre *Pyromys* présente une grande diversité chromosomique, les nombres diploïdes oscillant entre 22 et 49, les NF entre 26 et 52 (Pathak, 1970, Dhanda et al., 1973, Satya Prakash, 1972). Si l'on tient compte du «spectre des valeurs modales», on pourrait être tenté de considérer *Mus shortridgei* (Gropp et al., 1973) comme l'ancêtre du groupe. Cependant, la nature de son caryotype et surtout la présence de chromosomes surnuméraires rendent une telle hypothèse caduque.

Nous n'avons pas assez de données sur les *Coelomys* (Gropp et al., 1973) pour qu'il soit possible d'envisager la cytotaxonomie de ce groupe.

La plupart des espèces du sous-genre *Mus* présentent le même arrangement chromatinien, même si dans certains cas le nombre diploïde est inférieur à 40 (Markvong et al., 1975, Dev et al., 1976, Hsu et al. 1978). Si la réalisation de fusions centriques implique des modifications structurelles au niveau des régions centromériques, elle ne modifie pas la répartition de l'euchromatine et de l'hétérochromatine le long des bras chromosomiques (Gropp et al., 1970-72, Capanna et al., 1976). Le cas de *Mus dunni* est particulier (Markvong et al., 1975). Les propriétés hétérochromatiques des chromosomes de cette espèce (X, Y, bras courts autosomiques) ne permettent pas de confirmer l'hypothèse selon laquelle *Mus booduga* dériverait de *Mus dunni* par inversions péricentriques et translocations (Matthey et Petter, 1968). Les deux espèces différant par leur contenu en hétérochromatine, il est probable que le caryotype de *Mus dunni* tire son origine de celui de *Mus booduga* par l'hétérochromatinisation d'une partie du génome ou par la duplication répétée de certains segments hétérochromatiques. *Mus booduga* et *Mus dunni* sont sympatriques et Markvong (1975) d'ajouter: «It is tempting to speculate that heterochromatin may play a role in species isolation». La situation observée chez *Mus dunni* se rapproche de celle décrite par Pathak et al. (1973) chez les *Peromyscus*.

L'interprétation des différences caryotypiques qui existent entre *Mus*, *Pyromys* et

Coelomys est rendue d'autant plus difficile que dans ces deux derniers sous-genres la répartition des zones eu- et hétérochromatiques est mal connue. Les seules données dont nous disposons consistent en l'étude comparée des caryotypes de *Mus shorridgei*, *Mus pahari* et *Mus musculus* qui en présentent aucune analogie de «banding pattern» (Hsu et al., 1978).

La différenciation des Muridae à partir des Cricetidae remonte au Miocène et il est généralement admis qu'elle a eu lieu dans le Sud Est Asiatique. La présence de Muridae en Afrique implique la migration de ceux-ci à travers les régions subdésertiques irako-iraniennes et certaines formes de savanes, seules aptes à supporter les conditions écologiques d'alors, atteignirent l'Arabie, d'où à la faveur de connexions terrestres unissant celle-ci à l'Afrique, elles gagnèrent ce continent au Miocène supérieur et au Pliocène. La découverte de Muridae fossiles dans le Tertiaire africain pourrait conduire à modifier cette conception. Le berceau du groupe serait en Afrique et le peuplement de l'Asie se serait ultérieurement produit. Thenius (1969) estime que cette hypothèse est néanmoins moins probable.

Les *Mus* africains des groupes *bufo/triton*, *minutoides* et *tenellus* sont très disparates et Petter (Jotterand, 1971) renonce à constituer des groupes d'espèces à partir des Leggadas africaines. *Mus setulosus* avec ses chromosomes sexuels de type primitif (Jotterand, 1971), son nombre diploïde et son nombre fondamental de 36, se rapproche le plus de l'ancêtre présomptif des *Mus* africains. Les critères morphologiques et caryologiques traditionnels font dériver *Mus setulosus* des *Mus* du groupe *musculus*.

L'analyse comparée des bandes G révèle de nombreuses analogies entre *Mus musculus* et *Mus setulosus*. Les paires *setulosus* 4, 12, 13, 14 et 15 s'homologuent parfaitement aux paires *musculus* 1, 10, 11, 12 et 13 respectivement. Les chromosomes 6 de *setulosus* se rapprochent étroitement des 8 de *musculus*, bien que ceux-ci présentent un petit espace clair juxta-centromérique qui fait défaut sur les 6 de *setulosus*. Les chromosomes 8 de *setulosus* présentent un problème d'homologie. Dotés d'une zone claire intercalaire aisément reconnaissable, ils sont aussi proches des chromosomes 3 que des chromosomes 8 de

musculus. Cependant, compte tenu de l'étendue de la zone claire intercalaire, les chromosomes 8 de *setulosus* semblent s'apparenter davantage aux *musculus* 8 qu'aux *musculus* 3. Les paires *setulosus* 1 et 2 s'homologuent partiellement ($\frac{2}{3}$ distaux) aux paires 9 et 14 de *Mus musculus*. Les chromosomes *setulosus* 10 présentent un espace clair caractéristique en dessous du centromère que l'on retrouve, bien que légèrement déplacé, le long du bras long des chromosomes *musculus* 2. Les paires *setulosus* 16 et 17 sont difficiles à comparer car leur «banding pattern» n'a rien de particulier. Néanmoins, il est possible de les rapprocher des paires *musculus* 18 et 16 respectivement. Les paires 3, 5, 7, 9 et 11 de *Mus setulosus* n'ont pas d'homologues chez *Mus musculus*. Le chromosome X de *setulosus* présente la même morphologie et la même succession de bandes que l'X de la souris domestique. Le chromosome Y, le plus petit des chromosomes dans les deux compléments respectifs, se colore de manière uniforme dans les deux espèces.

Chez *Mus musculus*, seuls les centromères réagissent en bandes C. La situation s'avère légèrement différente chez *Mus setulosus* où, en plus des centromères, 4 paires chromosomiques répondent positivement à la coloration. Les paires 5 et 7 présentent un bloc hétérochromatique s'étendant sur les $\frac{2}{3}$ proximaux du bras long. Il est intéressant de rappeler que l'autoradiographie (Jotterand, 1972) a révélé dans les deux sexes la présence de 4 autosomes particuliers dont les bras longs sont presque entièrement late replicating. La paire 17 présente deux bandes sombres dont l'étendue peut varier légèrement d'un homologue à l'autre. Le chromosome X présente un centromère très coloré, une première bande sombre située un peu en dessous du centromère, et une deuxième bande, relativement moins importante, située à la limite entre les 2^e et 3^e tiers distaux. Le chromosome Y est entièrement hétérochromatique et late replicating (Jotterand, 1972). En plus des bandes C que nous venons de décrire, on observe le long de certains autosomes des segments qui, bien que beaucoup moins colorés que les bandes C, le sont légèrement plus que le reste du bras. La morphologie de ces zones n'étant pas bien définie, et le caractère de la coloration laissant supposer qu'il ne s'agit pas d'hétéro-

chromatine constitutive traditionnelle, nous n'en tiendrons pas compte ici.

La grande ressemblance qui existe entre les caryotypes de *Mus musculus* et de *Mus setulosus* confirme l'hypothèse selon laquelle *Mus setulosus* dériverait des *Mus* du groupe *musculus*. Néanmoins, l'existence de paires non homologues et plus particulièrement les différences qui résident au niveau de la disposition et de l'étendue des zones hétérochromatiques démontrent que le caryotype de *Mus setulosus*, en dérivant du type *musculus*, a fait l'objet de plusieurs remaniements chromosomiques dont il n'est pas possible de déterminer la nature précise, malgré le raffinement des méthodes de coloration différentielles.

Faute de connaissances sur les «banding pattern» des *Pyromys* et des *Coelomys*, nous n'avons pu y comparer *Mus setulosus*.

Résumé

Les chromosomes de *Mus setulosus* sont décrits en bandes G, Q et C. Chez le ♂, cinq chromosomes sont dotés d'un Ag-NOR, situé à l'extrémité distale du bras long. Les divisions méiotiques de *Mus setulosus* ♂ ont été étudiées selon la coloration argentique et en bandes C. L'X et l'Y restent l'un près de l'autre au cours des stades leptotène, zygotène et pachytène; ils n'établissent pas d'association end-to-end ou side-by-side. Lors de la diploténie, de la diacinèse et de la métaphase I, ils sont le plus souvent éloignés l'un de l'autre. A la pachyténie, les bivalents 5 et 7 sont situés l'un à côté de l'autre et s'entourent d'une «vésicule hétérochromatique». La synthèse du r-RNA décline vers la fin de la pachyténie et s'arrête pendant la diploténie, la diacinèse, les métaphases I et II. Au cours de ces quatre derniers stades, les centromères sont Ag-positifs. L'étude comparée des données récentes de la systématique et de la cytogénétique permet de faire quelques considérations sur la cytotaxonomie des *Mus* eurasiatiques et africains. L'analyse comparée des bandes G révèle de nombreuses analogies entre *Mus musculus* et *Mus setulosus*, ce qui confirme l'hypothèse selon laquelle *Mus setulosus* dériverait des *Mus* du groupe *musculus*. Néanmoins, l'existence de paires non-homologues et les différences qui

résident au niveau de la distribution et l'étendue des zones hétérochromatiques démontrent que la dérivation du caryotype de *setulosus* à partir de celui de *musculus* a impliqué des remaniements chromosomiques complexes, dont la nature n'a pu être précisée malgré le raffinement des méthodes de coloration actuelles.

Références

- Capanna, E., Gropp, A., Winking, H., Noack, G. and Civitelli, M.-V.: Robertsonian metacentrics in the Mouse. *Chromosoma* 58: 341-353 (1976).
- Caspersson, T., Zech, L., Modest, E.J., Foley, G.E., Wagh, U. and Simonsson, E.: Chemical differentiations with fluorescent alkylating agents in *Vicia faba* metaphase chromosomes. *Exp. Cell Res.* 58: 146-152 (1969).
- Caspersson, T., Zech, L. and Johansson, C.: Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Exp. Cell Res.* 60: 315-319 (1970).
- Dev, V.G., Miller, D.A., Tantravahi, A., Schrech, R.P., Roderich, T.-H., Erlanger, B.P. and Miller, O.J.: Chromosome markers in *Mus musculus*: differences in C-banding between the subspecies *M. m. musculus* and *M. m. molossinus*. *Chromosoma* 53: 335-344 (1975).
- Dhanda, V., Mishra, A.C., Bhat, U.K.M. and Wagh, U.V.: Karyological studies in two sibling species of the spiny-mouse *Mus saxicola* and *Mus platythrix*. *The Nucleus* 16: 56-59 (1973).
- Ellermann, J.R.: The families and genera of living rodents. *Trust. Brit. Mus., London*, 1940-1941.
- Ellermann, J.R.: A key to the Rodentia inhabiting India, Ceylon and Burma based on collections in the British Museum. *J. Mammalogy* 28: 357-387 (1947).
- Evans, E.P., Breckon, G. and Ford, C.E.: An air-drying method for meiotic preparations from mammalian testes. *Cytogenetics* 3: 289-294 (1964).
- Gagné, R. and Laberge, C.: Specific cytological recognition of the heterochromatic segment of number 9 chromosome in man. *Exp. Cell Res.* 73: 239-242 (1972).
- Gagné, R., Laberge, C. et Tanguay, R.: Aspect cytologique et localisation intranucléaire de l'hétérochromatine constitutive des chromosomes C 9 chez l'homme. *Chromosoma* 41: 159-166 (1973).
- Gagné, R., Luciani, J.M., Devictor-Vuillet, M. and Stahl, A.: C 9 heterochromatin during the first meiotic prophase of human fetal ovocyte. *Exp. Cell Res.* 85: 111-116 (1974).
- Gropp, A., Citoler, P. und Geisler, M.: Karyotypvariation und Heterochromatinstmuster bei Igel (Erinaceus und Hemiechinus). *Chromosoma* 27: 288-307 (1969).
- Gropp, A., Tettenborn, U. und v. Lehmann, E.: Chromosomenvariation vom Robertsonischen Typus bei der Tabakmaus, *Mus poschiavinus* und ihren Hybriden. *Cytogenetics* 9: 9-23 (1970).

- Gropp, A., Winking, H., Zech, L. and Müller, H.J.: Robertsonian chromosomal variation and identification of metacentric chromosomes in feral mice. *Chromosoma* 39: 265-288 (1972).
- Gropp, A., Marshall, J. and Markvong, A.: Chromosomal findings in the Spiny Mice of Thailand (Genus *Mus*) and occurrence of a complex intraspecific variation in *M. shortridgei*. *Z. Säugetierkunde* 38: 159-168 (1973).
- Hofgärtner, F.J., Schmid, M., Krone, W., Zenzen, M.T. and Engel, W.: Pattern of activity of nucleolus organizers during spermatogenesis in Mammals as analyzed by silver-staining. *Chromosoma* 71: 197-216 (1979).
- Howell, W.M. and Black, D.A.: A rapid technique for producing silver-stained nucleolus organizer regions and trypsin-Giemsa bands in human chromosomes. *Hum. Genet.* 43: 53-56 (1978).
- Hsu, T.C. and Kellogg, D.S.: Primary cultivation and continuous propagation *in vitro* of tissues from small biopsy specimens. *J. Nat. Cancer Inst.* 25: 221-235 (1960).
- Hsu, T.C., Markvong, A. and Marshall, J.T.: G-band patterns of six species of mice belonging to subgenus *Mus*. *Cytogenet. Cell Genet.* 20: 304-307 (1978).
- Jotterand, M.: Le polymorphisme chromosomique des *Mus* (Leggadas) africains. *Cytogénétique, zoogéographie, évolution. Rev. Suisse Zool.* 79: 287-359 (1972).
- Markvong, A., Marshall, J.T., Pathak, J.S. and Hsu, T.C.: Chromosomes and DNA of *Mus*: the karyotypes of *M. fulvidiventr* and *M. dunni*. *Cytogenet. Cell Genet.* 14: 116-125 (1975).
- Marshall, J.T.: A synopsis of Asian species of *Mus* (Rodentia, Muridae). *Bull. Amer. Museum Nat. History* 158: 176-220 (1977).
- Matthey, R. et Petter, F.: Existence de deux espèces distinctes, l'une chromosomiquement polymorphe, chez des *Mus* indiens du groupe booduga. *Etude cytogénétique et taxonomique. Rev. Suisse Zool.* 75: 471-498 (1968).
- Matthey, R., 1958-1970. Pour les références à ces travaux cf. *Cytotaxonomy and Evolution*, pp. 513-616. Acad. Press, London, New York 1973.
- Pathak, S.: The karyotype of *Mus platythrix* Bennett (1832), a favorable mammal for cytogenetic investigation. *Mamm. Chrom. Newsl.* 11: 105 (1970).
- Pathak, S., Hsu, T.C. and Arrighi, F.E.: Chromosomes of *Peromyscus* (Rodentia, Cricetidae). IV. The role of heterochromatin in karyotypic evolution. *Cytogenet. Cell Genet.* 12: 315-326 (1973).
- Pathak, S. and Hsu, T.C.: Silver-stained structures in Mammalian meiotic prophase. *Chromosoma* 70: 195-203 (1979).
- Pathak, S., Elder, F.F.B. and Maxwell, B.L.: Asynaptic behavior of X and Y chromosomes in the Virginia opossum and the southern pigmy mouse. *Cytogenet. Cell Genet.* 26: 142-149 (1980).
- Salamanca, F. and Armendares, S.: C-bands in human metaphase chromosomes treated by Ba(OH)₂. *Ann. Génét.* 17: 135-136 (1974).
- Satya Prakash, K.L. and Aswathanarayana, N.V.: Somatic chromosomes in the field mouse *Mus booduga* (Gray). *Mamm. Chrom. Newsl.* 13: 110 (1972).
- Satya Prakash, S. and Aswathanarayana, N.V.: The chromosomes of the spiny mouse *Mus platythrix*. *Mamm. Chrom. Newsl.* 13: 120 (1972).
- Seabright, M.: Rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* II: 971 (1971).
- Solari, H.J. and Ashley, T.: Ultrastructure and behavior of the achiasmatic, telosynaptic XY pair of the sand-rat (*Psammomys obesus*). *Chromosoma* 62: 319-336 (1977).
- Stahl, A., Luciani, J.M., Gagné, R., Devictor, M. and Capodano, A.M.: Heterochromatin, micronucleoli and RNA containing body in the diplotene stage of the human oocyte. *Chromosomes Today* 5: 65-73 (1974).
- Thenius, E.: Phylogenie der Mammalia. Stammgeschichte der Säugetiere (einschliesslich der Hominiden). (W. de Gruyter, Berlin 1969).
- Zenzen, M.T. und Wolf, U.: Paarungsverhalten der Geschlechtschromosomen in der männlichen Meiose von *Microtus agrestis*. *Chromosoma* 33: 41-47 (1971).

Adresse de l'auteur:

Dr. Martine Jotterand-Bellomo
Division autonome de Génétique Médicale, CHUV
CH-1011 Lausanne

Evolution chromosomique chez les primates

Bernard Dutrillaux, Jérôme Couturier, Evani Viegas-Péquignot

Les progrès de la cytogénétique comparée des primates ont suivi ceux de la cytogénétique humaine. Au début des années 60, Chiarelli (1961), Hamerton et coll. (1961), Chu et Bender (1962) parmi d'autres ont trouvé qu'il existait des ressemblances entre le caryotype de l'homme et celui des grands singes: chimpanzé, gorille et orang-outang. Ces études furent poursuivies par l'analyse de nombreuses espèces vivantes, et un grand catalogue descriptif a été établi (Hsu et Bernischke, 1967-1977). Toutefois, la faible résolution des méthodes cytogénétiques anciennes a empêché toute comparaison valable, sauf pour des espèces étroitement apparentées, et dont les chromosomes ont évolué par remaniements simples.

Les années 70 virent le développement des méthodes de marquage chromosomique, qui allaient changer radicalement les potentialités de la cytogénétique. Ces potentialités furent exploitées dès 1972-1973 par Turleau et coll. (1972), Bobrow et Madan (1973), Dutrillaux et coll. (1973), Lejeune et coll. (1973), Pearson (1973), Warburton et coll. (1973) et d'autres encore. Toutefois, ces comparaisons restèrent limitées aux grands singes, jusqu'à ce que Garver et coll. (1977) et Grouchy et coll. (1977) proposent une comparaison du marquage chromosomique et de la cartographie de quelques gènes entre l'homme et deux cercopithécoïdes, au moins pour quelques chromosomes.

Depuis quelques années, une étude plus systématique a été entreprise au laboratoire, sur près de 150 espèces de primates, et de mammifères non primates, montrant que les analogies chromosomiques peuvent être totales entre l'homme et les cercopithécoïdes (Dutrillaux et coll., 1978 a et b) et aussi entre ces derniers et les singes américains (platyrrhiniens) et les primates les plus primitifs que sont les prosimiens (Dutrillaux, 1979a et b). Actuellement, le caryotype de la moitié envi-

ron des espèces de primates vivants a été analysé et comparé, ce qui permet de proposer quelques conclusions générales concernant l'évolution de cet ordre.

Les comparaisons chromosomiques

Identité des bandes chromosomiques euchromatiques

(L'euchromatine représente la partie non variable des chromosomes, qui porte les gènes) Ayant commencé par l'étude approfondie du caryotype humain, une comparaison systématique a été réalisée, avec des espèces de plus en plus distantes. Ces comparaisons ont nécessité des centaines d'analyses, avec plusieurs méthodes différentes pour chaque espèce et il est évident qu'il n'est pas possible d'en donner le détail ici. Aussi n'indiquons-nous que quelques étapes importantes. Entre l'homme et les grands singes, une identité complète des bandes a pu être montrée (Dutrillaux, 1975). Les différences chromosomiques portent sur des remaniements équilibrés, des inversions surtout, ne s'accompagnant d'aucune perte ou gain de matériel. A peu près autant de remaniements séparent le caryotype de l'homme de celui de chacune des espèces de grands singes, et aussi de ces espèces entre elles.

Une identité de bandes quasi complète est également observée si l'on compare le caryotype humain à celui des diverses espèces de cercopithécoïdes, tels les babouins, les macaques et les cercopithèques (Dutrillaux et coll., 1978 a, b) que 25 à 40 remaniements de structure équilibrés séparent, selon les espèces considérées.

Une identité de bandes aussi grande existe si l'on compare l'homme aux platyrrhiniens, tels le singe capucin (*Cebus capucinus*) ou le singe laineux (*Lagothrix lagothricha*), et plus

de 30 remaniements séparent leurs caryotypes (Dutrillaux 1979 a, Dutrillaux et coll., 1980 a).

L'étude, étendue aux prosimiens, tel le *Microcebus murinus* montrait encore une grande similarité de marquage (Dutrillaux, 1979 b).

En conclusion, il semble que les structures euchromatiques soient restées quantitativement et qualitativement stables durant toute l'évolution des primates. Dans les cas où il n'est pas possible d'en faire une démonstration complète, des raisons purement techniques peuvent être invoquées, telles que la présence de microchromosomes difficiles à analyser.

Si l'on compare maintenant les chromosomes des primates à ceux d'espèces appartenant à d'autres ordres de mammifères, il est aussi évident que de grandes similarités existent. Ainsi, on peut trouver les correspondances entre les chromosomes du lapin, appartenant à l'ordre des Lagomorpha et ceux de l'homme. Environ 50 remaniements différencient ces 2 caryotypes (Dutrillaux et coll., 1980 b).

Cartographie génétique comparée

Pour quelques espèces, des gènes ont été localisés sur les chromosomes, et ces localisations ont été comparées. Les résultats obtenus peuvent être ainsi résumés:

- parmi les grands singes et l'homme, des gènes identiques ont été localisés sur des chromosomes présumés analogues, après comparaison des bandes (Garver et coll., 1977, Grouchy et coll., 1977).

- parmi les cercopithecoïdes, plusieurs chromosomes de *Macaca mulatta* (singe rhésus), *Papio papio* (babouin) et de *Cercopithecus aethiops* (singe vert) sont porteurs de gènes déjà localisés sur leurs analogues présumés chez l'homme et les grands singes (Garver et coll., 1977, Grouchy et coll., 1977).

- chez le singe capucin, 5 gènes ont été localisés là où l'on pensait qu'il serait après la comparaison des bandes chromosomiques (Créau-Goldberg et coll., 1980).

Bien sur, ces résultats demeurent très fragmentaires, en regard des milliers de gènes possédés par ces espèces. Il n'en demeure pas moins qu'ils sont en moyenne très convergents et si quelques contradictions demeurent,

il est plus que probable qu'elles puissent être mises au compte des erreurs techniques.

Dès à présent, nous pouvons donc conclure que d'une espèce de primate à l'autre, les mêmes bandes chromosomiques portent en règle les mêmes gènes.

Il est dommage que ni le lapin, dont les chromosomes sont relativement faciles à comparer à ceux de l'homme, ni même aucun carnivore, n'ait fait l'objet d'une étude de la cartographie génique.

Il est aussi dommage que le seul mammifère non primate étudié intensivement soit la souris, car cet animal possède, à notre avis, un caryotype extrêmement différencié, qu'il est très difficile de comparer avec celui des primates. De nombreuses translocations et fissions sont probablement intervenues pour former le caryotype de la souris (données non publiées). Toutefois, pour quelques segments chromosomiques, une analogie peut-être proposée avec prudence: MMU (Mus musculus) 4 = HSA (Homo sapiens) sp, MMU 11 (distal) = HSA 17, MMU 12 (distal) = HSA 14, et MMU 16 (distal) = HSA 21 et les localisations géniques sont en très bon accord.

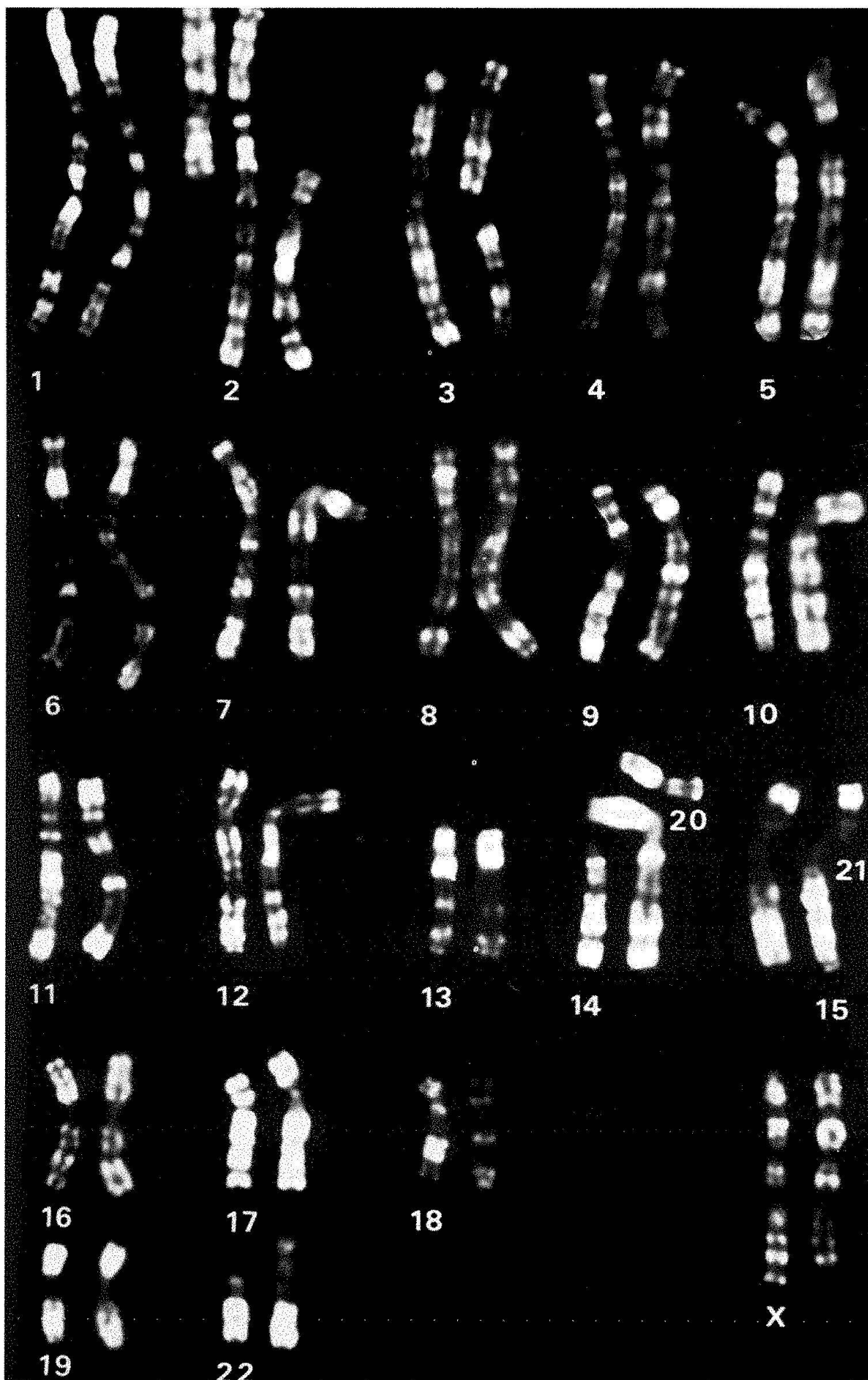
Analyse chromosomique à haute résolution

Les techniques de synchronisation des cultures développées récemment permettent l'observation de longs chromosomes, avec de nombreuses bandes: environ 1000 par caryotype haploïde. Ces techniques appliquées aux grands singes et à l'homme confirment largement les résultats obtenus avant (Yunis, 1980, résultats personnels non publiés). Appliquées aux singes du nouveau monde, ces mêmes techniques ont permis de progresser dans l'analyse (Dutrillaux et coll., 1980 a), de même qu'appliquées à la comparaison homme-non primate (Dutrillaux et coll., 1980 b).

A titre d'exemple, la figure 1 montre la comparaison entre des chromosomes d'un cercopithecoïde (*Allenopithecus nigroviridis*) et ceux de l'homme.

La séquence de réplication de l'ADN

La séquence de réplication de l'ADN est très caractéristique d'un chromosome donné.



Cette étude permet donc d'obtenir une nouvelle cartographie chromosomique, basée sur la dynamique de synthèse du composant essentiel qu'est l'ADN.

Quelques comparaisons ont été effectuées à ce jour avec précision: elles montrent que la même séquence de réplication existe pour les chromosomes analogues de l'homme et du chimpanzé (Viegas-Péquignot et coll., 1978) et pour les chromosomes analogues de l'homme et du singe capucin (Couturier et Dutrillaux, 1981), entre autres espèces analysées.

Ces résultats montrent que la séquence de réplication de l'ADN n'a pas été modifiée par les remaniements de structure qui sont intervenus durant plusieurs dizaines de millions d'années d'évolution des primates.

La phylogénie chromosomique

Deux types principaux d'informations peuvent être tirés des comparaisons chromosomiques intéressant les questions phylogéniques.

Le premier relève de la mise en évidence de chromosomes strictement identiques chez deux ou plusieurs espèces. Ceci amène à penser que ces espèces avaient un ou des ancêtres communs possédant ces mêmes chromosomes. Ainsi peut-on progressivement, reconstituer des caryotypes de plus en plus anciens, en comparant des espèces de plus en plus éloignées. C'est ainsi que nous avons successivement établi le caryotype de l'ancêtre commun aux Pongidae et aux Hominidae, puis celui de l'ancêtre commun de ces derniers et des Cercopithécoïdes, puis celui de tous les simiens, et enfin celui de tous les primates (Dutrillaux, 1979 b).

Un même raisonnement a été suivi pour l'ordre des lagomorphes, celui des carnivores, et celui des rongeurs. Ce qui est frappant, c'est que ces caryotypes ancestraux, indépendamment reconstitués se ressemblent beaucoup, ce qui signifie sans doute que les ancêtres communs à ces 4 ordres de mammifères possédaient eux-même un caryotype très semblable.

C'est ainsi que l'on peut proposer la reconstitution du caryotype de ces mammifères primitifs (fig.2), qui selon les données de la paléontologie, auraient vécu il y a quelques 100 millions d'années. Pour quelques chromosomes, il a fallu faire un choix entre deux ou plusieurs possibilités, de sorte que ce caryotype n'est pas entièrement certain. Toutefois, nous estimons qu'il est pour l'essentiel très proche de la réalité.

Le second type d'information résulte de l'analyse des remaniements de structure. Ainsi, pour les seuls primates, plus de 200 remaniements ont pu être reconstitués. Ceux-ci ont progressivement modifié les chromosomes ancestraux pour leur donner leur aspect actuel.

Pour un chromosome donné, les remaniements sont survenus selon un ordre qu'il est possible de reconstituer, ce qui permet de situer les espèces portant les différentes formes de ce chromosome les unes par rapport aux autres. Ainsi, en considérant l'ensemble du caryotype, peut-on construire une généalogie des espèces dont la figure 3 donne une représentation partielle des résultats obtenus. L'évolution des catarhiniens se trouve indiquée, à l'exclusion des gibbons et des colobes, dont l'étude n'est pas achevée. Chaque trait représente un remaniement chromosomique, et chaque numéro correspond à celui du chromosome humain qui a pris sa configuration actuelle. Ainsi, l'X et le 19 se sont formés avant la séparation des platyrhiniens et des catarhiniens. On peut donc les dater à plus de 40-50 millions d'années, à partir des données paléontologiques concernant ces groupes. A l'inverse les chromosomes 1, 2, 9, 17 et 18 sont parmi les derniers formés dans l'évolution de l'homme, puisqu'on ne les observe que dans notre espèce.

La figure 3 montre aussi qu'une évolution dichotomique, avec séparation brutale des nouvelles espèces est fort peu probable. Ainsi, en ce qui concerne les Hominidae, il est évident qu'ils sont détachés des Pongidae après un long moment d'évolution commune. Leur émergence s'est effectuée à partir d'une population ancestrale commune

Fig.1. Comparaison des chromosomes humains, à gauche, avec ceux d'un cercopithécoïde (Allenopithecus nigroviridis). La numérotation correspond à celle des chromosomes humains. Bien qu'une trentaine de remaniements séparent les deux caryotypes, les ressemblances de beaucoup de chromosomes restent évidentes.

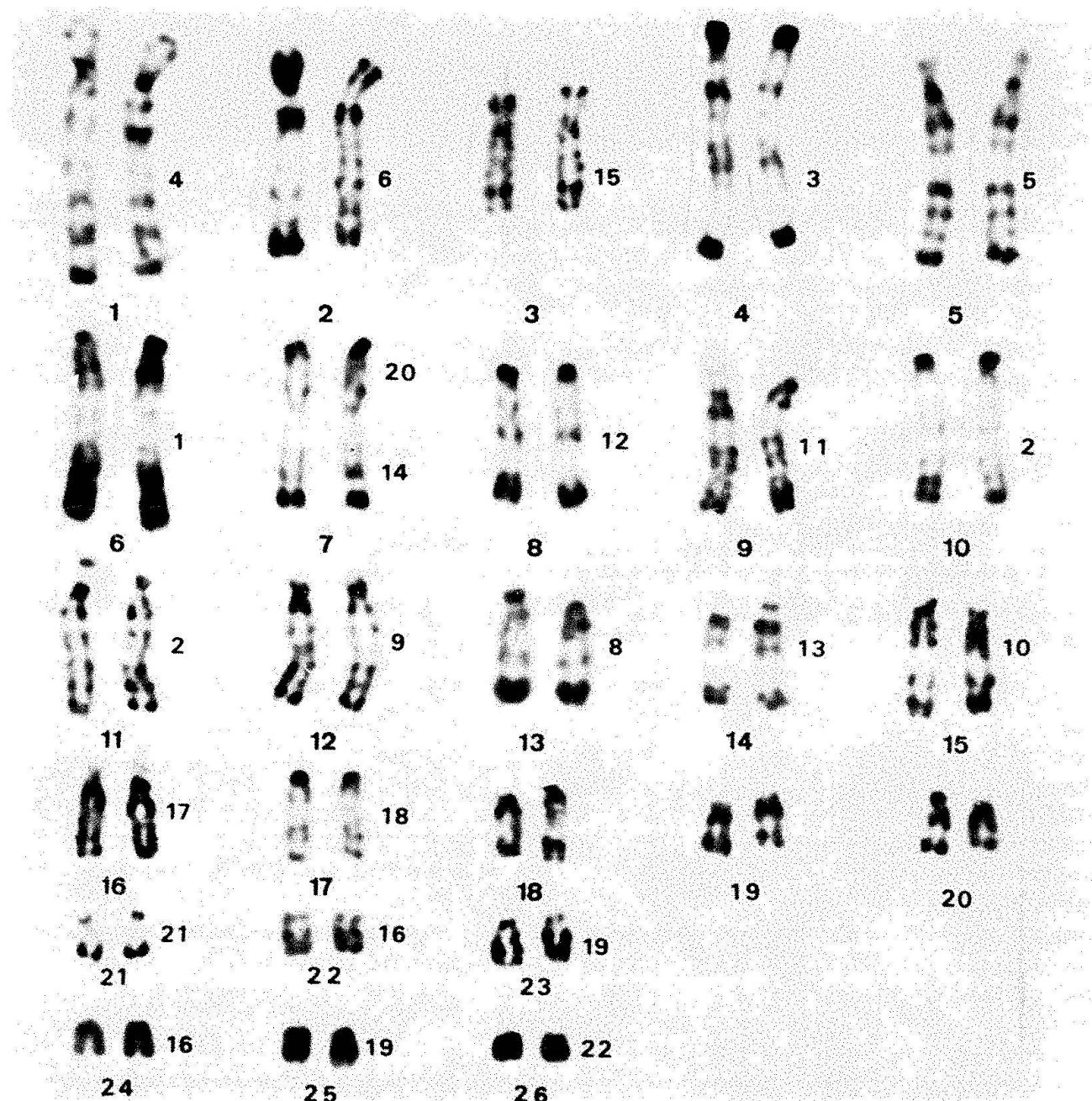


Fig. 2. Reconstitution du caryotype présumé de l'ancêtre commun aux primates, lagomorphes, rongeurs et carnivores. Les numéros sur le côté indiquent les analogies avec les chromosomes humains. Il n'a pas été possible de choisir entre plusieurs possibilités pour les chromosomes sexuels, qui ne sont pas représentés.

avec les précurseurs des gorilles et chimpanzés actuels. Cette émergence a été progressive, faisant intervenir des croisements successifs avec des ancêtres différents par un, deux ou plusieurs chromosomes.

Le dogme souvent avancé «une espèce = un caryotype» ne résiste pas à la vérification expérimentale. Ainsi, parmi les quelques 70 espèces que nous avons analysées, plusieurs groupes de 2, 3 et même un groupe de plus de 10 espèces s'avèrent posséder un même caryotype. A l'inverse, il n'est pas rare de

trouver 2 ou plusieurs caryotypes différents au sein d'une même espèce, chez des animaux de même phénotype.

Un autre «a priori» doit donc être supprimé: celui du rôle primordial, voire indispensable des changements chromosomiques dans la spéciation.

La figure 4 donne un autre aperçu de l'évolution chromosomique de quelques primates. Par rapport à la figure 3, les représentations ont été légèrement simplifiées, et un groupe de Lémurs de Madagascar a été ajouté.

Chaque type de remaniement a été indiqué, et il est frappant de constater qu'ils ne sont pas répartis aléatoirement. Les fusions Robertsoniennes prédominent chez les Lémurs, les fissions chez les Cercopithèques et les inversions chez les Pongidae et Hominidae. Il est difficile de donner une explication univoque à cette constatation, dans la mesure où les remaniements dont nous parlons sont survenus il y a fort longtemps, chez des espèces ancestrales dont nous ignorons tout sur les modes de vie, et en particulier sur les agents mutagènes auxquels elles étaient soumises et sur leur mode de reproduction.

Sélection et mutations

Comme toujours, en ce qui concerne l'évolution, ce que l'on met en évidence résulte d'un double processus: la mutagenèse et la sélection.

En ce qui concerne l'effet de la sélection, nous sommes assez peu armés pour en tester les conséquences. En effet, il faudrait connaître les types de remaniements et la fréquence de leur survenue, et juger de leur transmission.

Parmi les primates, seule l'espèce humaine a été suffisamment étudiée pour que l'on sache,

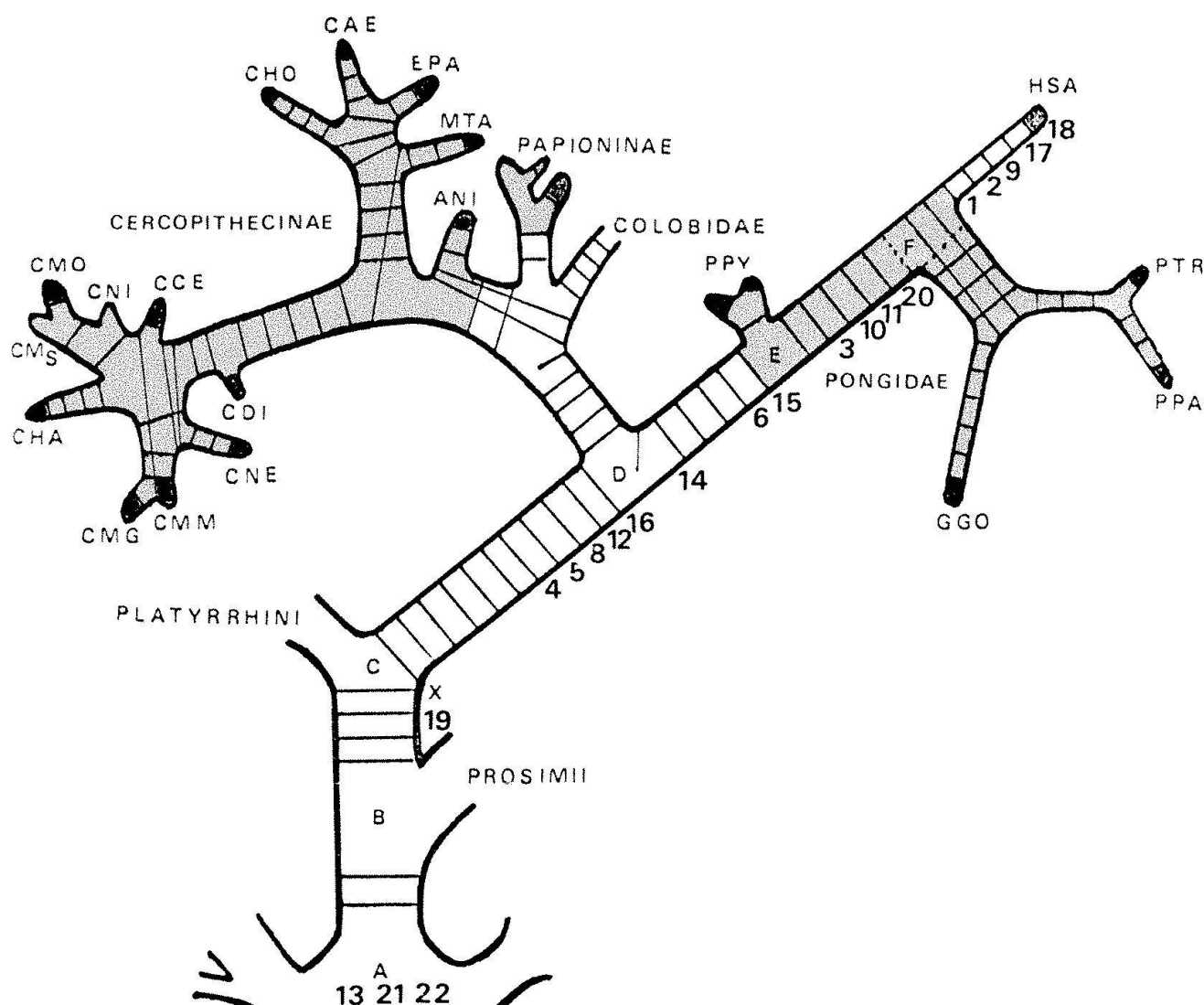


Fig. 3. Evolution chromosomique des catarrhiniens.

Cladogramme représentant la phylogénie des Catarrhini, établi exclusivement d'après l'étude chromosomique. Les Colobidae n'ont pas été étudiés en détail. Les Hylobatidae restent difficiles à situer exactement. Ils se détachent du tronc commun entre les points C et E. Chaque trait représente un remaniement de structure.

HSA = *H. sapiens*, PTR = *P. troglodytes*, PPA = *P. paniscus*, GGO = *G. gorilla*, PPY = *P. pygmaeus*, ANI = *A. nigroviridis*, MTA = *M. talapoin*, EPA = *E. patas*, CAE = *C. aethiops*, CHO = *C. l'Hoesti*, CCE = *C. cephus*, CNI = *C. nictitans*, CMO = *C. mitis opistocticus*, CHA = *C. Hamlyni*, CMG = *C. (mona) Grayi*, CMM = *C. (mona) mona*, CNE = *C. neglectus*, CDI = *C. diana*.

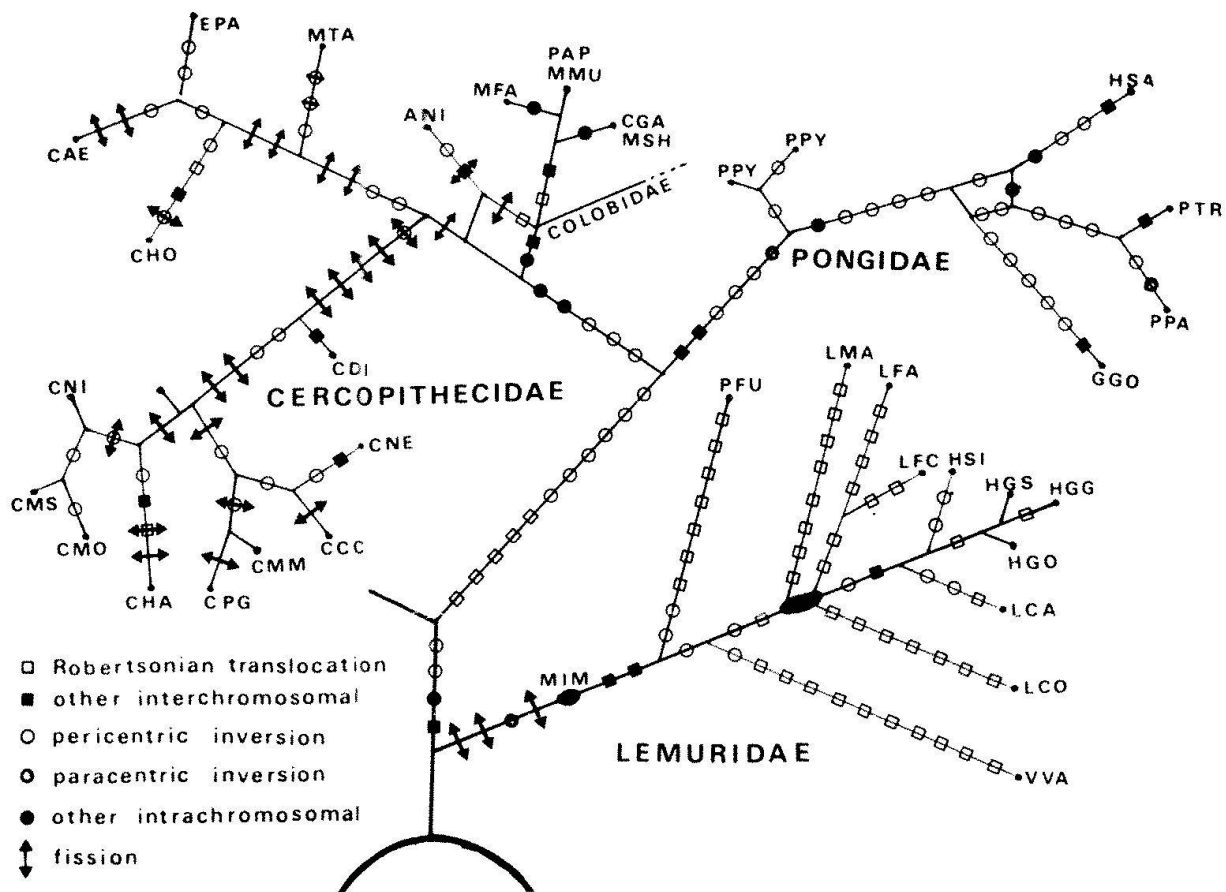


Fig. 4. Schéma simplifié montrant les types de remaniements survenus. Les codes de 3 lettres correspondent à des noms d'espèces. Beaucoup sont expliqués à la figure 3. Pour les autres: PFU = *Phaner furcifer*, LMA = *Lemur macaco*, LFF = *L. fulvus fulvus*, LFC = *L. f. collaris*, LFA = *L. f. albocollaris*, LCO = *L. coronatus*, LCA = *L. catta*, VVA = *Varecia variegata*, HSI = *Hapalemur simus*, HGG = *H. griseus griseus*, HGO = *H. g. occidentalis*, HGS = *H. g. species*, MFA = *Macaca fascicularis*, MMU = *M. mulatta*, PAP = *Papio papio*, CGA = *Cercocebus galeritus*, MSH = *Mandrillus sphinx*.

à peu près, quels sont les remaniements existant dans la population. Les translocations réciproques et les translocations Robertsoniennes sont les plus fréquentes (f ≈ 1p. 1000); les inversions sont beaucoup plus rares (f ≈ 1p. 10000) et les fissions exceptionnelles (non chiffrable) (Hamerton et coll., 1975).

Les translocations, qui sont fort rares dans l'évolution des Pongidae et des Hominae, ont donc dues être éliminées, par sélection, sans doute parce qu'elles perturbent trop la reproduction (semi-stérilité, fausses-couches et naissance d'anormaux).

A l'inverse, les inversions péricentriques sont fréquentes dans l'évolution et rares dans la population humaine. Elles ont donc été beaucoup moins éliminées, par la sélection, ce qui se conçoit assez bien car elles entraînent moins de troubles de la reproduction que les translocations, en général.

Toutefois, l'effet de la sélection n'explique pas tout, en particulier le fait que les remaniements se trouvent groupés selon leur type, dans les différentes branches de l'arbre que nous avons reconstruit.

Ceci nous conduit à penser que les mutations chromosomiques ne surviennent pas au hasard, et deux expérimentations ont été conduites, en utilisant les radiations ionisantes (rayons γ) comme agent mutagène.

– Après irradiation de cellules humaines «in vitro», une cinquantaine d'inversions péricentrique ont pu être mises en évidence: plusieurs d'entre elles reproduisent des chromosomes observés chez d'autres espèces, comme le montre la figure 5.

Si l'on considère qu'il existe théoriquement un très grand nombre de possibilités de «fabriquer» des inversions, il est surprenant que dans deux petits échantillons, on tende à retrouver les mêmes.

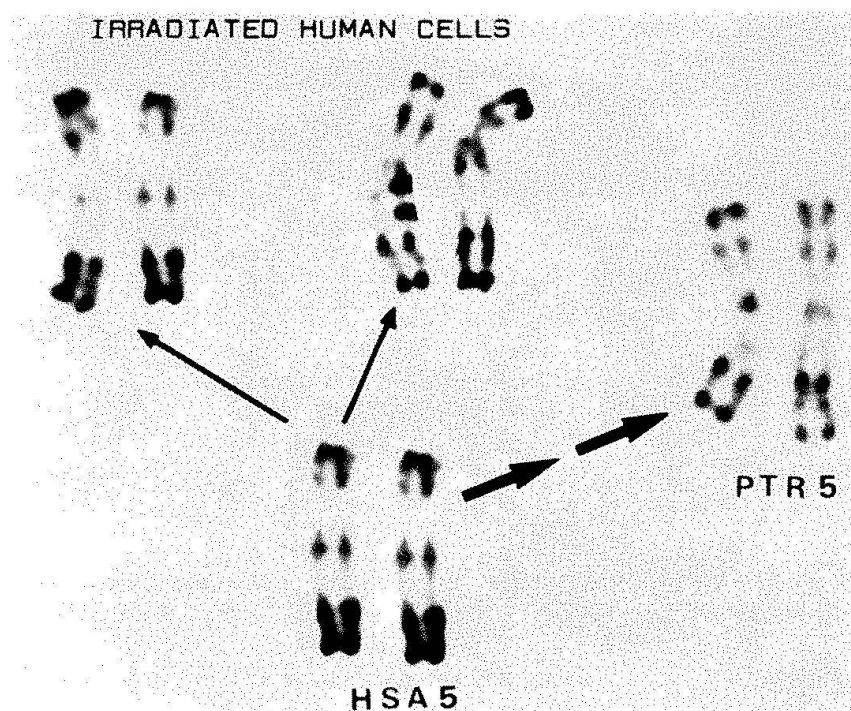


Fig. 5. L'inversion péri-centrique du chromosome 5, induite par l'irradiation de cellules humaines, reproduit le chromosome équivalent chez le chimpanzé.

Cette expérimentation n'est pas achevée, c'est pourquoi nous ne donnons pas de fréquences, mais les résultats sont déjà très significatifs.

- Après irradiation de cellules de cercopitèques, dont l'évolution chromosomique s'est faite surtout par fission, on retrouve précisément ce type de remaniements assez souvent, alors qu'il est rarissime chez les autres espèces. Ici encore, l'expérimentation doit être poursuivie, mais les résultats sont déjà significatifs.

Ces deux expériences montrent donc que les points de cassure et d'échanges chromosomiques ne sont pas aléatoires, peut-être n'en existe-t-il qu'un nombre limité par chromosome, et d'autre part que la mutagenèse peut être assez spécifique d'un groupe d'animaux donné. Elles montrent aussi que les mutations conservées par l'évolution traduisent assez bien la mutagenèse, au moins pour certaines catégories de remaniements, et que l'effet de la sélection n'est pas toujours aussi important qu'on a pu le penser, puisque celle-ci ne masque pas complètement la spécificité des mutations.

Enfin, une dernière approche de ces mutations consiste à comparer qualitativement les remaniements fixés au cours de l'évolution et ceux survenant de nos jours dans l'espèce humaine.

Si l'on considère donc les inversions, rares dans la population humaine, mais fréquentes au cours d'évolution, on s'aperçoit rapidement qu'une bonne partie, entre 10 et 20 p. 100 de chaque échantillon reproduit les mêmes chromosomes que ceux de l'autre échantillon. C'est ainsi que nous avons proposé l'existence de mutations chromosomiques «reverse», lorsque l'inversion reproduit un chromosome ancestral, et de mutations «convergentes», lorsque, le chromosome de type humain étant ancestral, l'inversion reproduit le même élément que celui d'un autre primate, dérivé de l'élément humain (Dutrillaux, 1979 b). La figure 6 en montre des exemples.

Ces résultats renforcent beaucoup, c'est évident, la notion que les mutations chromosomiques ne sont pas aléatoires.

Finalement, l'évolution chromosomique apparaît canalisée par un mécanisme qui pour l'instant nous échappe. Toutefois, il est très probable que ce mécanisme soit lui-même dicté par la constitution du matériel génétique des groupes d'animaux considérés. Ainsi une ou plusieurs mutations géniques, où en tous cas infra-chromosomiques, seraient capables d'orienter pour une part la mutagenèse chromosomique.

Cette spécificité des mutations chromosomiques apparaît alors comme un fort adjuvant

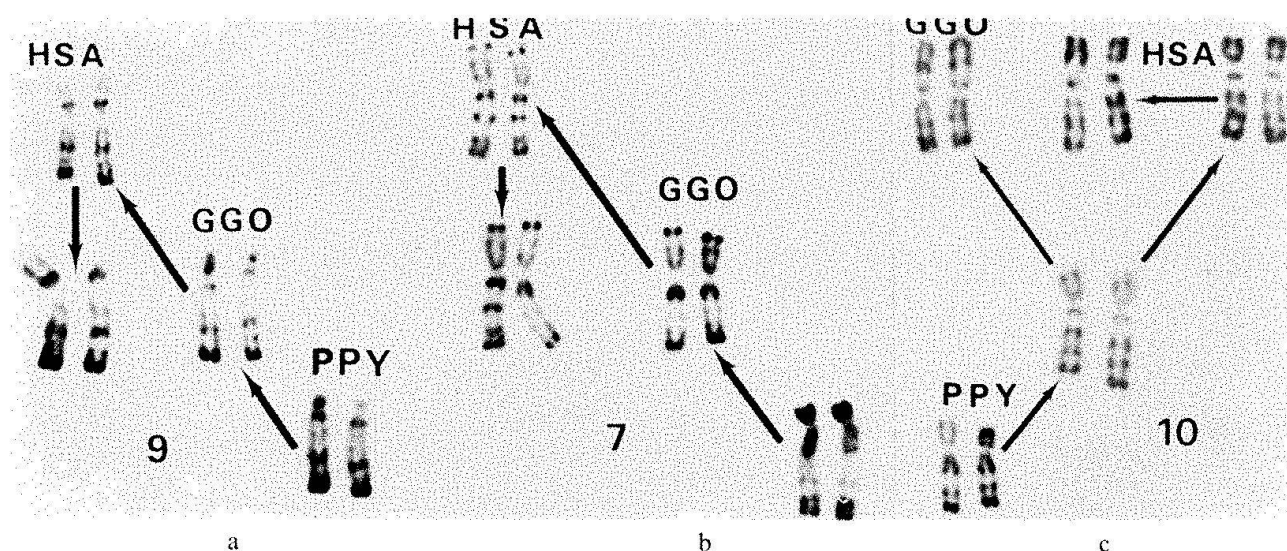


Fig. 6. a et b: Mutations «reverse» du chromosome 9 et du 7. Dans l'un et l'autre cas, le remaniement chromosomique reproduit un chromosome ancestral encore observé pour le 9 chez le gorille (GGO) et l'orang-outang (PPY), et pour le 7 chez le gorille seulement.

c: Mutation convergente du chromosome 10. La même inversion péricentrique a donné le chromosome 10 du gorille et est observée, à l'état hétérozygote chez l'homme.

de l'effet de barrière reproductive, puisque les caryotypes étant de plus en plus «spécialisés» les hybridations inter-groupes deviendraient vite impossibles.

Références

- Bobrow, M. and Madan, K.: A comparison of chimpanzee and human chromosomes, using the Giemsa-11 and other chromosome banding techniques. *Cytogenet. Cell Genet.* 12: 107-116 (1973).
- Chiarelli, B.: Chromosomes of the orang-utan (*Pongo pygmaeus*). *Nature, Lond.* 192: 285 (1961).
- Chu, E.H.Y. and Bender, M.A.: Cytogenetics and evolution of primates. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 102: 253-266 (1962).
- Couturier, J., Dutrillaux, B.: Conservation of replication chronology of homoeologous chromosome bands between four species of the genus *Cebus* and man. *Cytogenet. Cell Genet.* 29: 233-240 (1981).
- Créau-Goldberg, N., Cochet C., Turleau, C., Finaz, C., and Grouchy J. de: Comparative gene mapping of man and *Cebus capucinus* for PGD, Eno, PGM 1, PGM 2, and SOD 1. *Cytogenet. Cell Genet.* (28: 140-142 1980).
- Dutrillaux, B.: *Sur la Nature et l'Origine des Chromosomes humains*. (Expansion, Paris 1975).
- Dutrillaux, B.: Very large analogy of chromosome banding between *Cebus capucinus* (Platyrrhini) and man. *Cytogenet. Cell Genet.* 24: 84-98 (1979 a).
- Dutrillaux, B.: Chromosomal evolution in primates; tentative phylogeny, from *Microcebus murinus* (Prosimian) to man. *Hum. Genet.* 48: 251-314 (1979 b).
- Dutrillaux, B., Réthoré, M.O., Prieur, M. et Lejeune, J.: Analyse de la structure fine des chromosomes du Gorille (*Gorilla gorilla*). Comparaison avec *Homo sapiens* et *Pan troglodytes*. *Humangenetik* 20: 347-354 (1973).
- Dutrillaux, B., Viegas-Péquignot, E., Couturier, J. and Chauvier, G.: Identity of euchromatic bands from man to Cercopithecidae (*Cercopithecus aethiops*, *Cercopithecus sabaeus*, *Erythrocebus patas*, *Miopithecus talapoin*). *Hum. Genet.* 45: 283-296 (1978a).
- Dutrillaux, B., Viegas-Péquignot, E., Dubos, C. and Masse, R.: Complete or almost complete analogy of chromosome banding between the baboon (*Papio papio*) and man. *Hum. Genet.* 43: 37-46 (1978 b).
- Dutrillaux, B., Couturier, J., and Fosse A.-M.: The use of high resolution banding in comparative cytogenetics: comparison between man and *Lagothrix lagotricha* (Cebidae). *Cytogenet. Cell Genet.* 27: 45-51 (1980 a).
- Dutrillaux, B., Viegas-Péquignot, E., et Couturier, J.: Très grande analogie de marquage chromosomique entre le lapin (*Oryctolagus cuniculus*) et les primates dont l'homme. *Ann. Génét.* 23: 22-25 (1980 b).
- Garver, J.J., Estop, A., Pearson, P.L., Dijkman, T.M., Wijnen, L.M.M., and Meera Khan, P.: Comparative gene mapping in the Pongidea and Cercopithecoidea. *Chromosomes today*, Vol.6, Chapelle, A. de la, Sorsa, M. (eds.), pp.191-199 (Amsterdam: Elsevier/North Holland Biomedical Press 1977).
- Grouchy, J. de, Finaz, C., and Nguyen van Cong: Comparative banding and gene mapping in primates evolution. *Evolution of chromosome 1 during fifty million years. Chromosomes today*, Vol.6, Chapelle, A. de la, Sorsa, M. (eds.), pp.183-190 (Amsterdam, Elsevier/North Holland Biomedical Press 1977).

- Hamerton, J.L., Fraccaro, L., de Carli, L., Nuzzo, F., Klinger, H.P., Hullinger, L., Taylor, A. and Lang, E.M.: Somatic chromosomes of the gorilla. *Nature*, Lond., 192: 225-228 (1961).
- Hamerton, J.L., Canning, N., Ray, M., and Smith, S.: A cytogenetic survey of 14,069 newborn infants. I. Incidence of chromosome abnormalities. *Clin. Genet.* 8: 223-243 (1975).
- Hsu, T.C. and Bernischke, K.: Mammalian chromosome atlas (Springer, New York 1967-1977).
- Jalal, S.M., Clark, R.W., Hsu, T.C. and Pathak, S.: Cytological differentiation of constitutive heterochromatin. *Chromosoma* 48: 391-403 (1974).
- Lejeune, J., Dutrillaux, B., Réthoré, M.O., et Prieur, M.: Comparaison de la structure fine de chromatides d'*Homo sapiens* et de *Pan troglodytes*. *Chromosoma* 43: 423-444 (1973).
- Pearson, P.L.: The uniqueness of the human karyotype. *Chromosome Identification Techniques and Application in Biology and Medicine*, pp.145-151. Eds. T. Carpersson and L. Zech (Academic Press, New York 1973).
- Turleau, C., de Grouchy, J., et Klein, M.: Phylogénie chromosomique de l'homme et des primates hominiens (*Pan troglodytes*, *Gorilla gorilla* and *Pongo pygmaeus*) essai de reconstitution du caryotype de l'ancêtre commun. *Ann. Génét.* 15: 225-240 (1972).
- Viegas-Péquignot, E., Couturier, J., and Dutrillaux, B.: Comparison of DNA-replication chronology in chromosomes of chimpanzee and man. *Primates* 19: 209-213 (1978).
- Warburton, D., Firschein, I.L., Miller, D.A. and Warburton, F.E.: Karyotype of the chimpanzee, *Pan troglodytes* based on measurements and banding patterns: comparison to the human karyotype. *Cytogenet. Cell Genet.* 12: 453-461 (1973).
- Yunis, J.J., Sawyer, J.R., and Dunham, K.: The striking resemblance of high-resolution G-banded chromosomes of man and chimpanzee. *Science*, 208: 1145-1148 (1980).

Adresse des auteurs:

Dr. B. Dutrillaux
Dr. J. Couturier
Dr. E. Vegas-Péquignot
Institut de Progenèse
15, rue de l'Ecole de Médecine
F-75270 Paris Cedex 06

Zytogenetik im Dienste der Nutztierzucht

Gerald Stranzinger

Einleitung

Eine etwas freizügige Definition für die Tierzucht könnte so lauten: Tierzucht ist das Bestreben und Handeln, nach den gegenwärtigen bestehenden praktischen und wissenschaftlichen Kenntnissen und wirtschaftlichen Bedingungen die besten Tiere oder deren Keimzellen für die Erzeugung der nächsten Generation auszusuchen und zusammenzuführen, um eine fortpflanzungsfähige neue Generation zu erzeugen.

Um dieses Ziel zu erreichen, hat es in der Geschichte der Tierzucht verschiedene Phasen gegeben, wobei die Tierbeurteilung, Tiermessung, Populationsgenetik und Zellgenetik den historischen Verlauf wiedergeben. Heute bilden alle 4 Methoden, zwar in unterschiedlicher Gewichtung, die Eckpfeiler der Tierzuchtwissenschaften. Der Begriff Tierproduktion ist dieser Umschreibung übergeordnet, ein Tierproduzent muss also nicht unbedingt ein Tierzüchter sein.

Die Zytogenetik ist eine rel. junge Wissenschaft, die die Zytologie und Genetik verbindet und das Verhalten der Chromosomen und Gene in den Zellen in bezug auf die Vererbung und Variation betrachtet.

Ein Fortpflanzungszyklus zwischen zwei Generationen beinhaltet verschiedene Abschnitte, die biologisch signifikantesten Phasen sind Geburt – Wachstum – Reproduktion und Tod, wobei innerhalb eines Individuums die funktionell genetischen Teile die Zellen, Chromosomen, Gene und Genprodukte sind.

Hier setzt die Bedeutung der Zytogenetik in der Tierzucht ein.

Die grossen Aufwendungen und Erkenntnisse in der Humangenetik, Zell- und Molekularbiologie, Botanik und Zoologie haben auch für die Tierzucht grossen Nutzen gebracht, obwohl daraus nicht der Name Nutztierzucht abgeleitet werden kann. Auch

wenn zunehmend mehr Wissenschaftler in ca. 30 Labors um die Welt herum sich um die Anwendung moderner zytogenetischer Methoden in der Tierzucht bemühen, ist doch noch ein gewaltiger Rückstand gegenüber der Humangenetik zu verzeichnen.

Gregor Mendel legte die Grundlagen für die Populationsgenetik, Watson und Crick gaben der experimentellen Genetik ein Fundament, auf dem sich auch die Zytogenetik entwickeln konnte. T.C. Hsu beschreibt in seinen historischen Perspektiven (1980) den harten Weg all jener Zytogenetiker, die mit wenig offizieller Unterstützung sowie mangelhaften Methoden und Geräten, die Universalität der zytogenetischen Phänomene von der Fliege bis zum Menschen erarbeiteten. Zu dieser Chromosomentheorie der Vererbung hat R. Matthey in dieser schwierigen Situation durch seine Arbeiten viel beigetragen und durch die Entdeckung eines morphologisch signifikanten Phänomens der weitgehend konstanten Anzahl an Chromosomenarme, von ihm auch *Nombre fondamental* (NF) genannt, einen Meilenstein in die Zytogenetiklandschaft gesetzt. Seither und besonders in den letzten 15 Jahren war eine enorme Entwicklung zytogenetischer Techniken zu verzeichnen, die zur genauen Beschreibung der Chromosomen führten. Besonders hervorzuheben sind die Bänderungsfärbungen an den Chromosomen (Casperson et al., 1973), die zur exakten Bezeichnung und Zuordnung der Chromosomen dienen. Der kleinste morphologisch darstellbare und eindeutig in den Generationen verfolgbare genetische Komplex ist heute noch das Chromosom bzw. Abschnitte desselben. Die lineare Anordnung dieser Genträger ist erwiesen und nur durch Sekundär- und Tertiärstrukturen scheinbar unterbrochen. Genetische Kopplungseinheiten sind auf eine verschiedene Anzahl von Chromosomen verteilt, wobei die Anzahl und Form

Alle Abweichungen vom Normalzustand der Chromosomenstrukturen und der Zusammensetzung werden Aberrationen genannt, wobei polymorphe Erscheinungen einen fließenden Übergang zu den morphologisch erkennbaren Mutationen darstellen. Ob sie in allen Fällen auch Anomalien sind, soll hier nicht diskutiert werden, für eine Einteilung wird aber dieser Begriff verwendet. Zu den Chromosomenanomalien rechnet man alle autosomalen und gonosomalen sowie strukturelle und numerische Abweichungen. Als Struktur-verändernde Eingriffe an Chromosomen sind Brüche und Verwachsungen in Form von Inversionen, Defizienzen, Deletionen, Duplikationen und Translokationen aufzuzählen. Numerische Anomalien, sind Polyploidien und Aneuploidien, wobei Mosaik und Chimären Sonderformen darstellen.

Das Pferd: Equus caballus $2n = 64$

mungsdisput ausgefochten. Die Chromosomenzahl und Kreuzbarkeit der Equiden soll in der Tab. I aufgezeigt werden. In dieser Tabelle kommen die Erkenntnisse von Matthey über die *Nombre fondamental* sehr gut zum Ausdruck, da generell mit zunehmenden Differenzen die Kreuzbarkeit beeinträchtigt ist. Zusätzliche Bänderungsfärbungen an den Chromosomen der Ausgangstypen und Kreuzungsprodukte zeigen, dass zu den Fusions- und Fissionsmechanismen, die die Anzahl der Chromosomenarme verändern, auch Translokationen, Inversionen und eventuell Duplikationen und Deletionen zur Spezialisierung beigetragen haben. Die reproduktive Diskontinuität besteht nicht in allen Fällen, ist aber bei den Pferd $\times$ Eselskreuzungen allgemein bekannt und diente zu sehr interessanten weiteren Studien, wie der Inaktivierung von X-Chromosomen in der frühembryonalen Phase weiblicher Zygoten. Dieses Phänomen wird durch die Lyon's Hypothese (Lyon, 1962) gut umschrieben und hat im Lichte neuester Erkenntnisse über die Repressortheorie des H-Y-Antigens neue Aktualität erlangt. Für die Pferdezüchter ist das XO Syndrom bei Stuten von Bedeutung. Diese geschlechtschromosomale Abnormität tritt bei Pferden erstaunlicherweise sehr häufig auf (Chandley et al. 1975) und kann am Phänotyp durch schwächeren Wuchs und z. T. durch veränderte Genitalien erkannt werden. Dieser Befund ist aber erst an jedem einzelnen Tier durch eine Chromosomenanalyse

[illegible]

zu bestätigen. Das X Chromosom beim Pferd ist durch eine Bänderungsfärbung (G, Q oder R-Band) eindeutig festzustellen und zeigt durch G-Bänder am kurzen Arm ein schwächeres Band am telomeren Ende zum Unterschied vom zweiten morphologisch ähnlichen autosomen Chromosom mit einem starken Band (Abb. 1). Das X-Chromosom ist deshalb als das zweitgrösste submetazen-

trische Chromosom im Karyotyp zu bezeichnen. Das Y-Chromosom bei Pferd weist, wie bei allen anderen Säugern, einen Grössenpolymorphismus auf, ist aber zumeist das kleinste akro- bis telozentrische Chromosom im gesamten Komplement und weist kein signifikantes Band im Vergleich zu den kleinsten autosomen Chromosomen auf.

Das Rind: Bos taurus und Bos indicus 2n = 60

Tab. 2. Chromosomenmessungen beim Pferd

Chromoso- men- bezeichnung	Messergebnisse Ø der Einzelwerte*				
	RGL $\bar{x}$	s	ALV $\bar{x}$	s	
A1	214,41	14,97	61,10	2,32	
A2	144,19	10,28	59,88	4,24	
A3	141,17	8,91	63,62	4,89	
A4	134,36	10,87	65,16	6,67	
A5	126,24	10,39	58,64	5,87	
A6	123,62	7,54	56,29	4,36	
A7	119,13	10,16	60,45	6,80	
A	143,30	6,49	60,74	1,83	
B1	114,55	6,62	59,53	4,37	
B2	113,27	7,26	56,71	4,54	
B3	105,55	7,44	57,25	4,08	
B4	86,22	9,00	53,19	3,48	
B5	78,87	5,81	53,48	3,92	
B6	68,98	7,92	55,82	3,64	
B	94,21	5,61	56,00	1,93	
C1	116,33	6,58	*3 männliche Tiere, 3 weibliche Tiere und 5 Metaphasen pro Tier.		
C2	110,37	5,90			
C3	106,31	5,47			
C4	101,33	6,65			
C5	96,06	5,82			
C6	92,46	6,72			
C7	85,13	6,58			
C	100,91	4,41			
D1	78,95	5,32			
D2	72,73	5,85			
D3	69,92	6,41			
D4	64,31	5,54			
D5	62,71	4,61			
D6	58,87	5,36			
D7	55,10	4,11			
D	65,92	3,85			
E1	52,54	5,17			
E2	51,07	5,92			
E3	47,66	4,87			
E4	44,30	7,98			
E	48,75	4,36			
X	155,32	11,67	61,62	4,24	
Y	39,79	9,53			

RGL = Relative Gesamtlänge

ALV = Armlängenverhältnis

$\bar{x}$ = Mittelwert, s = Standardabweichung

Das bisher eindeutigste chromosomale Unterscheidungskriterium zwischen taurus und indicus stellt das Y-Chromosom dar, bei taurus submetazentrisch, bei indicus akrozentrisch. Dieser Unterschied, neben sicher noch weiteren Disharmonien, die unerforscht sind, bringt bei Kreuzungstieren und Neuzüchtungen von Rassen in ariden Gebieten, wie bei Santa Gertrudis, Bonsmara und Belmont, Schwierigkeiten in der Fruchtbarkeit, da sich beide Komplemente in 2. und 3. Generation durch spezielle Segregationsercheinungen als inkompatibel erweisen. Dies sind für Züchtungsprojekte der Entwicklungshilfe sehr wesentliche Ergebnisse der Forschung, da sie

1. schwerwiegende Verluste verursachen (20 Prozent weniger Kälber)

2. beim langen Generationsintervall bei Rindern relativ spät sichtbare Folgen haben.

Das Rind ist vielleicht von den landwirtschaftlichen Nutztieren am besten zytogenetisch untersucht worden.

In der Tab. 4 und 5 werden die bisher beschriebenen Chromosomenanomalien aufgeführt (Popescu, 1980)

Der Fusionstyp 1/29 und der Chimärismus sind die herausragenden Erscheinungen, so dass ich hierüber etwas ausführlicher berichten werde.

Tab. 3. Anzahl geborene Kälber bei verschiedenen Kreuzungsstufen der Belmont Rasse mit Bos taurus und indicus Chromosomenanteile

Generation	Linie AX	Linie BX	Linie HS
Erste	76*	81 20%	70
Zweite + Dritte	77	61	67

AX = Afrikaner Kreuzungslinie

BX = Brahman Kreuzungslinie

HS = Hereford + Shorthorn

* = Prozentanteil geborener Kälber

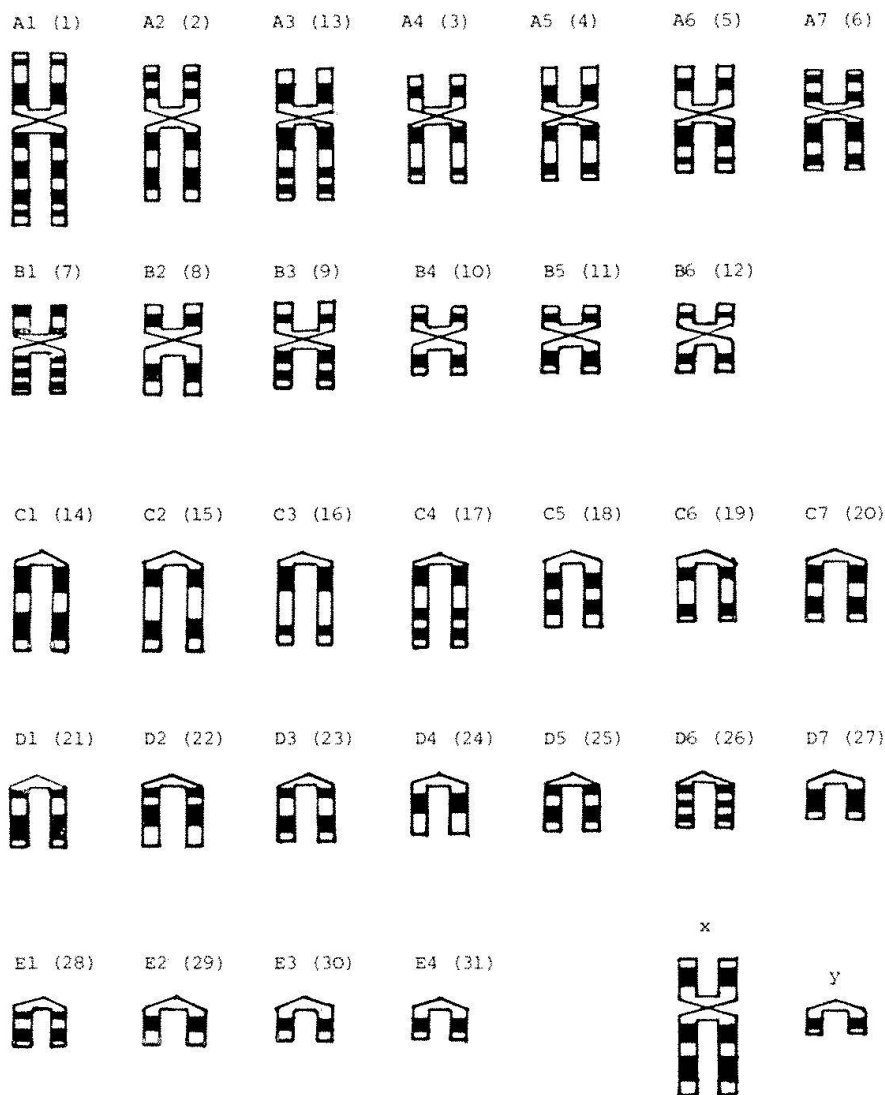


Abb. 1. G-Bandkaryotyp beim Pferd. Zahl in Klammer ist die Reihenfolge nach dem Reading System.

Die Vereinigung des grössten (1) und kleinsten (29) autosomen Chromosoms zu einem Markerchromosom 1/29 als Zentromerfusion beschäftigt die Tierzüchter besonders, da es in Frequenzen von 0–70% in verschiedenen Populationen auftritt und die Fruchtbarkeit der Trägartiere betroffen sein soll. Art und Zeitpunkt der Entstehung sind unbekannt, die Auswirkungen in der Tierzucht sehr umstritten. Theoretische Überlegungen weisen auf mögliche fruchtbarkeitsmindernde Effekte hin, speziell im Hinblick auf Non-Disjunction in der Meiose und dadurch auftretende unbalancierte Gameten. Dies ist aber nie eindeutig für alle Fusionstypen bewiesen worden. Eine Zusammenfassung der heterozygoten Trägerstiere im Aufspaltungsverhältnis ihrer weiblichen Nachkommen zeigt, dass jeder Stier sein eigenes Charakte-

ristikum hat und keine Verallgemeinerung möglich ist (Tab. 6). Gibt man den Spermien mit oder ohne Fusionschromosomen dieselbe Chance, eine Eizelle zu befruchten und analysiert die Nachkommen (Tab. 7), so zeigt sich, dass Spermien mit den Fusionschromosomen keinen selektiven Nachteil in der Befruchtung und Embryonalentwicklung haben. Diese Ergebnisse der eigenen Untersuchungen aus Tab. 6 und 7 veranlassen mich daher zu folgenden Schlussfolgerungen. Eine ständige Veränderung der Chromosomen und dadurch entstehende Abweichungen vom Standardkaryotyp muss im Evolutionsgeschehen auftreten und bildet in ihrer Frequenz innerhalb einer Population ein Equilibrium, welches durch Selektionsvor- und Nachteile in Balance gehalten wird. Dieser Zustand wird durch jede Gen-Um-

Tab. 4. In der Literatur beschriebene Zentromerfusionen beim Rind

Nr.	betroffene Chromosomen	Rasse	Phänotyp	Autoren
1	1/29	viele	normal	viele
2	2/4	engl. Schwarzbunte	normal	Pollock, 1972
3	3/4	Limousin	normal	Popescu, 1977
4	5,6/15,17	Dexter	—	Eldridge, 1974
5	7,11/20,25	Blonde Limousin	?	Darre et al., 1974
6	8/9	Braunvieh	?	Tschudi, 1977
7	13/21 Mosaik	Holstein-Friesian	normal	Kovacs et al., 1973
8	11,12/15,16	Simmental	normal	Bruere et Chapman, 1973, Harvey 1974
9	1/25	Fleckvieh	normal	Stranzinger, Foerster 1976
10	14/28	Holstein	abnormal	Ellsworth et al., 1979
11	14/24	?	?	Di Bernadino, 1979
12	25/27	Grauvieh	normal	De Giovanni et al., 1979
13	5/21	Japanese Black	normal	Masuda et al., 1980

welt Interaktion verändert, dies kann sehr kurzfristig geschehen oder durch Isolation lange Zeiträume beanspruchen. Jede neue Chromosomenmutation muss aber dieses Sieb durchlaufen, um sich etablieren zu können. Die Chromosomenmutation alleine gibt daher keine Auskunft über deren Überlebenschance, es müssen die auf diesen Chromosomen liegenden Gene in ihrer Ausprägung und Genwirkung und deren epistatischen Effekte berücksichtigt werden. Ohne Forschung auf dem Gebiete der Genkartierung sind diese Effekte nicht verifizierbar, und daher gehen unsere Bemühungen in diese Richtung. Die Reduzierung der Erscheinungen auf einfache Genwirkungen, Selektionsmechanismen und Phänotypen ist daher die erste Aufgabe der Tierzuchtfor-

schung. Der Chimärismus tritt beim Rind in Form von Intersexen, Freemartins oder Zwicken auf. Durch Gefässanastomosen bei Zwillingen in der Plazenta werden sowohl foetale Zellen wie humorale Stoffe ausgetauscht. Der wirksamste Stoff für die Geschlechtsdifferenzierung dürfte das H-Y Antigen sein und jede weitere Forschung auf dem Gebiet des Chimärismus muss diese Erkenntnisse in die Betrachtungen einbeziehen.

Für die Tierzucht wäre der gonadale Chimärismus interessant (Stranzinger et. al., 1981), da in der künstlichen Besamung und Zuchtwertschätzung sowie im Embryotransfer genetische Auswirkungen zu erwarten sind.

Wie kann der gonadale Chimärismus eindeutig erfasst und untersucht werden? Ein Beispiel soll diesen Fall verdeutlichen

Tab. 5. In der Literatur beschriebene Chromosomenaberrationen beim Rind

Typ	betroffene Chromosomen	Rasse	Phänotyp	Autoren
Translokation	27/29	Guernsey	Normal	Bongso und Basrur (1976)
Translokation	X/Autosom	Schwedische Rote und Weisse	Normal	Gustavsson et al. (1968)
Translokation	X/13	1/4 Brown Swiss und 3/4 Holstein	Normal	Eldridge (1977)
Tandem Translokation	1/18	Dänische Rote	Normal	Hansen (1969)
Reziproke Translokation	(10;11) (41;14)	Fleckvieh	Normal	Mayr et al. (1979)
Perizentrische Inversion	?	Charolais x Guernsey	free-martin	Short et al. (1969)
Perizentrische Inversion	14	Normande	Normal	Popescu (1972, 1976)
Insertion	16	Charolais	Normal	Moraes (1978)
Verlängertes Y	Y	Ayrshire	Normal	Fechheimer (1973)
Verlängertes Y	Y	Charolais	Normal	Cribiu und Popescu (1974)
Chimären	XX/YY	viele	♂ normal ♀ free-martin	viele

Tab. 6. Zusammenfassung einzelner Nachkommenuntersuchungen von heterozygoten Zentromerfusionsstieren

	I	II	III	IV	V	VI
Rasse Bulle	Bayr. BV	Brown Swiss	Bayr. Fleckv.	CH Simm.	CH Simm.	Summe
Kuhmaterial	Bayr. BV	CH BV	Bayr. Fleckv.	CH Simm.	CH Simm.	
Anz. Töchter untersucht	392	46	73	45	59	615
Davon Het. Zentromerfus.	182	22	15	22	22	263
in %	46,5	47,8	20,5	48,8	37,2	42,8
Signifikanz	n.s.	n.s.	xxx ($P < 0,05$)	n.s.	n.s.	xxx ($P < 0,05$)
Autoren	Stranzinger Förster 1976	Stranzinger (unveröffentl.)	Stranzinger Förster 76	Zahner 1977	Zahner 1977	

BV = Braunvieh; Simm. = Simmentaler Fleckvieh

(Abb.2). Mit Hilfe von Markerchromosomen, in unserem Fall die vorher besprochene 1/29 Zentromerfusion, kann bei Zwillingen dieses Phänomen gut untersucht werden. Als Endzustand sollte durch den Zellaustausch über die Plazenta in der Frühphase der embryonalen Entwicklung Zellen des Zwillingspartners in die Gonaden des zweiten Partners eingebaut werden. Es wurde auch beim Menschen bewiesen, dass weibliche Zellen im Hoden des Zwillingspartners zu Spermien sich entwickeln und Nachkommen erzeugen können. In der Tierzucht ergeben sich daraus weitreichende Konsequenzen, von der Verschiebung des Geschlechtsverhältnisses angefangen bis zur grossen Vermehrungsrate eines weiblichen Individuums über integrierte gonadale Zellen im männlichen Zwillingspartner, der zur Zucht eingesetzt wird.

Generell werden alle Stiere, die in der künstlichen Besamung in der Schweiz eingesetzt

werden, auf ihre Chromosomenstruktur untersucht und, wenn Anomalien auftreten, aus der Zucht ausgeschieden.

Das Schaf: *Ovis aries* $2n = 54$.

Beim Schaf wurden die in der Schweiz vertretenen Rassen kaum zytogenetisch untersucht. Aus Neuseeland liegen jedoch interessante chromosomale Untersuchungen vor, die ebenfalls Zentromerfusionen betreffen und in Tab.8 in Verbindung mit der unterschiedlichen Chromosomenzahl bei Wildschafen aufgezeigt werden (Bruère, 1975). Da diese Fusionstypen von Bruère durch gezielte Paarungen kombiniert wurden und bei einer grösseren Zahl die Fruchtbarkeitsverhältnisse studiert werden konnten, sind diese Untersuchungen richtungsweisend auf dem Züchtungssektor. Keine Fruchtbarkeitsreduktionen sind durch diese Fusionstypen beim Schaf festgestellt worden.

Autosomale Monosomen, selbst in Mosaikform, führten beim Schaf zu schwerwiegenden Skelettanomalien.

Die Ziege: *Capra hircus* $2n = 60$

Ähnlich wie beim Rind und Schaf findet man auch bei der Ziege die Zentromerfusionen verschiedener autosomer Chromosomen (Abb.3).

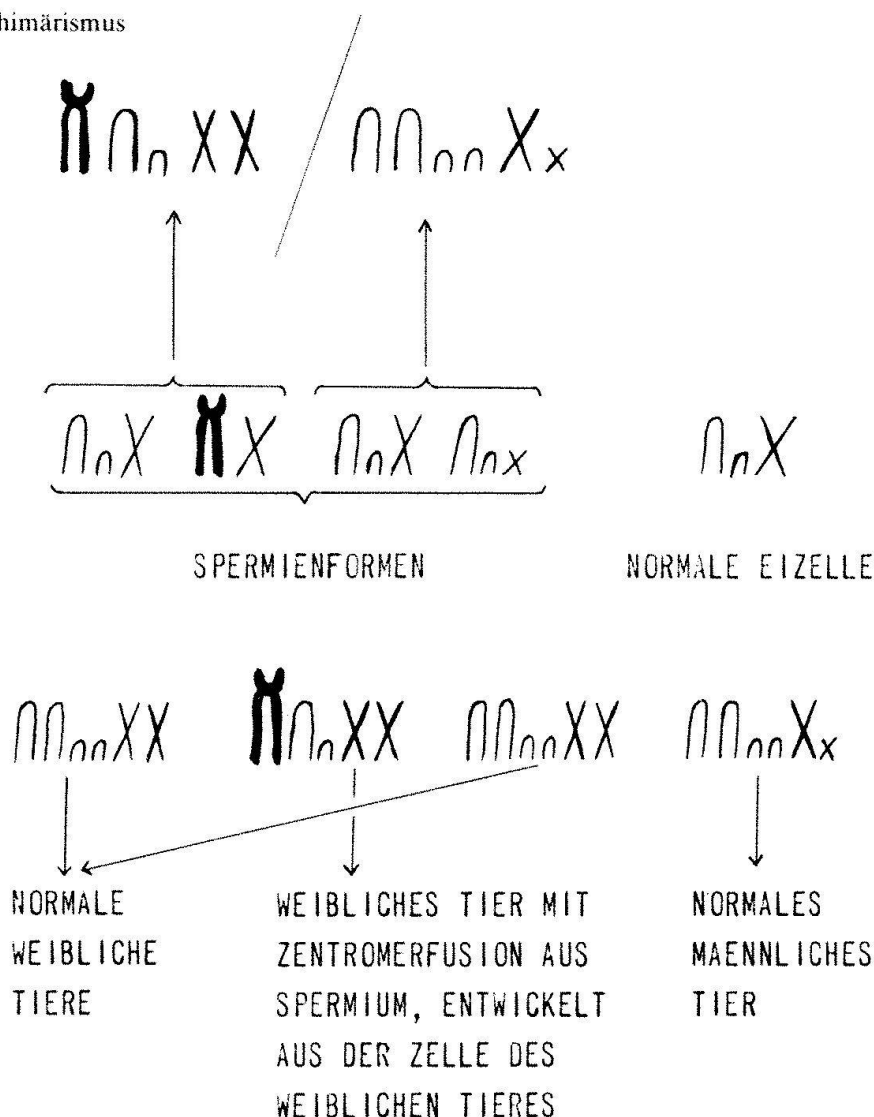
Zytogenetisch interessant ist jedoch bei der Ziege die Kopplung des Hornlosigkeitgens mit der Bildung von Intersexen, die zur Verschiebung des Geschlechtsverhältnisses und für den Züchter zu wirtschaftlichen Verlusten führen. Auch hier spielt das H-Y

Tab. 7. Mischspermaeinsatz von verschiedenen Zentromerfusionsstieren

Mischung	Kälber Total	Kälber 1. Stier	Theor. erwartet*	Vorteil 1. Stier über 2. Stier
Jonick 58/60	164	98	81,75	+ 9,91%
Fasnick 59/60	172	124	76,-	+ 27,91%
Jonfas 58/59	216	68	102,-	- 15,74%

* korrigiert nach unterschiedlicher Anzahl Kälber
Fasan > Jonny > Nick

Abb. 2. Gonadaler Chimärismus



Antigen eine Rolle, hier dürften sich 2 unabhängige Mutationen so nahe aneinander befinden, dass es zu dieser engen Kopplung dieses Phänomens kam. In Verbindung dazu steht auch die Gynäkomastie bei Ziegenböcken, Pseudomännchen mit 2 X-Chromosomen und der Samenstau. Da in vielen Gebieten hornlose Ziegen bevorzugt werden, sind dabei auftretende wirtschaftliche Verluste unausbleiblich.

Das Schwein: *Sus scrofa* $2n = 38$

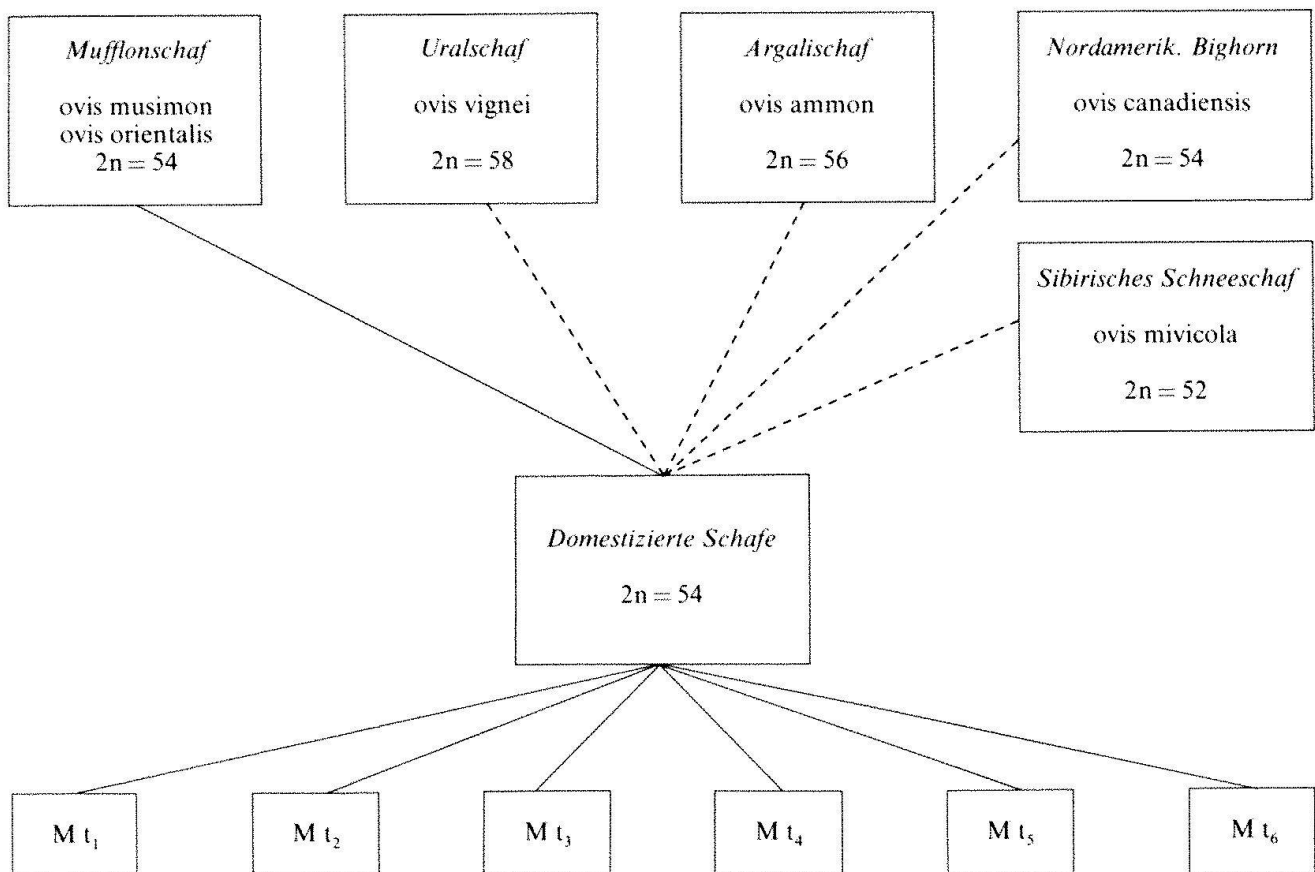
Im Produktionswert liegt diese Tierart als Nutztier an zweiter Stelle in der Schweiz. Durch seine hohe Reproduktionsrate bedingt, sind zytogenetische Aspekte, die die Fruchtbarkeit beeinflussen, besonders interessant. Da beim Schwein die künstliche Besamung ebenfalls zunehmend eingesetzt

wird, sind genauere zytogenetische Untersuchungen als zuchthygienische Massnahme zu bezeichnen. In welchem Ausmass eine Chromosomenmutation eines Ebers die Fruchtbarkeit der von ihm gedeckten oder besamten Sauen beeinflusste, zeigt die Darstellung der Daten von Henricson und Bäckström (1964) Tab. 9.

Die Chromosomenmutationsrate scheint beim Schwein relativ hoch zu liegen, da mehrere Translokationstiere in der Literatur beschrieben wurden. Die Fruchtbarkeit in Form geborener Ferkel war immer stark beeinträchtigt.

Für die Genkartierung haben wir solche Tiere über die Bestrahlung von Spermien erzeugt, wobei die 2. Generation der Translokationsindividuen vorliegt (1,4; 1,16; 2,15; 5,15;) und auch hier die Wurfgrösse bei 2-6

Tab.8. Chromosomenzahl bei Wildschafarten und Mutationsformen bei Kulturrassen



Ferkel liegt, der schweizerische Durchschnitt der Abferkelerggebnisse liegt bei 9 Ferkel. Das europäische Wildschwein hat $2n = 36$ Chromosomen, wobei die Hausschweinchromosomen Nr. 15 und 17 als Fusionschromosom vorliegen (Abb.4). Die Kreuzung zwischen Hausschwein und Wildschwein ist ohne Schwierigkeiten möglich, und die F_1

Individuen spalten nach Mendelschen Regeln in ihrer Chromosomenzahl wieder auf. Für uns sind diese Kreuzungen aus verschiedener Sicht sehr interessant, da sie

1. Markerchromosom tragen,
2. sonstige polymorphe Chromosomen bei Wild- und Hausschwein auftreten,

und damit die Segregation von Chromosomen oder Segmente davon in Familienanalysen untersucht werden können. Dies ist der normale Weg zur Genkartierung, wie er vor dem Erscheinen der Zellhybridisationsmethoden auch bei Tier und Mensch durchgeführt wurde, aber heute durch die speziellen Bandfärbemethoden effizienter geworden ist. C-Band polymorphe Chromosomen kennen wir von Nr. 16 und 17 und bei den Wildschwein-Hausschweinkreuzungen die Nr. 13, 16 und 18. Damit sind 10 Autosome markiert, also mehr als 50% des Genoms. Hier ist auch eine Antwort auf die Ausnutzung von Genen aus Wildpopulationen in unserer Zuchttrasse, deren Chromosomen in Kreuzungspopulationen verfolgt werden können, zu geben, da allgemein angenommen wird, dass diese Wildformen gegenüber Umwelt-

Tab.9. Ferkelzahlunterschiede zwischen einem Translokationseber und einem normalen Eber bei Anpaarung der gleichen Muttersauen (nach Henricson u. Bäckström, 1964) (4, 14 Translokation; Reading System 11q-, 15q+).

1. Paarung	♂ X ♀	51
1. Wurf	$\bar{X} = 5,1$ Ferkel	↓
2. Paarung	21 ♀ X ♂	
2. Wurf		↓ $\bar{X} = 12,7$ Ferkel
3. Paarung	♂ • 21 ♀	
3. Wurf	$\bar{X} = 5,6$ Ferkel	

TR = Translokationstier; N = normales Tier

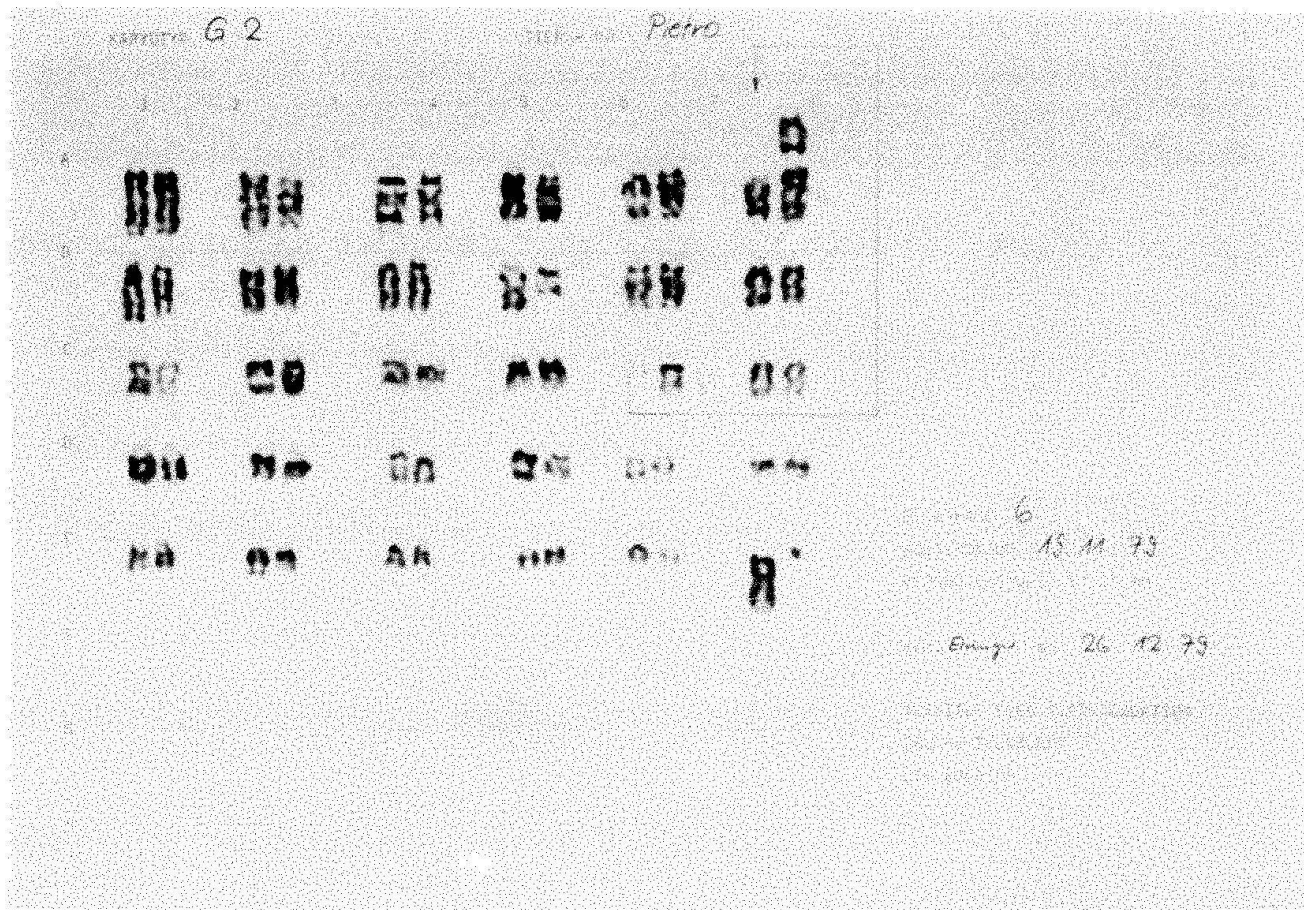


Abb. 3. Zentromerfusion bei Ziege.

einflüssen besser gewappnet sind. Dies trifft nach eigenen vorläufigen Untersuchungen nicht zu, speziell die Krankheitsresistenz konnte bei Kreuzungsnachkommen nicht verbessert werden. Zusätzlich wird die Vorhersage bestimmter Leistungserwartung aus diesen Tieren sehr ungenau, was für den Tierzüchter und Konsument ein grosses finanzielles Risiko bedeutet.

Das Huhn: Gallus domesticus $2n = 78$ (18 Makrochromosomen)

Das Geflügel, speziell durch die Umkehrung der Geschlechtschromosomen beim homogametisch männlichen Tier und heterogametisch weiblichen Tier zytogenetisch interessant, ist besonders in der Chromosomenforschung stark eingesetzt worden. Ein besonderes Phänomen konnte hierbei mit Hilfe von Markerchromosomen von Fechheimer und Mitarbeiter (1979) geklärt werden. Das Auftreten von verschiedenen haploiden Zelllinien, neben der normalen diploiden Form innerhalb einzelner Individuen wird durch

das Eindringen mehrerer Spermien in die Eizelle und die selbständige Entwicklung verschiedener Spermien zu haploiden Zelllinien ausgelöst.

Eine unterschiedlich hohe erbliche Disposition liegt bei verschiedenen genetischen Herkunftsn. Der Einsatz von Mischsperma aus verschiedenen Hähnen mit unterschiedlichen Translokationschromosomen war Voraussetzung für diese Studien.

Zytogenetische Methoden in der Biotechnik

Einige technische Methoden haben in der Tierzucht Eingang gefunden. In den letzten 20 Jahren ist die künstliche Besamung eine Standardmethode geworden. Besondere Auswirkungen hatte diese Methode auf die Zuchtstruktur, aber auch der Züchterfolg ist in Verbindung mit dem Einsatz der Populationsgenetik entsprechend hoch gewesen. Im Extremfall kann ein Stier auf diese Weise ca. 100 000 Kälber zeugen, ein Eber sicher einige Tausend Nachkommen und bei den

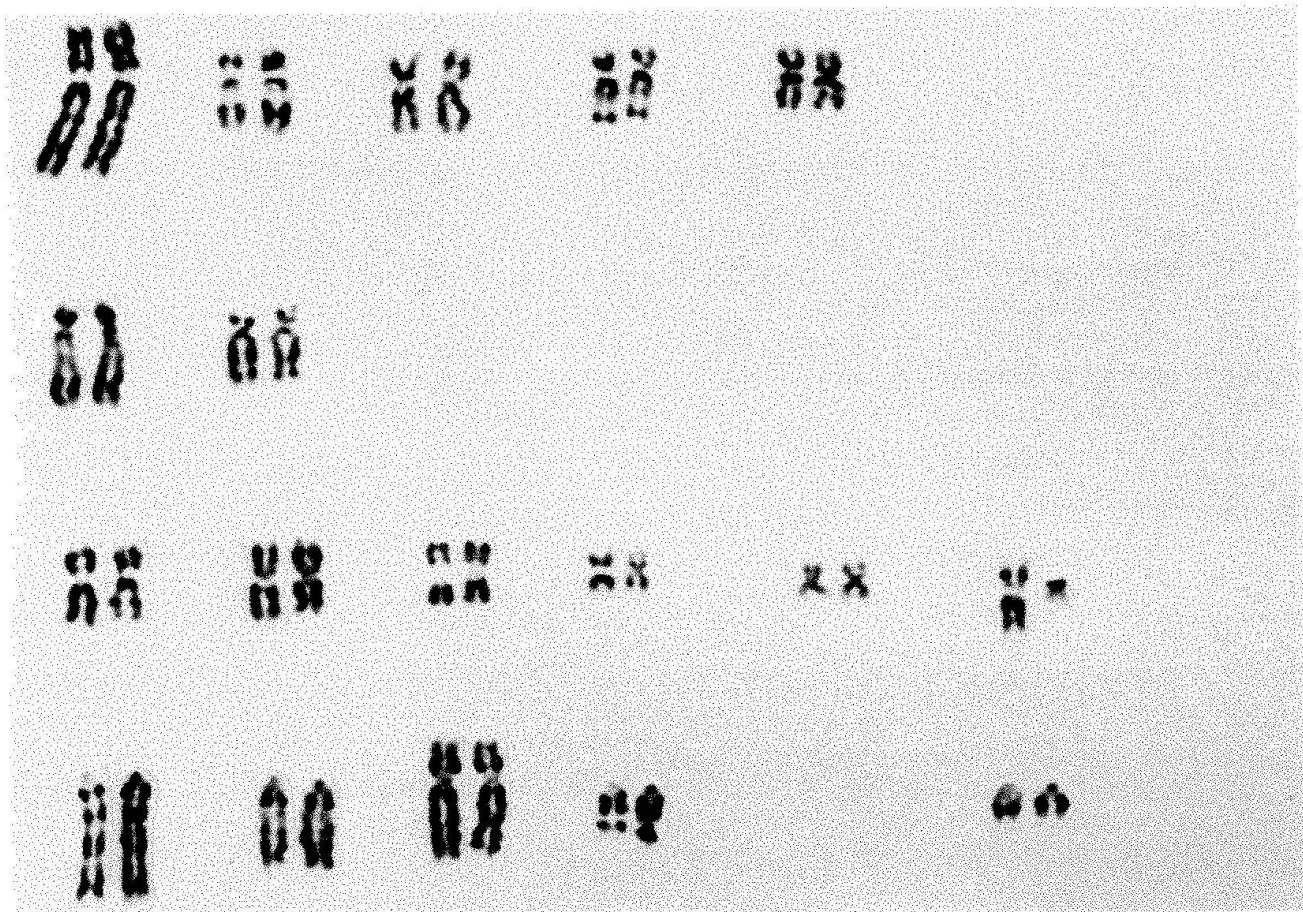


Abb. 4. Fusionschromosom bei Wildschwein.

anderen Tierarten sind dieselben Verhältnisse gegeben. Es leuchtet daher ein, dass bei dieser Vermehrungsrate eine genaue genetische Analyse vorgeschaltet werden muss und erst nach einem Testeinsatz und der Überprüfung aller Parameter ein genereller Einsatz erlaubt wird. Zunehmend werden daher auch biochemische, zellgenetische und chromosomale Analysen durchgeführt. Diese Untersuchungen dienen mehr der Erbfehlerprophylaxe und weniger den genetischen und produktionstechnischen Überlegungen. Ein Wunschtraum ist noch immer die exakte Spermientrennung, um weibliche oder männliche Nachkommen gezielt zu erzeugen. Auch hier werden in der Experimentalphase zytogenetische Methoden eingesetzt, insbesondere um den Erfolg der Trennung möglichst rasch an Hand der Geschlechtschromosomen konstatieren zu können.

Realität wurde die Auftrennung nach Geschlecht beim Embryotransfer, einer weiteren biotechnischen Methode, da über eine Zellentnahme und Chromosomenanalyse das Geschlecht des Embryos bestimmt wer-

den kann, bevor der Embryo wieder auf ein Empfängertier übertragen wird. Dieser Vorgang kommt der Amniocentese beim Menschen sehr nahe. Beim Rind wurde die Amniocentese ebenfalls erfolgreich durchgeführt, hat aber keine direkte Anwendung gefunden, da es keine Alternativen nach Kenntnis des Geschlechtes oder einer Abnormität gibt, als das Kalb austragen zu lassen und dann der Verwertung zuzuführen. Sowohl für die Theorie wie auch in der Praxis kann die Zytogenetik wertvolle Erkenntnisse liefern. In der Tierzucht werden heute noch viele Massnahmen auf Grund von empirisch ermittelten Annahmen getroffen. Diese sind zu überprüfen und mit Testverfahren wie z.B. auch zytogenetischen Techniken aufzuklären.

Tierzucht bedeutet Selektion; die genetische Variation ist eine Voraussetzung für die Selektion. Eigenschaften erkennbar machen, die als Selektionsmerkmale effizient genutzt werden können, dazu sind ebenfalls Chromosomenanalysen unter Verwendung von Markerchromosomen aufschlussreich. Segre-

gationsanalysen in Populationen geben Einsicht in Beziehungen von Determinanten, die für den Aufbau und den Erhalt einer Tierpopulation entscheidend sind. Ausnahmen in der allgemeinen genetischen Gesetzmässigkeit sind züchterisch interessante Sonderfälle, die zumeist ihren Ursprung in Neukombinanten oder Mutanten haben. Als Allele sind Genmutationen in ihrer Frequenz in einer Population bedeutsam und haben grosse Auswirkungen, sofern diese Genorte gekoppelte Eigenschaften, wie positive oder negative züchterische Merkmale, beinhalten. Selektion auf wenige Eigenschaften stört das genetische Gleichgewicht und damit wird ein Selektionsdruck auf eine Population ausgelöst. In der Folge werden meiotische Abläufe, wie Crossing over, Segregation und Differenzierungsvorgänge sowie die Befruchtungskapazität und embryonale Sterblichkeit beeinflusst. Zusätzliche biotechnische Methoden, wie die künstliche Besamung, geben diesen Entwicklungen eine erhöhte Wirksamkeit.

Zusammenfassung

Die Tierzucht konnte viele experimentelle Erkenntnisse aus anderen Disziplinen aufgreifen und ohne viel zusätzlichen Aufwand in der Theorie und Praxis einsetzen. Es sind aber nicht alle biologischen und zytogenetischen Phänomene direkt übertragbar, und daher muss die Tierzuchtforschung eigene Aktivitäten entwickeln. Im Austausch der Erfahrungen zwischen den einzelnen Disziplinen kann durchaus auch das Tier wertvolle Informationen für den Menschen liefern, wenn auch meist mit umgekehrten Vorzeichen, wie das Fruchtbarkeitsgeschehen aufzeigt: Antibabypille beim Mensch und Superovulation beim Tier. Im Vordergrund der zytogenetischen Untersuchungen steht die Aufklärung genetischer Phänomene, die mit biotechnischen und populationsgenetischen Analysen nicht erklärbar sind und meist am Tier selbst untersucht werden müssen. Besondere Bedeutung haben die Embryonalverluste in der Tierzucht, deren kausale Ursachen zumeist in Letalgenen und Chromosomenanomalien gesucht werden müssen. Bei der Aufzählung einzelner zytogenetischer Erkenntnisse bei den

verschiedenen Nutztierarten wie Pferd, Rind, Schaf, Ziege, Schwein und Geflügel liegt der Schwerpunkt immer im Einsatz der Tiere zur Zucht. Beziehungen zu produktionstechnischen Aspekten haben zur Zeit kaum Bedeutung, obwohl in Zukunft über die Genkartierung Auswirkungen zu erwarten sind. Die Symbiose der Populationsgenetik mit der Zytogenetik in der Tierzucht ist sehr interessant, da dem Einzeltier als Individuum wieder mehr Aufmerksamkeit geschenkt wird.

Die Arbeiten von R. Matthey sind den Tierzüchtern wohl bekannt. Gerade das Zentromerfusionsgeschehen bei allen Nutztierarten steht im direkten Zusammenhang mit den wertvollen Erkenntnissen von R. Matthey, die von vielen Zytogenetikern in ihrer Bedeutung lange nicht erkannt wurden.

Literatur

- Bongso, A. and P.K. Basrur: Chromosome anomalies in Canadian Guernsey bulls. *Cornell Vet.* 66: 476-489 (1976).
- Bruère, A.N., and Chapman, Helen M.: Autosomal translocation in two exotic breeds of cattle in New Zealand. *Vet. Rec.*, 92: 615-618 (1973).
- Bruère, A.N.: Further evidence of normal fertility and formation of balanced gametes in sheep with one or more different Robertsonian translocations. *J. Reprod. Fert.* 45: 323-331 (1975).
- Caspersson, T. and Zech, C.: Chromosome identification technique and applications in biology and medicine (Uppsala 1973).
- Chandley, A.C., Fletcher, J., Rossdale, P.D., Peace, C.K., Ricketts, S.W., McEnery, R.J., Thorne, J.P., Short, R.V., Allen, W.R.: Chromosome abnormalities as a cause of infertility in mares. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 23: 377-383 (1975).
- Cribiu, E.P., and C.P. Popescu, 1974. Un cas de chromosome Y anormalement long chez *Bos taurus* L. *Ann. Génét. Sél. Anim.* 6: 387.
- Darré, R., Quéinnec, G. et Berland, H.-M.: La translocation 1/29 des bovins: Etude générale et importance du phénomène dans le Sud-Ouest. *Rev. Méd. vét.* 123: 477-494 (1972).
- De Giovanni, A.M., Succi, G., Molteni, L., Castiglioni, M.: A new autosomal translocation in 'Alpine Grey Cattle'. *Ann. Génét. Sél. anim.* 11: 115-120 (1979).
- Di Bernardino, D., Iannuzzi, L., Ferrara, L., Malassino, D.: A new case of Robertsonian translocation in cattle. *The J. of Heredity* 70(6) (1979).
- Eldridge, F.E.: A dicentric Robertsonian translocation in a Dexter cow. *J. Hered.* 65: 353-355 (1974).
- Eldridge, F.E. and W.F. Blazak: Comparison between the Y chromosomes of Chianina and Brahma crossbred steers. *Cytogenet. Cell Genet.* 18: 57-60 (1977).
- Fechheimer, N.S.: A cytogenetic survey of young bulls in the U.S.A. *Vet. Rec.* 93: 535-536 (1973).

- Fechheimer, N.S.: Cytogenetics in Animal Production. *J. of Dairy Science*, Vol. 62/5: 844-853 (1979).
- Gustavsson, I., M. Fraccaro, L. Tiepolo and J. Lindsten: Presumptive X-autosome translocation in a cow: Preferential inactivation of the normal X chromosome. *Nature* 218: 183-184 (1968).
- Hansen, K.M.: Bovine tandem fusion and infertility. (Abstr.) *Hereditas*, 63: 453-454 (1969).
- Harvey, M.J.A.: Cytogenetic studies in bulls. *Vet. Rec.* 95: 353 (1974).
- Henricson, B. and Bäckström, L.: Translocation heterozygosity in a boar. *Hereditas* 52: 166-170 (1964).
- Hsu, T.C.: Human and Mammalian Cytogenetics (an Historical Perspective). (Springer Verlag, New York) 1980.
- Kovacs, A., Meszaros, L., Sellgei, M., and Vass, L.: Mosaic centromeric fusion in a Holstein-Friesian bull. *Acta Biologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 24(3/4): 215-220 (1973).
- Lyon, M.F.: Sex chromatin and gene action in the mammalian X-chromosome. *Amer. J. Hum. Genet.* 14: 135 (1962).
- Masuda, H., Shioya, Y., Fukuhara, R.: Robertsonian translocation in Japanese Black cattle. *Jap. J. Zootech. Sci.* 51: 26-32 (1980).
- Moraes, J.C.F., M.S. Mattevi, F.M. Salzano, J.L.E.H. Poli and B. Erdtmann: A cytogenetic survey of five breeds of cattle from Brazil. *The J. of Heredity* 71: 146-148 (1980).
- Pollock, D.: A chromosome abnormality in Friesian cattle in Great Britain. *Vet. Rec.*, 90: 309-310 (1972).
- Popescu, C.P.: Un cas possible d'inversion péricentrique chez les bovins. *Ann. Génét.* 15: 197-199 (1972).
- Popescu, C.P.: New data on pericentric inversion in cattle (*Bos taurus* L.). *Ann. Génét. Sél. Anim.* 8: 443-448 (1976).
- Popescu, C.P.: New type of Robertsonian translocation in cattle. *J. Hered.* 68: 138-142 (1977).
- Popescu, C.P.: Les recherches cytogénétiques des animaux domestiques. Weiterbildungskurs des SVIVAL an der ETH Zürich, Tab. 4 und 5, 13.-14. August 1980.
- Short, R.V., J. Smith, T. Mann, E.P. Evans, J. Hallett, A. Fryer, J.L. Hamerton: Cytogenetic and endocrine studies of a freemartin heifer and its bull twin. *Cytogenetics* 8, Nr. 5: 369-388 (1969).
- Stranzinger, F.G. and M. Förster: Autosomale Chromosomen Translokationen beim Fleck- und Braunvieh. *Experientia* 32: 24-27 (1976).
- Stranzinger, G.: Die Bedeutung zytogenetischer Untersuchungen für die praktische Tierzucht. *Tierzüchter* 9: 366-369 (1978).
- Stranzinger, G., Dolf, G., Fries, R. und Stocker, H.: Some rare cases of chimaerism in twin cattle and their proposed use for determining germinal cell migration. *J. of Heredity* 72: 360-362 (1981).
- Tschudi, P., B. Zahner, U. Küpfer, and G. Stämpfli: Chromosomenuntersuchungen an schweizerischen Rinderrassen. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 119: 329-336.
- Zahner, B.: Robertson'sche Translokationen (zentrische Fusionen) bei Schweizer Rinderrassen. Dissertation der Veterinär-Medizinischen Fakultät der Universität Bern (1977).

Adresse des Autors:

Prof. Dr. Gerald Stranzinger
Institut für Tierproduktion ETH
Gruppe Tierzucht
Tannenstrasse 1
CH-8006 Zürich

Sachwortregister/Index des matières/Subject Index

- Abortions, spontaneous 28
- Aneuploidy 28, 69
- Animal breeding 68
- Banding techniques 11, 45, 58
- B-chromosomes 6
- Birds 31, 34, 35, 39, 41, 76
- Chimerism 39, 70, 72
- DNA
 - amount of 9, 10, 11, 28, 31, 33
 - replication 61
 - satellite 9, 35
 - sequences 3, 9, 11, 13, 33
- Embryo transfer 77
- Euchromatin 11, 13
- Fish 8, 9, 33, 39
- Freemartin 40
- Genome size 8, 29, 33
- Haploidy 28
- Heterochromatin 12, 13, 15
- High resolution banding 59
- H-Y-antigen 39, 69, 72
- Insemination artificial 76
- Irradiation 64, 74
- Macrochromosomes 34, 35, 76
- Meiosis 7, 17, 24, 28, 50, 51, 52, 53, 71
- Microchromosomes 4, 5, 6, 7, 34, 35, 59, 76
- Nombre fondamental (NF) 2, 5, 34, 68, 69
- Nucleolus organizer regions (NORs) 13, 17, 20, 21, 35, 49, 53
- Parthenogenesis 35
- Polyploidy 7, 28, 69
- Protein evolution 25
- Sex chromosomes
 - XX/XY-type 19, 23, 36, 41, 47
 - ZZ/ZW-type 19, 23, 34, 41
- Sex determination 36, 39
- Steroids, modes of actions 41, 42
- Testicular differentiation 41
- X-chromosome
 - inactivation of ... 69