

TOMMASO D'ANNA, ROSA LA SPINA & GIUSEPPE CANNONE

INDAGINI CITOLOGICHE SUL COLORE DELLA PELLE DORSALE
DEL DISCOGLOSSO SICILIANO
(*Amphibia, Anura*)

RIASSUNTO

La presente ricerca riguarda uno studio della pelle dorsale del *Discoglossus pictus pictus*, fenotipo « vittato », allo scopo di indagare sulle sue ridotte capacità mimetiche nei confronti di quello « ocellato ».

Particolare attenzione è stata rivolta alla disposizione dei cromatofori dermici nelle zone delle strisce gialle, giacché queste diversificano le livree delle due forme.

L'analisi istologica delle strisce gialle ha rivelato la presenza di unità cromatoforiche interghiandolari costituite di un melanoforo in relazione con due o tre iridofori e altrettanti xantofori. Inoltre, i melanofori sono scarsamente digitati e, in corrispondenza della porzione esterna delle ghiandole, si trovano soltanto iridofori e xantofori.

Il colore giallo delle strisce potrebbe essere legato alla particolare disposizione delle unità cromatoforiche e al ridotto numero dei melanofori e delle loro ramificazioni.

SUMMARY

The cytological basis of chromatic variations in the skin of sicilian Discoglossus. — The aim of this research was to investigate, on morphological and cytological basis, the reduced mimetic capacities and colour variations in the « striped » specimens of *Discoglossus pictus pictus*.

The distribution of dermal chromatophores in the yellow striped regions of the dorsal skin was studied by electron microscope and compared with that of the previously observed interspaces areas of « spotted » specimens.

Pigmentary cells are situated in a stratigraphic order: a continuous layer of xanthophores is located beneath the basement membrane; a second layer of iridophores coincides

perfectly with that of xanthophores, in the ratio of 1:1; finally a reduced number of melanophores are located under the iridophores in the interglands spaces only. Melanophores associated with other chromatophores form units in ratios of 1:2:2 and 1:3:3.

The yellow pattern in the stripes results from association (1:1) of xanthophores and iridophores. The intensity of the yellow colour in the skin of *Discoglossus pictus pictus*, could be regulated by the reflection of light from the iridophores layer, through the xanthophores layer.

The melanophores could regulate the darkening or lightening of the skin, by dispersion or concentration of their melanosomes.

INTRODUZIONE

Numerose specie animali presentano colorazioni e disegni cutanei che consentono loro di mimetizzarsi con l'ambiente e sfuggire così ai predatori.

Nei Vertebrati a sangue freddo i disegni tipici e le diverse tonalità di colore della pelle sono dovuti a cellule pigmentarie, variamente associate, e alla loro interazione con la luce (NOBLE, 1954; BAGNARA e HADLEY, 1973; NEEDHAM, 1974; FOX, 1976).

Tra gli Anfibi Anuri il *Discoglossus pictus pictus*, frequente in Sicilia, ha buone capacità mimetiche. Tipicamente acquatico, esso si rinviene di preferenza negli stagni, nei pantani, nelle pozze, nei rigagnoli, nelle cisterne e manifesta diverse tonalità di colore con il variare del suo habitat (RIGGIO, 1976).

Un ruolo importante, nell'adattamento dell'animale all'ambiente viene svolto dalla livrea dorsale, che si presenta sotto due aspetti: a macchie e a strisce e che caratterizza i due fenotipi « *ocellato* » e « *vittato* » (SCHREIBER, 1875; CAMERANO, 1879, 1883; ALONSO-BEDATE, 1960; KNOEPFFLER, 1961; LA SPINA, 1963; REVERBERI, 1964, 1965).

Gli individui a livrea « *ocellata* » presentano sul dorso macchie scure, più o meno rotondeggianti, sparse su un fondo omogeneo più chiaro. Gli esemplari a livrea « *vittata* » sono caratterizzati da tre strisce gialle longitudinali, che delimitano due ampie zone, nelle quali ricorre un disegno pigmentario simile a quello degli individui a macchie.

Il fenotipo « *vittato* », pur essendo geneticamente dominante, è meno comune di quello « *ocellato* »: nei Discoglossi delle varie provincie siciliane, compare solo nel 7% degli individui (REVERBERI, 1964, 1965). Si ritiene che la presenza delle strisce gialle dorsali riduca notevolmente le capacità mimetiche e che di conseguenza, gli individui « *vittati* » siano predati con maggiore frequenza, soprattutto durante l'accrescimento post-larvale, quando si rende evidente il disegno.

La presente ricerca mira a capire in base a quale disposizione delle cel-

lule pigmentarie si realizza il disegno a strisce gialle e a dare una spiegazione, su basi morfologiche, alle variazioni di tonalità del giallo nel fenomeno di adattamento dell'animale all'ambiente. Dati preliminari sono stati riferiti nel 1978 da LA SPINA e D'ANNA.

MATERIALI E METODI

Animali adulti del fenotipo « vittato » del *Discoglossus pictus pictus*, raccolti nei dintorni di Palermo, furono utilizzati per il presente studio. Piccoli frammenti di pelle dorsale, corrispondenti alle regioni delle strisce gialle, isolati da esemplari uccisi per decapitazione, furono immersi in soluzione Ringer e preparati per lo studio istologico al microscopio elettronico: fissazione per due ore in aldeide glutarica al 6% in buffer s-collidina 0,1 M a pH 7,4 e successivamente per tre ore in O_3O_4 al 2% nello stesso

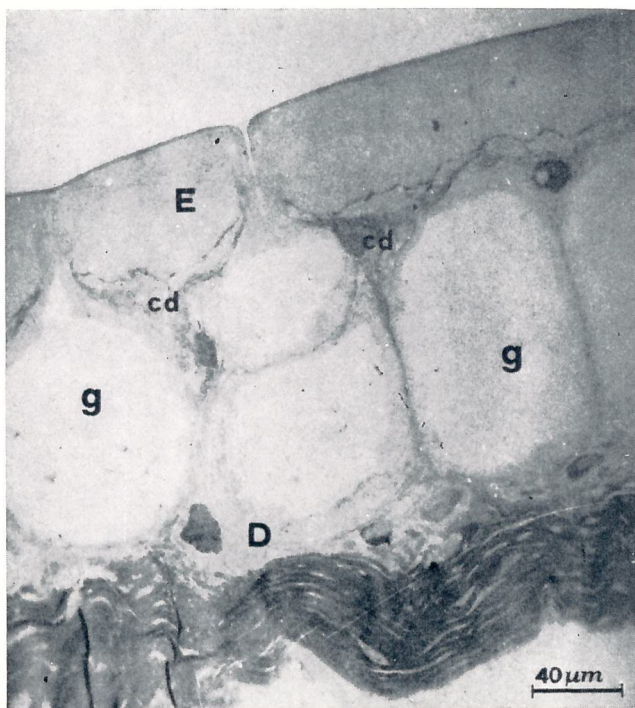


Fig. 1. — Visione di insieme della pelle di *Discoglossus* in sezione trasversale (1 μ m di spessore). E = epidermide; D = derma; cd = cromatofori dermici; g = ghiandola. (300 \times).

buffer (BENNETT e LUFT, 1959; BAGNARA e al., 1968); disidratazione in alcool etilico, passaggio in ossido di propilene e quindi inclusione in DER (LOCKWOOD, 1964).

Sezioni sottili, ottenute con ultramicrotomo Porter-Blum, furono montate su griglie ricoperte con film di formvar, contrastate con acetato di uranile o con citrato di piombo alcalino (WATSON, 1958; REYNOLDS, 1963) e osservate al microscopio elettronico Siemens Elmiskop 1b.

Sezioni spesse 1-2 μm , colorate con bleu di toluidina all'1% in soluzione acquosa di carbonato di sodio 0,5% (BACCARANI, 1965) sono state osservate e fotografate al microscopio luce.

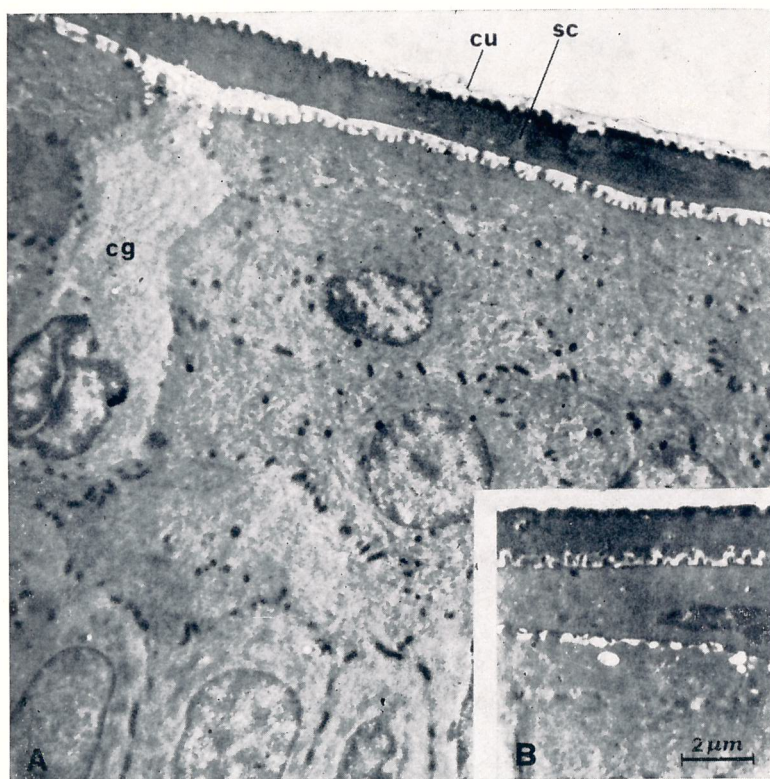


Fig. 2. — Sezioni trasversali di epidermide (5.000 \times).

- A) Dettagli dei vari strati di cellule. cu = cuticola; sc = strato corneo; cg = cellula ghiandolare a fiasco.
 B) Zona di epidermide con tre strati cornei.

OSSERVAZIONI

L'epidermide del Discoglossò, in corrispondenza delle strisce gialle dorsali, è pluristratificata, il derma sottostante è ricco di cellule pigmentarie e in esso si insinuano ghiandole (Fig. 1).

Nelle micrografie dell'epidermide si osservano: uno o due strati esterni, di cellule appiattite notevolmente corneificate che presentano una cuticola superficiale; tre o più strati di cellule poliedriche unite da numerosi desmosomi; uno strato germinativo di cellule colonnari a contatto della membrana basale. Tra le cellule poliedriche si riscontrano grosse cellule a fiasco, probabilmente a funzione secretiva (NOBLE, 1954), che si protendono verso l'esterno, attraverso lo strato corneo (Fig. 2). Nello strato germinativo, tra le cellule colonnari, sono presenti rari melanociti.

Le osservazioni ultrastrutturali del derma hanno rivelato presenza di

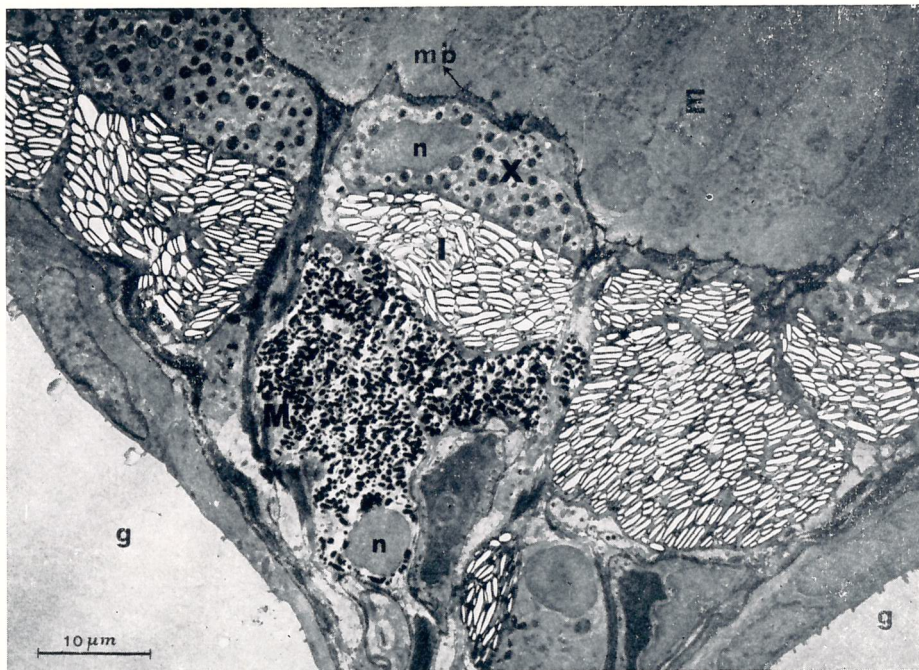


Fig. 3. — Disposizione dei cromatofori dermici nella regione interghiandolare. Sotto l'epidermide (E) si osservano: membrana basale (mb), xantofori (X), iridofori (I), melanofori (M), ghiandole (g). (1.450 ×).

tre tipi di cellule pigmentarie: xantofori, iridofori e melanofori, disposti a strati tra la membrana basale e la porzione esterna delle ghiandole sottostanti (Fig. 3). Iridofori e melanofori si rinvencono anche in corrispondenza della porzione più profonda delle ghiandole; sulla loro disposizione e funzione sono in corso altri studi.

Gli *xantofori*, di colore giallo, sono appiattiti, presentano grosso nucleo, hanno il citoplasma ricco di inclusi specifici, gli pterinosomi (corpi sferici a struttura lamellare concentrica) e goccioline lipidiche, probabilmente contenenti carotenoidi. Queste cellule, in stretto rapporto con la membrana basale, formano uno strato quasi continuo che si interrompe in corrispondenza delle aperture ghiandolari.

Gli *iridofori*, cellule iridescenti, hanno forma varia, grosso nucleo e sono caratterizzati dalla presenza massiva di corpi bastoncellari, le placchette riflettenti o rifrattosomi, disposti spesso a gruppi ugualmente orientati. Queste cellule pigmentarie, appiattite nella porzione più esterna delle ghiandole, assumono forma poliedrica in corrispondenza degli spazi interghiandolari. La loro disposizione è analoga a quella degli xantofori; esse formano un secondo strato continuo di cellule (Fig. 4).

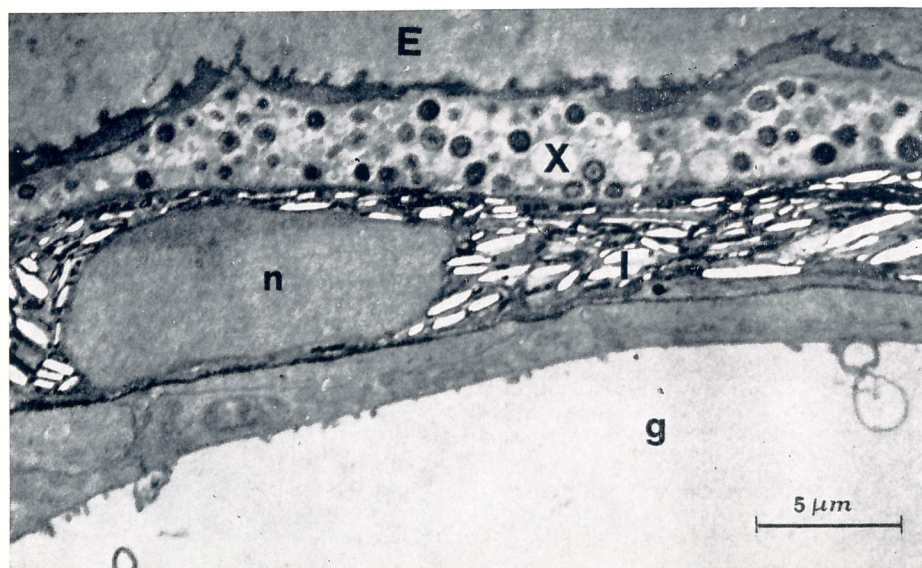


Fig. 4. — Disposizione dei cromatofori dermici nella regione sopra ghiandolare. Sotto l'epidermide (E) si trovano soltanto xantofori (X) e iridofori (I). (3.800 \times).

I *melanofori*, cellule più o meno scure, hanno forma di cesto, presentano il nucleo alla base del corpo cellulare, e sono ricchi di organuli contenenti melanina, i melanosomi. Essi sono i cromatofori dermici più grandi e più profondi, disposti sotto gli iridofori solamente negli spazi interghiandolari; mediante i loro processi dendritici, sono in relazione con 2 o 3 iridofori e altrettanti xantofori. Tra una ghiandola e l'altra, si realizzano così unità cromatoforiche dermiche (U.C.D.), probabilmente coordinate nella loro funzione, nelle quali il rapporto tra melanofori, iridofori e xantofori è 1:2:2 oppure 1:3:3 (Fig. 3 e 5). Particolari degli organuli dei tre tipi di cromatofori sono riportati nella Fig. 6.

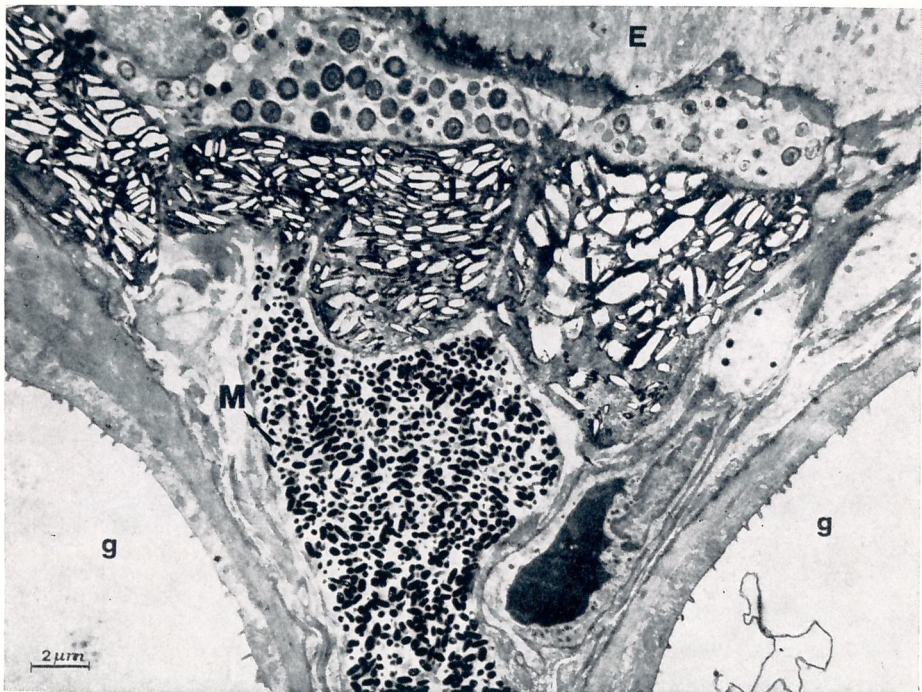


Fig. 5. — Associazioni di cromatofori dermici interghiandolari; abbreviazioni come in fig. 3. (3.500 \times).

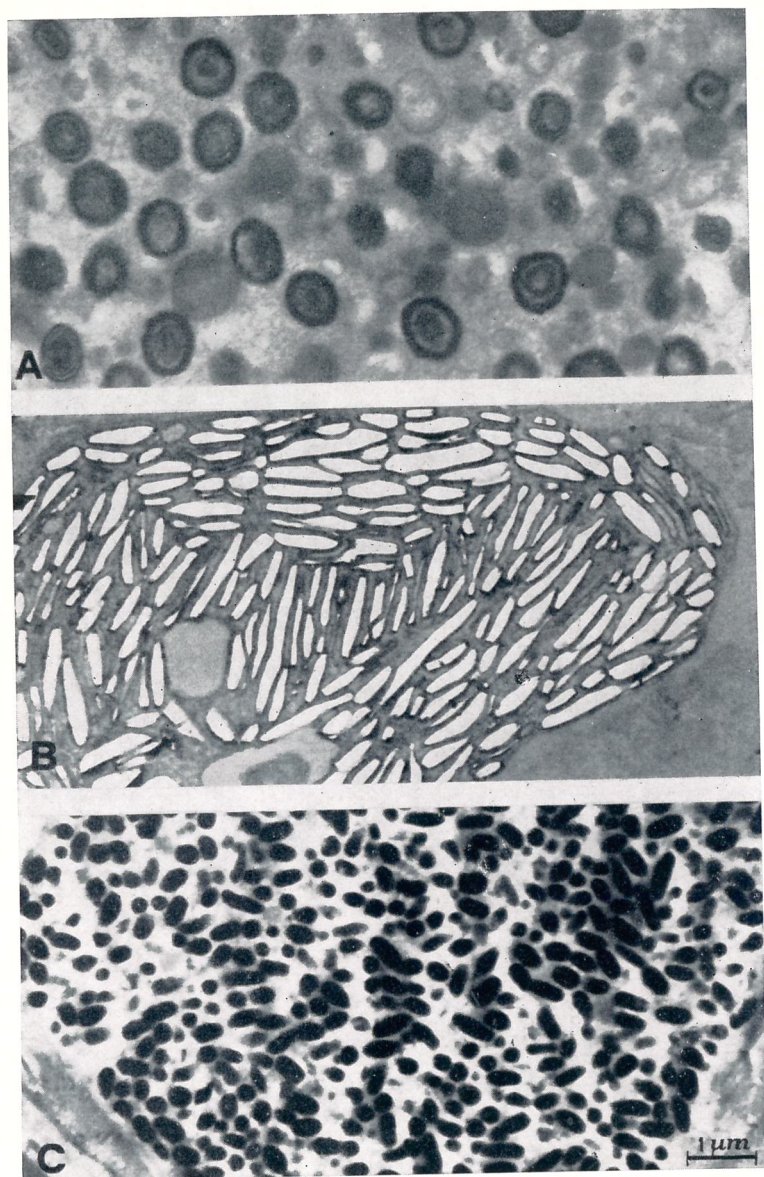


Fig. 6. — Inclusi citoplasmatici specifici dei cromatofori dermici:

- A) Pterinosomi e vescicole lipidiche degli xantofori;
- B) Placchette riflettenti degli iridofori;
- C) Melanosomi dei melanofori. (8.800 ×).

DISCUSSIONE

Il presente lavoro si inquadra in una linea di ricerca, intrapresa da alcuni anni, intesa a stabilire in base a quale disposizione delle cellule pigmentarie si realizza il disegno delle livree dorsali, nei due fenotipi di Discoglossi siciliani. Si è cercato di capire, analizzando i rapporti spaziali fra tali cellule, come si determinano le variazioni cromatiche della pelle dorsale nel fenomeno di adattamento degli animali all'ambiente. Infatti è stato frequentemente osservato, in animali liberi o tenuti in laboratorio, in particolari condizioni di luce e di cromatismo ambientale, che le tonalità di colore spesso variano, mentre rimane costante il disegno tipico a macchie o a strisce.

Numerose ricerche, condotte sugli Anfibi, hanno mostrato che alla formazione del disegno della pelle partecipano i melanociti epidermici e i cromatofori dermici (xantofori gialli o eritrofori rossi, iridofori argentei e melanofori bruni o nerastri). Inoltre è stato osservato che le variazioni cromatiche della pelle dorsale dipendono principalmente dallo stato fisiologico dei cromatofori dermici.

In un lavoro precedente, sul fenotipo « *ocellato* », sono stati riportati i dati dello studio di regioni di fondo o intermacchie della pelle dorsale (D'ANNA e LA SPINA, 1975). I cromatofori dermici hanno questa disposizione: gli xantofori, in strato continuo, sotto la membrana basale, sovrastrano i melanofori o le loro ampie ramificazioni che si estendono sulle ghiandole; nelle zone interghiandolari, invece, sotto gli xantofori si trovano gli iridofori che stanno adagiati sui melanofori come in un cesto. Si costituiscono in tal modo associazioni di 2 o 3 tipi di cellule pigmentarie sopra e tra le ghiandole. Per comodità chiameremo « unità cromatoforiche dermiche incomplete » (U.C.D.i.) quelle sopraghiandolari, costituite da 2 tipi di cellule e « unità cromatoforiche dermiche complete » (U.C.D.c.) quelle interghiandolari, in cui figurano 3 tipi cellulari. I melanofori, molto digitati, estendono le loro ramificazioni tra xantofori e iridofori; la concentrazione dei melanosomi alla base del corpo cellulare o la loro dispersione, nei processi dendritici, determinano lo schiarimento o l'inscurimento della pelle, in risposta a stimoli ambientali, ormonali, nervosi (TAYLOR e BAGNARA, 1972).

Lo studio delle strisce gialle ha rivelato una disposizione dei cromatofori dermici diversa da quella osservata nelle regioni di fondo: sotto lo strato di xantofori si rileva uno strato continuo di iridofori i quali costituiscono una sorta di tappeto uniforme che può riflettere variamente la luce ed esaltare il colore giallo; vi è quindi, un rapporto unitario tra xantofori

e iridofori, sia sopra che tra le ghiandole. I melanofori sono presenti esclusivamente nelle regioni interghiandolari, hanno pochi dendriti e sono in numero limitato rispetto agli altri due tipi di cellule pigmentarie; stanno sotto gli iridofori e formano unità cromatoforiche dermiche complete nelle quali, però, il rapporto con iridofori e xantofori è 1:2:2 o 1:3:3. Di conseguenza, in queste regioni della pelle, un melanoforo può svolgere una attività di schermatura poco efficace, essendo impegnato con due o più iridofori.

Si ritiene che la massiccia presenza di iridofori e di xantofori sia responsabile del persistere delle strisce gialle, come struttura permanente, anche quando l'animale scurisce la pelle dorsale nel suo insieme, in particolari condizioni ambientali; la luce, filtrata dagli xantofori, viene riflessa quasi totalmente dagli iridofori sottostanti.

È stato spesso osservato un alto grado di variabilità nelle tonalità del colore giallo in tempi diversi, negli stessi animali tenuti in osservazione. Alla base di questo fenomeno vi è la quantità di luce riflessa o dispersa dalle placchette riflettenti degli iridofori che funzionerebbero come specchietti, ad orientamento variabile, in risposta a stimoli esterni.

Diversi autori hanno dimostrato che gli organuli degli iridofori rispondono a stimoli ambientali, ormonali e nervosi in modo opposto a quello dei melanosomi nei melanofori, con movimenti centrifughi quando l'animale schiarisce la sua pelle e centripeti quando la scurisce (TAYLOR e BAGNARA, 1972; BUTMAN et al., 1979). Il loro concentrarsi o disperdersi nel corpo cellulare e il loro diverso orientamento, cioè il variare dello stato fisiologico degli iridofori, determinerebbero la comparsa di una vasta gamma di tonalità del colore giallo. D'altro canto la presenza, sia pure limitata alle zone interghiandolari, di unità cromatoforiche dermiche complete, contribuisce a scurire le strisce, anche se in maniera ridotta.

Il dato significativo, emerso dal presente studio sui discoglossi siciliani, è la diversa associazione delle cellule pigmentarie nelle varie aree della pelle dorsale. Le strisce gialle si diversificano dalle zone di fondo delle aree adiacenti per il secondo strato di cellule pigmentarie che è rappresentato esclusivamente da iridofori.

Una situazione simile è stata osservata in *Ambystoma maculatum* in cui le macchie gialle dorsali sono costituite di gruppi di xantofori che sovrastano uguali associazioni di iridofori (TAYLOR e BAGNARA, 1972).

La natura utilizza identiche associazioni cellulari per realizzare un certo tipo di disegno di colore giallo, sia esso costituito da macchie o da strisce.

BIBLIOGRAFIA

- ALONSO-BEDATE M., 1960 — Analisis experimental de la pigmentacion dorsal de *Discoglossus pictus*. — *Bol. R. Soc. esp. Hist. nat.*, Madrid, 58: 5-71.
- BACCARINI M., 1965 — Light microscopy of thick sections. — *Atti V Congr. Ital. Micr. Elettr.*, Bologna, 19-22.
- BAGNARA J. T., TAYLOR J. D., HADLEY M. E., 1968 — The dermal chromatophore unit. — *J. Cell Biology*, New York, 38: 67-79.
- BAGNARA J. T., HADLEY M. E., 1973 — Chromatophores and color change. — *Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs*, New Jersey, 202 pp.
- BENNETT H. S., LUFT J. H., 1959 — s-collidine as a basis for buffering fixatives. — *J. biophys. biochem. Cytol.* Baltimore, New York, 6: 113-114.
- BUTMAN B. T., OBIKA M., TCHEN T. T., TAYLOR J. D., 1979 — Hormone-induced pigment translocation in Amphibian dermal iridophores. In vitro: Changes in cell shape. — *J. exp. Zool.*, Philadelphia, 208: 17-34.
- CAMERANO L., 1879 — Studi sul genere *Discoglossus*. — *Atti Accad. Sci.*, Torino, XIV.
- CAMERANO L., 1883 — Monografia degli Anfibi Anuri italiani. — *Memorie Accad. Sci.*, Torino, 33 (2): 3-100.
- D'ANNA T., LA SPINA R., 1975 — Interrelations of dermal Chromatophores in *Discoglossus pictus pictus*. — *Boll. Zool.*, Padova, 42: 33-38.
- FOX D. L., 1976 — Animal Biochromes and Structural Colours. — *Sidwick and Jackson*, London, 433 pp.
- KNOEPFFLER L. J., 1961 — Contribution a l'étude du genre *Discoglossus* (Amph. Anoures). — Thèse, Fac. Sc. Univ. Paris, 1-96.
- LA SPINA R., 1963 — Analisi sperimentale del disegno pigmentato di *Discoglossus pictus*. — *Acta Embryol. Morph. exp.*, Palermo, 6: 11-20.
- LA SPINA R., 1966 — Sui fattori determinanti il disegno del dorso in *Discoglossus pictus*. — *Boll. Zool.*, Padova, 33: 301-307.
- LA SPINA R., D'ANNA T., 1978 — Dorsal skin chromatophores of *Discoglossus pictus pictus* observed at the electron microscope. — *J. Submicr. Cytol.*, Bologna, 10: 1.
- LOCKWOOD W. R., 1964 — A reliable and easily sectioned epoxy embedding medium. — *Anat. Rec.*, Philadelphia, 150: 129-140.
- NEEDHAM A. E., 1974 — The significance of zochromes. — *Springer - ed.* Berlin, 429 pp.
- NOBLE G. K., 1954 — The Biology of the Amphibia. *Dover-Publ., Inc.*, New York, 577 pp.
- REYNOLDS E. S., 1963 — The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. — *J. Cell Biol.*, Baltimore, New York, 17: 208-212.
- REVERBERI G., 1964 — Data concerning the relative distribution of two varieties of *Discoglossus pictus* in Sicily (Amphibia). — *Revue suisse Zool.*, Genève, 71: 203-214.
- REVERBERI G., 1965 — Alcuni dati sul *Discoglossus pictus* in Sicilia. — *Atti Soc. Pelorit. Sci. fis. mat. nat.*, Messina, 11: 1-27.
- RIGGIO S., 1976 — Il Discoglossus in Sicilia. — S.O.S. Fauna. Animali in pericolo in Italia, Ed. WWF, Camerino, 417-464.
- SCHREIBER E., 1875 — Herpetologia Europaea. *Vierweg. F. und S.*, Braunschweig, 3-163.
- TAYLOR J. D., BAGNARA J. T., 1972 — Dermal chromatophores. — *Am. Zool.*, Utica, N.Y., 12: 43-62.

WATSON M. L., 1958 — Staining of tissue sections of electron microscopy with heavy metals. — *J. biophys. biochem. Cytol.*, Baltimore, New York, 4: 475-478.

Nota presentata nella riunione scientifica del 27.II.1981

Indirizzo degli Autori — TOMMASO D'ANNA, ROSA LA SPINA, GIUSEPPE CANNONE - Istituto di Zoologia dell'Università - Via Archirafi, 18 - 90123 Palermo (I).