

Tableau I. Formules chromosomiques des *Pitymys* européens

Espèce	2N	A	X	NF	Références
<i>Pitymys duodecimcostatus</i>	62	12	sm	76	3, 4, 5, 6, 7
<i>Pitymys mariae</i>	62	10-12	sm/a	72-76	4, 8, 5, 6
<i>Pitymys</i> sp.	54	2	a	56	9
<i>Pitymys pyrenaicus</i>	54	4	a	58	8, 5, 6, 7
<i>Pitymys savii</i>	54	6	sm	62	4
<i>Pitymys subterraneus</i>	52-54	4-6	m	60	10, 4, 11, 12, 9, 7
<i>Pitymys multiplex</i>	48	4	sm	54	3, 4, 7
<i>Pitymys lichtensteini</i>	46	4	sm	52	9
<i>Pitymys thomasi</i>	44	0	a	44	9
<i>Pitymys atticus</i>	44	2	a	46	6, 13
<i>Pitymys tatricus</i>	32	14	a	46	14

2N, nombre diploïde; A, nombre d'autosomes méta- ou submétacentriques; X, morphologie du chromosome sexuel X (m, méta-; sm, subméta- et a, acrocentrique); NF, nombre fondamental

ainsi que les premières étapes de cette étude ont déjà fait l'objet de deux publications^{4,7}.

L'élevage de *P. multiplex* a été constitué à partir d'individus du Tessin (Suisse) et du Briançonnais (France), celui de l'espèce polymorphe *P. subterraneus*, avec des sujets provenant des Alpes valaisannes (Suisse) et de Bretagne (France) pour la souche d'animaux dotés de 52 chromosomes et de la province de Namur (Belgique) pour la lignée caractérisée par 54 chromosomes. Enfin les *P. duodecimcostatus* m'ont été remis par le Laboratoire des Petits Vertébrés à Jouy-en-Josas qui entretient un élevage constitué à partir de campagnols du Gard et des Bouches-du-Rhône (France). Les animaux sont maintenant en cages, nourris et observés 3 fois par semaine, selon le schéma décrit pour l'élevage d'*Arvicola terrestris*¹⁵.

L'analyse chromosomique a été effectuée essentiellement en suivant la technique décrite dans un travail antérieur¹⁶, soit à partir de «squashes» de petits fragments de rate fixés à l'acide acétique 50% après prétraitement à l'eau distillée, les animaux ayant subi un choc colchicinique préalable de 2 à 4 h.

L'étude des diverses populations de *P. subterraneus* dotés de 52 chromosomes ayant montré que dans chacune d'elles le couple d'éléments submétacentriques néoformés résulte de la fusion d'éléments acrocentriques homologues⁷, des croisements ont été réalisés entre des formes à 52 et à 54 chromosomes, puis entre les descendants à 53 et entre ces derniers et les formes parentales. Les résultats

de ces essais figurent dans le Tableau II. Les moyennes des nombres de petits par portée montrent que la présence du trivalent autosomique chez les sujets caractérisés par 53 chromosomes ne diminue en rien leur fécondité. Ainsi donc, il semble qu'une seule fusion centrique ne soit pas en mesure d'influencer le taux de reproduction, comme cela a été constaté lorsque des processus robertsoniens touchent un plus grand nombre d'éléments, par exemple 7 paires autosomiques chez *Mus*

¹ A. P. GRAY, *Mammalian Hybrids*, 2nd edn. (Commonwealth Agricultural Bureaux, Slough 1972).

² F. PETTER, *Mammalia* 35, 351 (1971).

³ R. MATTHEY, *Rev. suisse Zool.* 62, 163 (1955).

⁴ A. MEYLAN, *Rev. suisse Zool.* 77, 562 (1970).

⁵ H. WINKING, Diplomarbeit Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn (1971).

⁶ H. WINKING, *Symp. Ther. II*, Brno (1971), sous presse.

⁷ A. MEYLAN, *Symp. Ther. II*, Brno (1971), sous presse.

⁸ H. WINKING et J. NIETHAMMER, *Bonn. Zool. Beitr.* 21, 284 (1970).

⁹ B. PETROV et S. ZIVKOVIC, *Symp. Ther. II*, Brno (1971), sous presse.

¹⁰ R. MATTHEY, *Caryologia* 6, 1 (1954).

¹¹ P. RAICU et D. DUMA, *Rev. roum. Biol. Zool.* 16, 347 (1971).

¹² M. JORDAN, K. KOWALSKI, R. KUBIAK et Z. RUDEK, *Folia biol., Krakow* 19, 443 (1971).

¹³ J. NIETHAMMER, *Symp. Ther. II*, Brno (1971), sous presse.

¹⁴ R. MATTHEY, *Z. Säugetierk.* 29, 235 (1964).

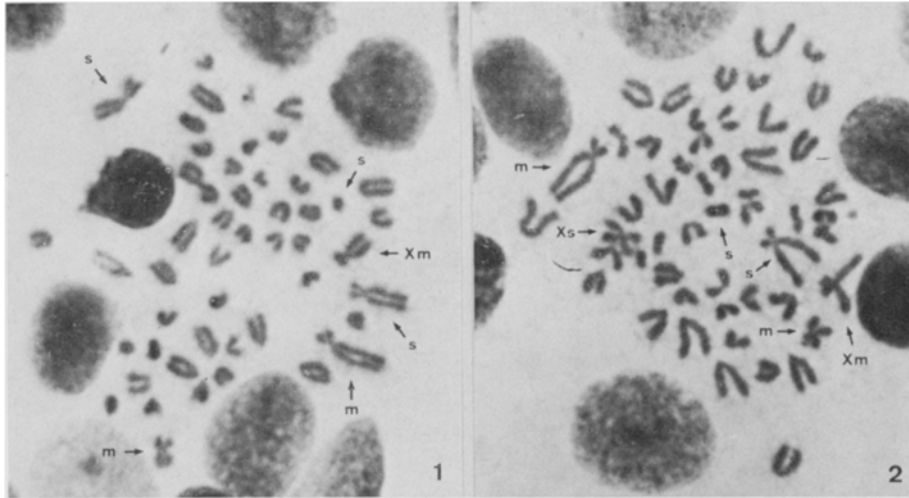
¹⁵ A. MEYLAN et J. MOREL, *Public. OEPP, Sér A* 58, 115 (1970).

¹⁶ A. MEYLAN, *Can. J. Zool.* 45, 1119 (1967).

Tableau II. Données relatives à la reproduction et aux croisements en élevage de *P. multiplex* et de *P. subterraneus*

	A	B	C	D
<i>P. multiplex</i> 2N = 48	18	228	106	2,15 (1-4)
<i>P. subterraneus</i> 2N = 52	23	349	159	2,19 (1-4)
<i>P. subterraneus</i> 2N = 54	10	92	39	2,36 (1-4)
<i>P. subterraneus</i> 2N = 52 × 2N = 54	6	79	36	2,19 (1-4)
<i>P. subterraneus</i> 2N = 53 × 2N = 53	8	77	33	2,33 (1-4)
<i>P. subterraneus</i> 2N = 52 × 2N = 53	6	61	26	2,35 (1-4)
<i>P. subterraneus</i> 2N = 53 × 2N = 54	10	73	34	2,15 (1-4)
<i>P. subterraneus</i> ♀ 2N = 52 × <i>P. multiplex</i> ♂ 2N = 48	12	17	13	1,31 (1-3)
<i>P. multiplex</i> ♀ 2N = 48 × <i>P. subterraneus</i> ♂ 2N = 52	5	9	6	1,50 (1-2)
<i>P. subterraneus</i> ♀ 2N = 54 × <i>P. multiplex</i> ♂ 2N = 48	6	14	9	1,56 (1-3)
<i>P. multiplex</i> ♀ 2N = 48 × <i>P. subterraneus</i> ♂ 2N = 54	4	9	4	2,25 (1-3)

A, nombre de ♀♀ ayant mis bas à la suite d'accouplements en élevage; B, nombre de jeunes nés en captivité; C, nombre de portées et D, moyenne et extrêmes des nombres de jeunes par mises bas.



Figures 1 et 2. Métaphases diploïdes de *Pitmys* hybrides (rate, $\times 1800$). Fig. 1. ♂ $2N = 50$ issu du croisement *P. multiplex* ♀ $2N = 48 \times P. subterraneus ♂ $2N = 52$. Fig. 2. ♀ $2N = 51$ issue du croisement *P. subterraneus* ♀ $2N = 54 \times P. multiplex ♂ $2N = 48$.$$

musculus^{17,18}. Même si seuls des homozygotes ont été capturés jusqu'à ce jour dans la nature, les deux formes chromosomiques de *P. subterraneus* doivent être considérées comme appartenant à une seule et même espèce. Il est cependant possible que les hétérozygotes aient un désavantage sélectif et soient rares, comme c'est le cas entre les différentes formes chromosomiques de *Spalax ehrenbergi*¹⁹.

Disposant d'un nombre élevé d'animaux, j'ai alors croisé des *P. subterraneus* dotés de 52 ou de 54 chromosomes avec des *P. multiplex* caractérisés par un $2N$ de 48, conservant en permanence une dizaine de couples de chaque type de croisement. Les résultats enregistrés jusqu'au début de mars 1972 sont reportés dans le Tableau II.

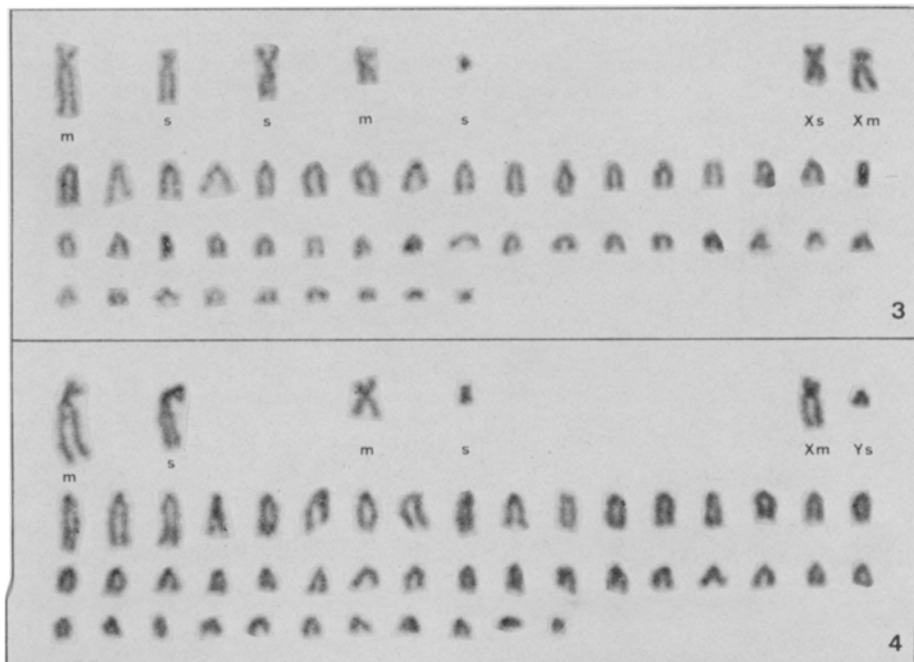
Il ressort des chiffres présentés que les nombres moyens de petits par portée dans ces croisements interspécifiques sont nettement inférieurs à ceux caractérisant la reproduction des espèces parentales, sauf une exception, établie sur quatre mises bas seulement.

Deux faits doivent être relevés. Tout d'abord, l'obtention d'hybrides d'espèces semble plus facile en croisant une ♀ de *P. subterraneus* avec un ♂ de *P. multiplex* que

¹⁷ A. GROPP, U. TETTENBORN et E. VON LEHMANN, *Cytogenetics* 9, 9 (1970).

¹⁸ U. TETTENBORN et A. GROPP, *Cytogenetics* 9, 272 (1970).

¹⁹ J. WAHRMAN, R. GOITEN et E. NEVO, in *Comparative Mammalian Cytogenetics* (Ed. K. BENIRSCHKE; Springer Verlag, New York 1969)



Figures 3 et 4. Caryogrammes de *Pitmys* hybrides (rate, $\times 1800$). Fig. 3. ♀ $2N = 50$ issue du croisement *P. subterraneus* ♀ $2N = 52 \times P. multiplex ♂ $2N = 48$. Fig. 4. ♂ $2N = 51$ issu du croisement *P. multiplex* ♀ $2N = 48 \times P. subterraneus ♂ $2N = 54$.$$

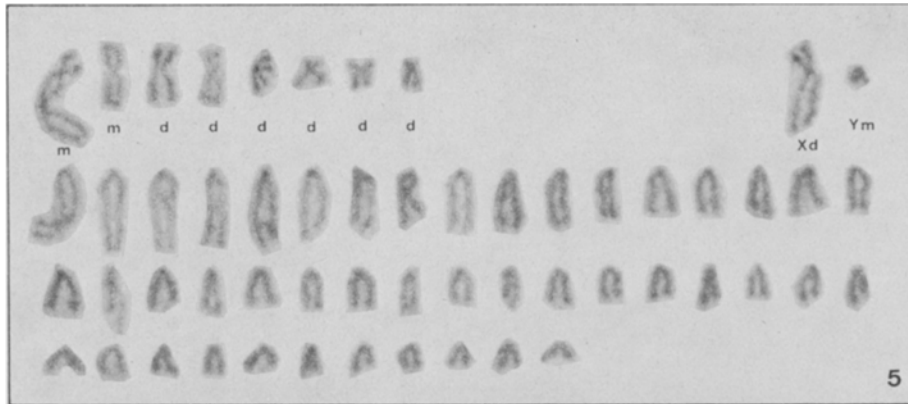


Figure 5. Caryogramme d'un embryon de *Pitomys* hybride ♂ $2N = 55$ issu du croisement *P. duodecimcostatus* ♀ $2N = 62 \times P. multiplex$ ♂ $2N = 48$ (foie, $\times 1800$).

l'inverse. Secondement, la majorité des mises bas dans les croisements interspécifiques (27 sur 32) a lieu entre le 1er octobre et le 31 mars, alors que l'été est la principale période de reproduction aussi bien chez *P. subterraneus* que chez *P. multiplex*. Il semble donc que, même si ces deux espèces sont sympatriques dans certaines régions, comme cela vient d'être mis en évidence à Airolo au Tessin (Suisse), des croisements interspécifiques ont fort peu de chance de se produire dans la nature. Il n'est pas impossible qu'une barrière à l'hybridation apparaisse au cours de la période normale de reproduction.

Seuls 6 hybrides ont déjà fait l'objet d'une étude caryologique. Les 2 métaphases diploïdes (Figures 1 et 2) et les 2 caryogrammes (Figures 3 et 4) présentés ici montrent, chez les sujets issus des croisements *P. subterraneus* $2N = 52 \times P. multiplex$ $2N = 48$, 50 chromosomes et, chez ceux provenant des croisements *P. subterraneus* $2N = 54 \times P. multiplex$ $2N = 48$, 51 éléments. Chez tous les individus analysés, les métaphases diploïdes possèdent les stocks haploïdes complets des 2 espèces parentales. Les autosomes subméta- ou métacentriques et les X des deux parents sont suffisamment différents et ils peuvent toujours être identifiés. Dans les Figures, les chromosomes propres à *P. subterraneus* sont indiqués par la lettre s et ceux caractéristiques de *P. multiplex*, par la lettre m.

Des croisements de retour et *inter se* sont actuellement tentés avec les hybrides obtenus. Lorsqu'ils seront sacrifiés, les ♂♂ permettront une étude approfondie de la méiose qui n'a été observée que sur des «squashes» de testicules, ce qui n'a pas permis de relever des stades postérieurs à la formation de chaînes de polyvalents. Jusqu'à ce jour, 2 jeunes sont nés de croisements de retour, l'un entre un *P. hybride* ♀ $2N = 50$ et un *P. multiplex* ♂ $2N = 48$ et l'autre entre un *P. hybride* ♀ $2N = 51$ et un *P. subterraneus* ♂ $2N = 54$. Si le premier est mort avant le sevrage, le second semble parfaitement viable; son caryotype sera étudié ultérieurement. Ces résultats encore fragmentaires prouvent que les hybrides interspécifiques *P. subterraneus* \times *P. multiplex* ne sont pas entièrement stériles, malgré leur garniture chromosomique très hétérogène. Les 2 espèces *P. subterraneus* et *P. multiplex*, dont les caryotypes ne peuvent être reliés par des réarrangements chromosomiques simples, doivent

cependant résulter d'une spéciation récente, comme c'est le cas pour les deux «formes» de *Rattus rattus*²⁰.

Bien que *P. duodecimcostatus* soit très différent des deux autres espèces étudiées aussi bien par sa morphologie que par son caryotype, j'ai formé durant plus d'une année une vingtaine de couples entre ce campagnol provençal et *P. subterraneus* $2N = 52$ ou *P. multiplex*. A plusieurs reprises, des accouplements ont été notés. Aucune mise bas ayant été observée, tous les animaux consacrés à cet essai ont été sacrifiés et disséqués. La plupart des ♀♀ des couples *P. duodecimcostatus* \times *P. subterraneus* présentaient alors un utérus gonflé et des corps jaunes, indiquant qu'une fécondation avait eu lieu. Par contre, les ♀♀ des couples *P. duodecimcostatus* \times *P. multiplex* avaient toutes conservé un utérus juvénile, sauf deux. L'une présentait dans la corne utérine gauche une masse cellulaire difficilement identifiable (tumeur ou embryon en voie de résorption avancée), l'autre était portante de 2 embryons à terme dont l'un était déjà mort. L'embryon vivant, de sexe ♂, a pu être fixé sans choc colchicinique préalable et des fragments de rate et de foie ont permis de faire quelques préparations. Dans ces dernières, plusieurs métaphases diploïdes ont pu être observées, montrant toutes 55 chromosomes, soit le total des nombres haploïdes des espèces parentales. La sériation des éléments (Figure 5) permet de reconnaître les chromosomes méta- ou subméta-centriques de *P. multiplex* (m) et de *P. duodecimcostatus* (d). Ces preuves de fécondation et d'embryogenèse lors de croisements entre *P. duodecimcostatus* et *P. subterraneus* ou *P. multiplex* prouvent que, bien que très éloignées, ces espèces sont encore partiellement interfécondes.

Ces quelques essais de croisements entre 3 espèces de *Pitomys* permettent de définir leurs relations évolutives. *P. subterraneus* et *P. multiplex* doivent appartenir à un même groupe dont la différenciation spécifique est récente. Par contre, *P. duodecimcostatus* se rattache à un groupe distinct, dont la séparation est vraisemblablement antérieure à la diversification des 2 autres espèces. Ce n'est que par une extension de semblables essais d'hybridation, par une analyse plus fine des caractéristiques des divers caryotypes et une meilleure connaissance de la répartition des espèces actuelles qu'un tableau évolutif des *Pitomys* européens pourra valablement être établi²¹.

²⁰ T. H. YOSIDA, H. KATO, K. TSUCHIYA et K. MORIWAKI, *Chromosoma* 34, 40 (1971).

²¹ Travail bénéficiant du subside No. 5263/3 du Fonds national suisse de la Recherche scientifique.

Summary. The Robertsonian polymorphism of *Pitymys subterraneus* involves only 1 pair of metacentric autosomes. The crosses of forms with 52, 53 and 54 chromosomes do not show any differences in their reproductive rate. So a single autosome trivalent does not affect the fecundity. Many hybrids have been obtained between *P. subterraneus* ($2N = 52$ or 54) and *P. multiplex* ($2N = 48$) with 50 or 51 chromosomes, respectively. Even with a heterogenous karyotype they are not entirely sterile. 2 progeny were produced from back-crosses. The 2 parental species seem to result from recent speciation. Only

fecundation or embryogenesis occurs in crossing *P. duodecimcostatus* with *P. subterraneus* or *P. multiplex*. The chromosome complement of 1 hybrid embryo of *P. duodecimcostatus* ($2N = 62$) \times *P. multiplex* ($2N = 48$) has been studied showing 55 chromosomes. *P. duodecimcostatus* appears to belong to a more distant evolutionary group.

A. MEYLAN

Service de Zoologie des Vertébrés
Station fédérale de Recherches agronomiques,
CH-1260 Nyon (Suisse), 14 juin 1972.

Zikadenendosymbiose: Eucyten-Struktur-, -Funktions- und -Evolutions-Modell

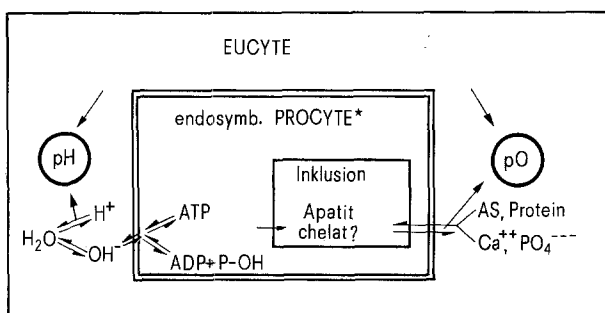
Über die Entstehung der Eucyten gibt es heute eine weitgehend akzeptierte Theorie¹: Amöboide, heterotrophe, anaerobe Procyten sollen vor ca. 1000 Mill. Jahren zuerst bakterioide, dann blualgenartige, autotrophe, aerobe Procyten aufgenommen und eingebaut haben. Aus den algenartigen Mikroorganismen entwickelten sich so die Plastiden, aus den bakteroiden die Mitochondrien. Beide Eucytenorganellen stellen nach dieser Theorie heute extrem adaptierte Endosymbionten dar.

Zikaden weisen ebenfalls extrem angepasste, allerdings jüngere, bakterioide Endosymbionten auf². Sogenannte Hauptsymbionten wurden aller Wahrscheinlichkeit nach bereits von Zellen der Hemipterenstammform vor ca. 500 Mill. Jahren, sogenannte Nebensymbionten von solchen der Zikadenstammformen vor ca. 250 Mill. Jahren phagocytiert und integriert³. Haupt- und Nebensymbionten können als Vertreter einer besonderen Mikroorganismen-Gruppe, der sogenannten «Protoplastoiden», aufgefasst werden⁴. Später gingen die Zikaden noch Begleitsymbiosen mit Rickettsien und dann mit klassischen Bakterien ein².

Die Mitochondrien sowie die protoplastoiden, rickettsien- und bakterienartigen Zikadenendosymbionten weisen gemäss ihrem mutmasslichen Entstehungsalter einen unterschiedlichen Abhängigkeitsgrad von der Eucyte auf⁵. Die Mitochondrien sind permanent, Protoplastoiden und Rickettsien mit kurzen Unterbrechungen z.B. zur Eiinfektion und Bakterien mehr oder weniger nur temporär an die Eucyte gebunden. Mitochondrien lassen sich folglich in vitro nicht, Protoplastoiden und Rickettsien in der Regel in Gewebekulturmедien unter Zusatz gewisser Zellmetabolite begrenzt (Methode siehe^{5,6}) und Bakterien unbegrenzt kultivieren. Die Bakterien können als

auto-, Protoplastoiden und Rickettsien als semiauto- und Mitochondrien als xenoreproduktiv bezeichnet werden. Die Bakterien weisen ein DNA-Molekulargewicht ab ca. 10^{10} dalton, Rickettsien von ca. 10^9 , Protoplastoiden nach vorläufigen, allerdings unzureichenden Schätzungen an ultradünnen Schnitten von wahrscheinlich ca. 10^8 und Mitochondrien von ca. 10^7 auf. So codiert das Bakterien-Genom die Enzyme von Krebszyklus und Atmungskette vollständig, das der Mitochondrien liefert jedoch in keinem der beiden Fälle die komplette Enzymsausstattung. Rickettsien und Protoplastoiden sind auf Grund ihres in vitro-Verhaltens wohl zwischen Bakterien und Mitochondrien einzuordnen, d.h. ihr Genom codiert möglicherweise nur die Enzyme für den Krebszyklus vollständig.

Mitochondrien und Protoplastoiden stehen sich nach mutmasslichem Alter, Art und Abhängigkeitsgrad von der Eucyte folglich am nächsten. Sie verhalten sich physiologisch ähnlich. Beide vermögen den pH der Eucyte gezielt zu beeinflussen^{7,8}. Im symbiontenfrei gemachten Zikadenei des Invasionsstadiums wurde z. B. nach einer bereits publizierten Methode⁶ eine pH-Senkung von $7,5 \pm 0,2$ auf $7,0 \pm 0,2$ festgestellt. Die pH-Veränderung sollte direkt oder indirekt im Zusammenhang mit dem Symbiontenverlust stehen. Der Regulationsmechanismus verläuft möglicherweise nach der unter anderem auch auf die Mitochondrien anwendbaren chemiosmotischen Theorie⁹ (s. Figur). Danach spalten transfore ATPasen der inneren Membran der Mitochondrien aus ihrem Plasma herangeführte ATP unter Aufnahme je eines OH^- aus dem Eucytenplasma, das dadurch angesäuert wird. Das Ausmass der protonenbewegenden Potentialdifferenz entspricht mit 250 mV der theoretischen Erwartung. Der Vorgang ist reversibel. Mitochondrien und Protoplastoiden beeinflussen ebenfalls das Ionen- bzw. Molekülmilieu und damit den osmotischen Druck (pO) der Eucyte^{7,8}. Im symbiontenfreien Zikadenei des obigen Stadiums tritt z. B. eine nach der schon veröffentlichten Methode⁶ ermittelte, direkt oder indirekt durch den Endo-



Hypothetisches Schema des Mechanismus der pH- und pO-Regulation durch Mitochondrien bzw. protoplastoide Endosymbionten in der Eucyte. *Die intrazelluläre Form der symbiontischen Protoplastoiden besitzt 3 Membranen. AS = Aminosäuren.

¹ L. MARGULIS, Science 225, 48 (1971).

² P. BUCHNER, Endosymbiose der Tiere mit pflanzlichen Mikroorganismen (Birkhäuser, Basel und Stuttgart 1953).

³ W. SCHWEMMLER, Naturw. Rdsch., Braunsch. 25, 350 (1972).

⁴ W. SCHWEMMLER, Cytobiologie 3, 427 (1971).

⁵ W. SCHWEMMLER, Dissertation, Universität Freiburg 1972.

⁶ W. SCHWEMMLER, J.-M. QUIOT und A. AMARGIER, Anns Soc. ent. Fr. 7, 423 (1971).

⁷ K. MENGEL, in Die Zelle: Struktur und Funktion (Ed. H. METZNER; Wiss. Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 2. Aufl. 1971).

⁸ W. SCHWEMMLER, J.-L. DUTHOIT, G. KUHE und C. VAGO, Z. Morph. Oekol. Tiere, im Druck (1972).

⁹ P. MITCHELL und J. MOYLE, Europ. J. Biochem. 7, 471 (1969).