
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

ANGELA ROCCHI BRASIELLO

Studio dell'incorporazione della timidina-[H³] durante la spermatogenesi di *Asellus coxalis*(

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 42 (1967), n.2, p. 264-268.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1967_8_42_2_264_0>

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

Citologia. — *Studio dell'incorporazione della timidina-[H³] durante la spermatogenesi di Asellus coxalis* (*). Nota di ANGELA ROCCHI BRASIELLO, presentata (**) dal Socio G. MONTALENTI.

SUMMARY. — The incorporation of [³H]-thymidine in the testes of *Asellus coxalis* (Crust. Isop.) has been studied by means of autoradiography: DNA synthesis was observed in spermatogonia and probably in primary spermatocytes. The time course of the labeling from primary spermatocytes to the spermatozoa occupies about 12 days. Some nutritive cells incorporate very rapidly [³H]-thymidine and remain labeled with the same intensity from 30 minutes to 14 days after injection.

Le tecniche autoradiografiche sono state usate da molti autori per stabilire la durata dell'intero ciclo spermatogenetico e delle singole fasi cellulari di varie specie di animali; infatti l'uso di un precursore radioattivo che venga incorporato nel DNA delle cellule germinali del testicolo, negli stadi premeiotici, permette di seguire queste dallo stadio di incorporazione a quello di spermatozoo maturo.

Chandley e Bateman (1962) e Olivieri e Oliveri (1965) hanno condotto una ricerca di questo genere su *Drosophila melanogaster*; Muckenthaler (1964) su una cavalletta *Melanoplus differentialis*, Meusy (1964) su un crostaceo anfipode *Orchestia gammarella* e Monesi (1962) sul topo. Da queste ricerche ed altre ancora si rileva una diversa durata del ciclo spermatogenetico, cioè del tempo che intercorre perché dallo spermatogonio I si arrivi a spermio maturo, nelle varie specie di animali. Questa va da dieci giorni per la *Drosophila* a venti per la *Orchestia*, a ventotto per l'ortottero *Melanoplus differentialis* fino ai trentaquattro e mezzo richiesti per il topo.

Nel quadro di alcune ricerche condotte su un crostaceo isopode *Asellus (Proasellus) coxalis* per studiare la funzione metabolica delle grosse cellule nutrici che si trovano nel testicolo, abbiamo ritenuto interessante studiare il metabolismo del DNA in questa specie cercando anche di definire la durata del ciclo spermatogenetico.

L'assetto cromosomico di questa specie è stato recentemente descritto (Montalenti e Rocchi, 1964).

MATERIALI E METODI.

Per i nostri esperimenti abbiamo usato individui maschi di *Asellus coxalis*, presi in natura, di grandezza media intorno ai 7 mm e quindi di età media, poiché, come si sa, essi crescono di mole ad ogni muta per tutto il corso della

(*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Genetica della Università di Roma, presso il Centro di Fisiogenetica del C.N.R.

(**) Nella seduta dell'11 febbraio 1967.

vita in modo tale che gli individui di maggior mole sono anche i più vecchi. A questi maschi è stata iniettata con una micropipetta una goccia di soluzione fisiologica preparata tenendo presente la composizione inorganica del sangue di *Procambarus clarkii* (Florkin, 1960) diluita a metà, nella quale era disciolto il radioisotopo (timidina-[H³] ad attività specifica 1,9 c/mM, alla concentrazione di 250 µc/ml).

L'iniezione è stata fatta dorso-lateralmente nell'intento di non ledere il sistema nervoso che si trova dalla parte ventrale e così gli epatopancreas e l'intestino. Dopo l'iniezione gli individui sono stati rimessi in acqua, tenuti a temperatura costante, e quindi sacrificati a vari intervalli di tempo a cominciare da mezz'ora dopo l'iniezione fino a quattordici giorni dopo.

I testicoli di *Asellus* sono due organi simmetrici dorsali ciascuno formato da tre lobi che sboccano a varie altezze in un deferente, il quale termina nell'ultimo segmento toracico. Essi sono stati estratti e fissati per 24 ore in Bouin quindi inclusi in paraffina e tagliati a 5 µ di spessore. I preparati sono stati ricoperti con emulsione NTB2 Kodak e lasciati al buio a 4° C per quattro settimane. Al termine dell'esposizione sono stati trattati con sviluppatore D-19 Kodak a 17° per quattro minuti, sciacquati in acqua di fonte e tenuti per otto minuti in Acidofix Kodak sempre a 17°. A questo punto i preparati sono stati colorati con Emallume di Mayer.

Sono stati condotti tre esperimenti nei quali sono stati esaminati complessivamente circa 100 individui.

RISULTATI.

Tutti gli autori sono concordi nell'affermare che il radioisotopo iniettato rimane a disposizione delle cellule per essere incorporato, soltanto per poche ore dalla somministrazione, perciò è molto interessante osservare quali sono gli stadi cellulari che risultano marcati in questo periodo e che quindi incorporano direttamente il precursore radioattivo. Nell'asello, come del resto in *Drosophila* e in molte altre specie di animali, non è facile distinguere gli spermatogoni primari dai secondari e identificare con certezza gli spermatoцитi I intercinetici. Ma, mentre nella drosophila per valutare lo stadio e l'età di queste cellule ci si può riferire alla loro posizione nel testicolo e al numero in cui sono presenti allo stesso stadio nella stessa cisti, in asello questo non è possibile, perché, se gli spermatogoni primari sono sempre disposti alla base dei follicoli, man mano che procede la maturazione le cellule vengono spinte nel centro dei follicoli senza per altro creare una seriazione. È possibile comunque che in futuro si possa giungere a queste identificazioni.

Dopo 30' dall'iniezione di timidina-[H³] i goni cominciano a mostrare una leggera marcatura nucleare; dopo 1 ora la marcatura goniale è notevole. Dopo 24 ore appare marcata la precocissima profase meiotica, queste cellule procedendo nella maturazione giungono al 4° giorno dall'iniezione allo stadio di pachitene, infatti dopo 4 giorni si trovano marcate tutte le cellule che si trovano in questo stadio. Questa fase deve durare molto a lungo poiché la

si osserva in più della metà dei testicoli e la si trova marcata fino a otto giorni dall'iniezione. Dopo 10 giorni si trovano marcati gli spermatidi più giovani, l'undicesimo giorno gli spermatidi marcati posseggono già un abbozzo di coda e lo stesso giorno cominciano a comparire alcuni spermatozoi marcati. Dopo 14 giorni si trovano ancora spermatidi all'ultimo stadio e spermatozoi marcati.

Sin dalla prima mezz'ora, si notano alcune delle grosse cellule nutrici marcate, questa marcatura si continua ad osservare in quasi tutti i testicoli fino a quattordici giorni e dal principio alla fine si mantiene di intensità quasi costante.

Nella Tabella I si può vedere uno schema di quanto sopra è riportato.

TABELLA I.

GIORNI DOPO L'INIEZIONE		1	4	6	8	10	11	12	14
Stadio	Spermatogoni Spermatociti?	Spermatociti I inizio pro- fase		pachitene		Sper- matidi	Spermatidi e Spermatozoi		

DISCUSSIONE.

È ormai acquisizione comune che le cellule della spermatogenesi che sintetizzano direttamente DNA, oltre agli spermatogoni, sono gli spermatociti I. Nel topo (Monesi, 1962) 2 ore dopo l'iniezione di timidina- $[H^3]$ si trovano marcati molti nuclei in precoce leptotene. In *Melanoplus differentialis* (Muckenthaler, 1964) le cellule in periodo sintetico premeiotico sono marcate dopo circa 4 ore. In drosfila invece (Olivieri e Olivieri, 1965) si sono potuti osservare in pochi casi gli spermatociti più giovani marcati solo dopo 8 ore dall'iniezione mentre nelle primissime ore, cioè quando si suppone che sia a disposizione la maggior parte del precursore marcato non si è notata incorporazione da parte di questo stadio cellulare.

Per quanto riguarda l'asello, noi osserviamo i primi spermatociti marcati 24 ore dopo l'iniezione, essi sono però già in precoce profase meiotica, siamo perciò propensi a credere che essi non derivino da spermatogoni che hanno precedentemente metabolizzato il precursore marcato ma che abbiano essi stessi sintetizzato DNA. Questo punto potrà essere chiarito quando si potranno riconoscere con assoluta certezza gli spermatociti I intercinetici.

Meusy (1964) nel suo lavoro su *Orchestia gammarella*, crostaceo anfipode, non è molto chiaro su questo punto affermando che «...l'incorporation a lieu *au plus tard* dans les noyaux des spermatogonies II à la fin de

la phase 4, puisque ces cellules entrent en prophase de méiose dès la phase suivante et que l'incorporation n'a plus lieu au-delà du stade préleptotène ». Ci sembra che ciò non sia molto chiaro a meno che l'autore non chiami spermatogonio II quello che è già uno spermatocita I intercinetico.

Comunque ammesso nel nostro caso che gli spermatociti I incorporino direttamente la timidina-[H³] e cioè che sintetizzino DNA possiamo cercare di fare una misurazione della lunghezza almeno di una parte del ciclo spermatogenetico.

Abbiamo visto che a 11 giorni dall'iniezione cominciano a comparire i primi spermatozoi marcati, a 12 giorni lo sono ormai tutti. Possiamo quindi dire che dallo stadio di spermatocita I a quello di spermatozoo intercorre una media di 12 giorni. Da questa valutazione è esclusa la durata delle divisioni goniali che precedono la comparsa dello spermatocita I. La fase di pachitene è certamente molto lunga, come abbiamo osservato, in quanto appare marcata per 4 giorni consecutivi dal 4° all'8° giorno dall'iniezione. Dall'8° al 10° giorno si passa dal pachitene agli spermatidi marcati. Dal 10° al 14° giorno sono presenti sia spermatidi che spermatozoi marcati. Le nostre osservazioni non vanno oltre il 14° giorno.

Per quanto riguarda le cellule nutrici il fatto che un piccolo numero di esse si trovi marcato e che la loro marcatura non diminuisca di intensità dopo 14 giorni ci fa pensare o che esse subiscano dei processi di endoreduplicazione o forse che si dividano, sebbene molto raramente.

BIBLIOGRAFIA.

- CHANDLEY A. C. e BATEMAN J. A., *Timing of spermatogenesis of Drosophila melanogaster using thymidine*, « Nature », 193, 299-300 (1962).
- FLORKIN M., *Blood Chemistry - The Physiology of Crustacea*, ed. by Talbot H. Waterman, Academic Press. New York and London, 1, 141-159 (1960).
- MEUSY J. J., *Détermination de la durée de la spermatogénèse de Orchestia gammarella Pallas, crustacé amphipode, par injection de thymidine tritiée et autoradiographie*, « Arch. d'Anat. microsc. et de Morph. exp. », 53, 253-260 (1964).
- MONESI V., *Autoradiographic study of DNA synthesis and the cell cycle in spermatogonia and spermatocytes of mouse testis using tritiated thymidine*, « Jour. of Cell Biol. », 14, 1-18 (1962).
- MONTALENTI G. e ROCCHI A., *Il corredo cromosomico di Asellus coxalis (Crust. Isop.)*, « Rend. Accad. Naz. dei Lincei », 36, 443-445 (1964).
- MUCKENTHALER F. A., *Autoradiographic study on nucleic acid synthesis during spermatogenesis in the grasshopper Melanoplus differentialis*, « Exp. Cell Res. », 35, 531-547 (1964).
- OLIVIERI G. e OLIVIERI A., *Autoradiographic study of nucleic acid synthesis during spermatogenesis in Drosophila melanogaster*, « Mut. Res. », 2, 366-380 (1965).

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA I

- Fig. 1. - *Asellus coxalis*, testicolo fissato 2 h dopo l'iniezione di timidina-[H³]. La marcatura interessa le cellule goniali della base testicolare. × 1.400.
- Fig. 2. - *A. coxalis*, testicolo fissato 7 h dopo l'iniezione di timidina-[H³]. Le cellule nutrici mostrano una buona marcatura. × 1.400.
- Fig. 3. - *A. coxalis*, testicolo fissato 6 gg. dopo l'iniezione di timidina-[H³]. Tutti gli spermatozoi allo stadio di pachitene sono marcati. × 1.400.
- Fig. 4. - *A. coxalis*, testicolo fissato 12 gg. dopo l'iniezione di timidina-[H³]. La marcatura interessa gli spermatidi. × 1.400.
- Fig. 5. - *A. coxalis*, testicolo fissato 12 gg. dopo l'iniezione di timidina-[H³]. Le cellule nutrici mantengono invariata la loro marcatura. × 1.400.
- Fig. 6. - *A. coxalis*, testicolo fissato 14 gg. dopo l'iniezione di timidina-[H³]. Compaiono i primi spermatozoi maturi marcati. × 1.400.