
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

GIAN ANTONIO DANIELI, EMANUELE RODINÒ

Incubazione in vitro con Timidina H³ di ghiandole salivari di *Drosophila hydei* St. (Diptera), isolate a vari stadi di sviluppo

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 44 (1968), n.1, p. 123–126.

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1968_8_44_1_123_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/>

Biologia. — *Incubazione in vitro con Timidina H³ di ghiandole salivari di Drosophila hydei St. (Diptera), isolate a vari stadi di sviluppo* (*). Nota di GIAN ANTONIO DANIELI e EMANUELE RODINÒ, presentata(**) dal Socio G. MONTALENTI.

SUMMARY. — The pattern of H³ Thymidine incorporation in different stages of larval development was investigated by short term incubation of *Drosophila hydei* salivary glands *in vitro*.

There is new evidence for cellular synchronization in DNA synthesis just after the second moult.

Some aspects in the study of the polytene cell cycle are discussed.

Negli anni recenti, l'applicazione della tecnica autoradiografica ha portato notevoli risultati nello studio del metabolismo cellulare. In particolare, l'autoradiografia dopo incorporazione di precursori radioattivi specifici degli acidi nucleici ha consentito di chiarire importanti aspetti del ciclo cellulare (Defendi e Manson [1]) e del metabolismo del DNA (Taylor et al. [2]) e dell'RNA (Clever [3]). Questa tecnica è stata applicata più volte anche per indagini sulla struttura molecolare del cromosoma, adottando come materiale sperimentale i cromosomi salivari delle larve di Ditteri (Swift [4]). Alcuni di questi lavori sono stati eseguiti con incorporazione *in vivo* dei precursori radioattivi, altri, invece, con tecniche di incubazione *in vitro* di ghiandole salivari isolate.

Plaut e Nash [5] hanno riscontrato che, in incubazioni *in vitro* di 15' con timidina tritiata, la percentuale di cellule marcate per ghiandola è molto variabile da preparato a preparato (da 40 a 70%). Tale variabilità è stata attribuita da questi Autori a fattori non ancora determinati.

Nel nostro esperimento abbiamo voluto studiare le conseguenze di incubazioni *in vitro* di ghiandole salivari isolate a diversi stadi di sviluppo, nella speranza di poter dare un quadro abbastanza preciso del comportamento dell'organo in queste condizioni e di accertare le cause della variabilità dei risultati cui si è accennato sopra.

Per l'esperimento sono state usate larve di *Drosophila hydei St.* (wild stock). Da una coltura sincrona venivano prelevati gruppi di larve coetanee, in tempi successivi dello sviluppo, a partire dalla fine del secondo stadio larvale fino all'inizio del periodo prepupale. Le larve venivano dissezionate in soluzione di Ringer, ciascun paio di ghiandole veniva immediatamente trasferito in 0,1 ml del mezzo di incubazione costituito da timidina tritiata

(*) Ricerca compiuta presso l'Istituto di Zoologia, Anatomia Comparata e Genetica dell'Università di Padova, con un contributo del C.N.R. (Contratto 115/0263/11222) assegnato al prof. Bruno Battaglia.

(**) Nella seduta del 13 gennaio 1968.

(New England Nu. Co., att. sp. $2\text{C}/\text{mM}$), sciolta in medium di Schneider per *Drosophila* (G.I.B.Co.) alla concentrazione finale di $10\ \mu\text{C}/\text{ml}$. Tutte le operazioni sono state eseguite in condizioni di sterilità. Per ognuno degli stadi studiati sono state eseguite varie repliche. Dopo $15'$ di incubazione il mezzo radioattivo veniva allontanato e sostituito con $0,2\ \text{ml}$ di soluzione di Ringer contenente timidina non radioattiva in eccesso ($8\ \text{mgr}/\text{ml}$) onde bloccare ogni ulteriore incorporazione di radioattività. Questo lavaggio veniva ripetuto per tre volte consecutive. Le ghiandole venivano poi prefissate in una goccia di alcool etilico 95° ed acido acetico glaciale (3 : 1) e successivamente schiacciate in acido acetico 45% . I preparati venivano congelati su ghiaccio secco e, dopo l'asportazione del coprioggetto, disidratati in alcool etilico assoluto per $5'$ e fatti poi asciugare all'aria. Sono stati quindi conservati al riparo della polvere fino al momento in cui sono state eseguite le autoradiografie su tutta la serie dei preparati, secondo la tecnica descritta da Prescott [6].

Tra i preparati, sono stati scelti per il conteggio soltanto quelli che non presentavano lacerazioni o perdita di materiale dovuti allo schiacciamento; su di essi, l'attività di sintesi di DNA della ghiandola è stata valutata contando la percentuale di nuclei che, avendo incorporato il precursore, apparivano marcati. L'omogeneità dei dati ottenuti da ciascuna serie sperimentale è stata controllata calcolando gli errori standard delle medie.

I risultati sono espressi nella Tabella e nel grafico.

TABELLA I.

Percentuale di cellule in sintesi di DNA, nella ghiandola salivare di Drosophila hydei, a diversi stadi dello sviluppo larvale.

Ore dalla ovoposizione	N° di preparati	Percentuale media di nuclei marcati	Errore st. della media
93	3	67.74	± 1.32
105	5	22.44	± 2.60
117	5	27.23	± 3.04
129	3	73.96	± 5.83
141	6	64.79	± 1.96
153	4	55.34	± 2.90
165	9	27.93	± 2.33
177	8	8.56	± 1.56
189	6	3.53	± 1.39

Appare evidente che, in tempi diversi dello sviluppo, la ghiandola salivare dimostra un comportamento differenziale per quanto riguarda la sintesi di DNA. Infatti, mentre alla fine del secondo stadio larvale essa si può considerare praticamente tutta in sintesi, nel momento precedente la muta il numero di cellule in sintesi diminuisce bruscamente.

Subito dopo la muta, tuttavia, la percentuale di cellule che sintetizzano aumenta progressivamente fino a raggiungere un valore molto simile a quello iniziale; a questa fase fa poi seguito una diminuzione graduale del numero di cellule marcate, tanto che, all'inizio della prepupa, solo una percentuale bassissima di cellule (circa il 3%) sta ancora sintetizzando DNA

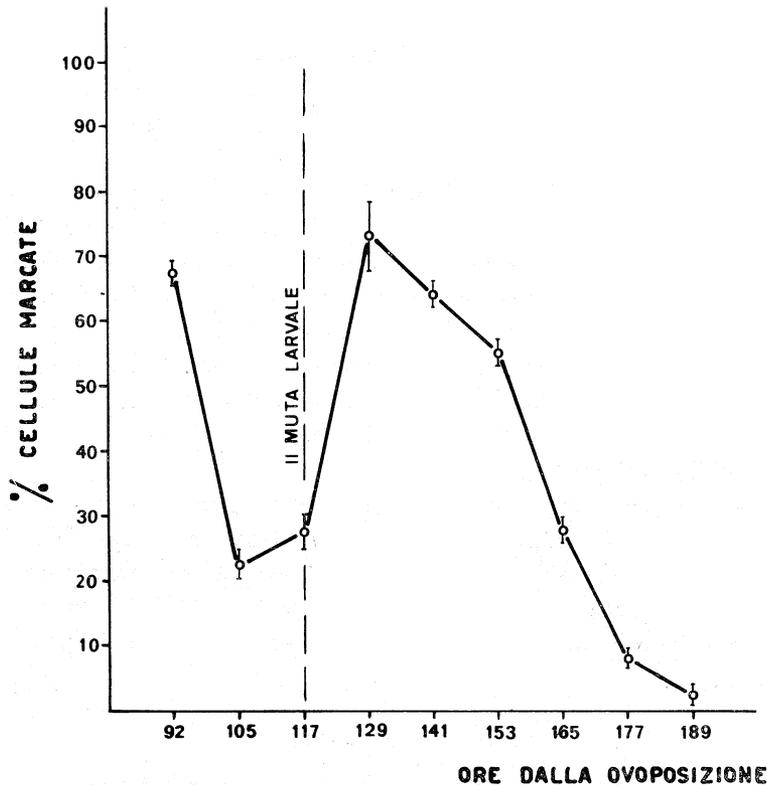


Fig. 1 - Sintesi di DNA nella ghiandola salivare di *Drosophila hydei* a stadi successivi dello sviluppo larvale, valutata come percentuale media di cellule marcate per ghiandola, dopo incubazione con timidina tritiata.

Questa discontinuità nel comportamento della ghiandola era stata messa in luce in una nostra precedente ricerca eseguita somministrando il precursore radioattivo attraverso il cibo, secondo uno schema di esperimento analogo a quello testé descritto [7]. Era stata avanzata l'ipotesi che tale comportamento fosse imputabile ad una sincronizzazione delle cellule della ghiandola: esse passerebbero tutte dalla condizione di attività, caratteristica della fine del secondo stadio, ad una condizione di riposo, e riprenderebbero a sintetizzare, in un breve intervallo di tempo, all'inizio del terzo stadio.

Nonostante ci fossero prove della opportunità e della liceità del programma sperimentale seguito (Lee [8]), rimanevano tuttavia alcuni interrogativi sulla reale portata dei risultati ottenuti, data la lunga durata dell'incubazione (8 ore) adottata nell'esperimento *in vivo*. La conferma ottenuta con il presente

esperimento ci permette di affermare che all'inizio del terzo stadio larvale praticamente tutte le cellule della ghiandola cominciano a sintetizzare DNA; questo fatto è particolarmente interessante perché, proprio nello stesso periodo i nuclei delle cellule, partendo da valori di ploidia pari a $4n$ e $5n$, raggiungono valori superiori distribuendosi in numerose classi di politenia, in modo tale che, alla fine dello sviluppo larvale, è possibile riconoscere nell'organo un gradiente di politenia, diretto secondo l'asse maggiore della ghiandola (Rodman [9]).

Il fatto che cellule tra loro uguali e di comune derivazione embriologica inizino contemporaneamente a sintetizzare e si arrestino poi a livelli diversi di contenuto di DNA, suggerisce la possibilità che esistano delle alterazioni del ciclo cellulare.

Nell'ipotesi che le cellule politeniche avessero cicli regolari e in accordo con i concetti-base di analoghi esperimenti compiuti su colture di cellule, Plaut e Nash [5] avevano calcolato la durata della fase di sintesi S dai dati ottenuti contando il numero di cellule marcate su autoradiografie di ghiandole salivari incubate *in vitro* con timidina radioattiva. È noto infatti che, in tali condizioni sperimentali, in una popolazione asincrona la percentuale di cellule che assumono il precursore radioattivo in un breve intervallo di tempo, è proporzionale alla durata della fase di sintesi di DNA rispetto alla durata dell'intero ciclo cellulare.

Il nostro esperimento, dimostrando che la popolazione cellulare della ghiandola salivare si comporta in modo sincrono nell'inizio della sintesi di DNA, indica che il calcolo della durata di S deve essere affrontato per altra via e che, d'altra parte, non si può scartare a priori l'ipotesi che i cicli cellulari di queste cellule politeniche possano essere irregolari o perturbati da qualche fattore esterno.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] DEFENDI V. e MANSON L. A., *Analysis of the cell cycle in mammalian cells*, « Nature », 189, 359-361 (1963).
- [2] TAYLOR J. H. et al., *The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium labeled thymidine*, « Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. », 43, 122-138 (1957).
- [3] CLEVER U., *Induction and repression of a puff in Chironomus tentans*, « Dev. Biol. », 14, 421-458 (1966).
- [4] SWIFT H., *Molecular morphology of the chromosome*. In « *The chromosome; structural and functional aspects* », Tissue culture association, Inc., Miami 1965.
- [5] PLAUT W. e NASH D., *Localized DNA synthesis in polytene chromosomes and its implications*, in « *The role of chromosomes in development* », M. Locke (ed.), Academic Press Inc., New York 1964.
- [6] PRESCOTT D. M., *Autoradiography with liquid emulsion*, in « *Methods in cell physiology* », D. M. Prescott (ed.), Academic Press Inc., New York 1964.
- [7] DANIELI G. A. e RODINÒ E., *Larval moulting cycle and the DNA synthesis in Drosophila hydei salivary glands*, « Nature », 213, 424-425 (1967).
- [8] LEE M. R., *Feeding radioactive isotopes to specific larval stages of Drosophila melanogaster*, « D.I.S. », 40, 101 (1965).
- [9] RODMAN T. C., *DNA replication in salivary gland nuclei of Drosophila melanogaster at successive larval and prepupal stages*, « Genetics », 55, 375-386 (1967).