
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

GIORGIO MANCINO, GIUSEPPINA BARSACCHI, IRMA
NARDI

**Ulteriori ricerche autoradiografiche
sull'incorporazione di H^3 fenilalanina nei lampbrush
chromosomes di Triturus (Anfibi Urodeli)**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 45 (1968), n.3-4, p.
180-184.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1968_8_45_3-4_180_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. — *Ulteriori ricerche autoradiografiche sull'incorporazione di H^3 fenilalanina nei lampbrush chromosomes di Triturus (Anfibi Urodeli)*^(*). Nota^(**) di GIORGIO MANCINO, GIUSEPPINA BARSACCHI e IRMA NARDI, presentata dal Corrisp. M. BENAZZI.

SUMMARY. — The nuclear content isolated from middle and large size oocytes of two species of newts has been incubated in tritiated phenylalanine. The most peculiar structures of lampbrush chromosomes have been observed after autoradiographic technique.

Spheres, globules and every kind of loop appear to be labelled; the tracts of chromosome axis which do not bear any loops, and possibly telomeres and centromeres do not incorporate phenylalanine.

Carrying on such researches, more extensive work will be done in order to characterize specifically the single morphological landmarks, which allow lampbrush chromosomes to be mapped, also on the basis of their functional meaning.

Le moderne metodiche citologiche e biochimiche, tra cui quelle basate sull'impiego di precursori radioattivi dell'RNA e di aminoacidi marcati, hanno permesso di approfondire il significato biosintetico dei *lampbrush chromosomes* degli Anfibi nel corso dell'accrescimento degli ovociti (Davidson *et al.* 1966; Gall 1968; Brown e Dawid 1968; Perkowska *et al.* 1968 e, per altri riferimenti bibliografici, Mancino *et al.* 1968). In particolare, l'uso di aminoacidi marcati ha messo in evidenza che a livello dei nucleoli e dei cromosomi si compiono sintesi proteiche anche in assenza di contaminazioni citoplasmatiche; inoltre l'incorporazione da parte dei nucleoli precede probabilmente quella che avviene lungo i cromosomi (Mancino *et al.* 1968). Ciò si accorda con le osservazioni di Brandt e Finamore (1963), i quali hanno accertato che i nucleoli degli ovociti di rana sono in grado di compiere sintesi proteiche anche quando siano isolati dal succo nucleare.

Nel corso di queste ricerche è chiaramente emersa la possibilità di caratterizzare anche da un punto di vista funzionale alcune tra le principali formazioni che, per la loro morfologia e struttura, rappresentano dei buoni *landmarks* per il riconoscimento dei singoli cromosomi. Abbiamo perciò esteso le ricerche con isotopi ad altre due specie: *Triturus alpestris apuanus* (Bonaparte 1839) e *T. italicus* (Peracca 1898). Nei *lampbrush chromosomes* di *a. apuanus* sono facilmente reperibili, tra le altre strutture, particolari *loops* a matrice densa, talora vacuolizzata (Mancino e Barsacchi, 1965), morfologicamente simili a quelli indicati da Callan e Lloyd (1960) con il nome di «*lumpy objects*». I *lampbrush chromosomes* di *italicus* permettono di seguire

(*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Zoologia e Anatomia Comparata dell'Università di Pisa, col contributo del C.N.R.

(**) Pervenuta all'Accademia il 19 agosto 1968.

il comportamento rispetto agli isotopi dei centromeri, dei telomeri e dei numerosi tratti ispessiti, privi di *loops*, presenti lungo l'asse cromosomico (Mancino e Barsacchi, in preparazione).

Gli esemplari di *Triturus alpestris apuanus* sono stati raccolti a Levigliani (Alpi Apuane) a circa 600 m. sul livello del mare; quelli di *italicus* provenivano da Castelvenere (Benevento).

Le esperienze sono state eseguite su nuclei prelevati da ovociti di medie e grandi dimensioni e ripetutamente lavati per ridurre ogni possibile contaminazione citoplasmatica. Il contenuto nucleare è stato incubato in una soluzione fisiologica (CaCl_2 10^{-4} M in K/NaCl 0,1 M 5 : 1) contenente 0,0357 mc/ml di L-3 *phenyl* (alanine-2,3-T) (attività specifica: 900 mc/mM), prodotta dal Radiochemical Center, Amersham, England. I tempi di incubazione variavano da 2' a 15 hr. Il contenuto nucleare veniva quindi fissato in camere saturate di vapori di formalina al 40% contenente acido acetico glaciale in proporzione di 100 a 1; poichè questo metodo non ha effetto immediato, l'incorporazione è probabilmente proseguita per qualche tempo. I preparati sono stati allestiti secondo la tecnica descritta da Gall e Callan (1962). Abbiamo usato lastre autoradiografiche Kodak AR-10, sviluppo Kodak D 19, fissatore Kodak Unifix. Il tempo di esposizione è stato di circa 20 giorni.

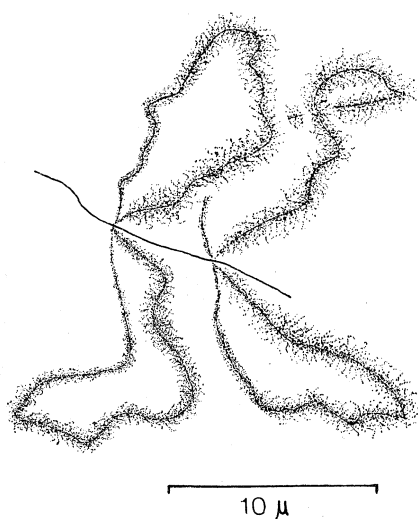


Fig. 1. — *Triturus alpestris apuanus*:
loops a matrice fibrillare.

I risultati ottenuti incubando il solo contenuto nucleare in fenilalanina tritiata sono fondamentalmente simili in *T. alpestris apuanus* e in *T. italicus* e concordano con quelli già illustrati per *T. vulgaris meridionalis* (Mancino *et al.* 1968).

I nucleoli e i cromosomi risultano radioattivi dopo pochi minuti di incubazione; occorre però notare che i tempi di incubazione possono risentire del fatto che la fissazione non è immediata. All'inizio dell'incorporazione, i nucleoli mostrano grani disposti solo in una zona limitata ed eccentrica; con l'aumentare del tempo di incubazione, appaiono uniformemente marcati. Grani di Ag sono presenti su tutti i *loops* di morfologia normale, compresi particolari *loops* che si distinguono sia per le maggiori dimensioni sia per l'aspetto spiccatamente fibrillare della matrice (fig. 1; Tav. I A e C). Anche i *loops* a matrice densa (fig. 2) e quelli costituiti da una sequenza di globuli distanziati lungo l'asse (fig. 3) incorporano H^3 fenilalanina (Tav. I E e G; Tav. II B

e C). Le sfere inserite sui cromosomi e quelle libere nel nucleoplasma sono sempre molto marcate, a differenza di quanto accade dopo l'uso di H^3 uridina (Tav. II D e E): per la loro morfologia e il loro comportamento di fronte

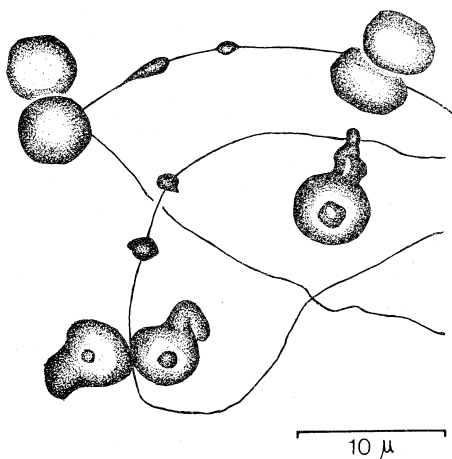


Fig. 2. - *Loops* a matrice densa inseriti sul bivalente I di *Triturus alpestris apuanus*.

H^3 lisina, mentre solo il «BN» incorpora massivamente H^3 uridina dopo 1-3 hr di incubazione. Gli Autori prospettano quindi che i due organuli abbiano funzioni totalmente diverse.

I globuli inseriti sui cromosomi e quelli liberi nel succo nucleare sono in genere marcati. I tratti di asse sprovvisti di *loops*, che indichiamo con il termine di sbarrette, non incorporano H^3 fenilalanina. Non è stato possibile trarre sicure conclusioni sul comportamento dei telomeri e dei centromeri: alcune osservazioni farebbero tuttavia ritenere che queste strutture non incorporino l'aminoacido negli ovociti di medie e grandi dimensioni. Sbarrette, telomeri e centromeri non incorporano nemmeno H^3 uridina (Tav. II F e G; Tav. III A e B).

Questi risultati ed altri non ancora pubblicati rappresentano un primo quadro del comportamento di alcune tra le principali strutture dei *lampbrush chromosomes* delle specie studiate, dopo trattamento con H^3 uridina e H^3 fenilalanina. I dati che si riferiscono all'uridina tritiata erano già stati parzialmente presentati nella nostra nota del 1967, alla quale riman-

agli aminoacidi marcati e ai precursori radioattivi dell'RNA esse ricordano i «*Binnenkörper*», descritti da Bier *et al.* (1967) in ovari panoistici e meroistici di Insetti. Facciamo anche presente che negli ovociti profasici di un altro gruppo di Insetti (Odonati Anisotteri) sono stati notati due nucleoli di diversa grandezza; recentemente Halkka e Halkka (1968) hanno messo in luce che questi nucleoli, indicati con «BN» (= *big nucleolus*) e con «SN» (= *small nucleolus*), hanno un diverso comportamento di fronte al trattamento con radioisotopi: entrambi hanno un identico valore di incorporazione di

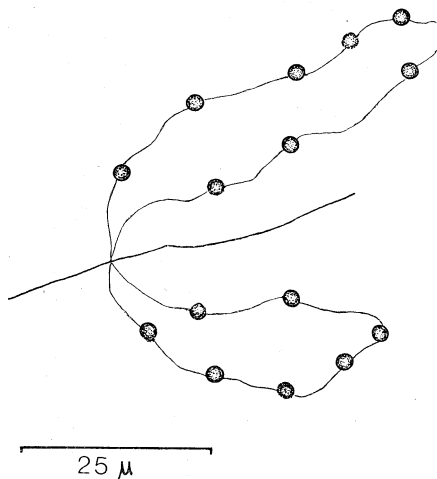


Fig. 3. - *Triturus alpestris apuanus*: *loops* costituiti da una sequenza di globuli disposti lungo l'asse.

diamo anche per le notizie riguardanti le tecniche impiegate; essi verranno illustrati più ampiamente in un lavoro successivo, insieme ai dati riguardanti *T. a. apuanus*. In questa specie, infatti, è stato possibile individuare un diverso comportamento dei vari tipi di *loops* rispetto all'incorporazione di H^3 uridina: dopo incubazione degli ovociti protratta fino a 14 hr i *loops* normali appaiono marcati, mentre i *loops* a matrice fibrillare, densa e globulare non mostrano grani se non in numero limitato (Tav. I B, D e F; Tav. II A). Invece, dopo incubazione del contenuto nucleare in H^3 fenilalanina per brevi tempi (fino a 2 hr), i vari tipi di *loops* risultano ugualmente marcati, e non è quindi possibile mettere in luce differenze nel metabolismo proteico da essi esplicato.

In conclusione, appare possibile caratterizzare i *lampbrush chromosomes* di *Triturus*, oltre che con i consueti metodi citologici che permettono la compilazione delle mappe cromosomiche, anche in base al significato funzionale delle loro principali strutture.

BIBLIOGRAFIA.

- BIER K., KUNZ W. e RIBBERT D., «Chromosoma», 23, 214-254 (1967).
 BRANDT E. E. e FINAMORE F. J., «Biochim. Biophys. Acta», 68, 618-624 (1963).
 BROWN D. D. e DAWID I. B., «Science», 160, 272-280 (1968).
 CALLAN H. G., in: «Intern. Review of Cytology» (Bourne G. H. and Danielli J. F., eds.), Acad. Press Inc., New York, 15, 1-34 (1963).
 CALLAN H. G. e LLOYD L., «Phil. Trans. Roy. Soc.», (London), B. 243, 135-219 (1960).
 DAVIDSON E. H., CRIPPA M., KRAMER F. R. e MIRSKY A. E., «Proc. Natl. Ac. Sci.», 56, 856-863 (1966).
 GALL J. G., «Proc. Natl. Ac. Sci.», 60, 553-560 (1968).
 GALL J. G. e CALLAN H. G., «Proc. Natl. Ac. Sci.», 48, 562-570 (1962).
 HALKKA L. e HALKKA O., «Scand. J. clin. Lab. Invest.», 21, Suppl. 101, 58 (1968).
 MANCINO G. e BARSACCHI G., «Caryologia», 18, 637-665 (1965).
 MANCINO G., BARSACCHI G. e NARDI I., «Boll. Zool.», 34, 134 (1967).
 MANCINO G., BARSACCHI G. e NARDI I., «Atti Acc. Naz. Lincei» (1968, in corso di stampa).
 PERKOWSKA E., MACGREGOR H. C. e BIRNSTIEL M. L., «Nature», 217, 649-650 (1968).

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-III

TAVOLA I.

- A. - Fotografia *in vivo* al contrasto di fase di *loops* a matrice fibrillare. *Triturus alpestris apuanus*, ♀ 8, ovocita di mm. 0,84. 550 ×.
 B. - *Loops* a matrice fibrillare prevalentemente non marcati dopo incubazione dell'ovocita per 14 ore in H^3 uridina. *T. alpestris apuanus*, ♀ 3, ovocita di mm. 0,69. 1320 ×.
 C. - *Loops* a matrice fibrillare marcati dopo incubazione del contenuto nucleare per 2 ore in H^3 fenilalanina. *T. alpestris apuanus*, ♀ P, ovocita di mm. 0,76. 1380 ×.
 D. - *Loops* a matrice densa non marcati o leggermente marcati dopo incubazione dell'ovocita per 14 ore in H^3 uridina. Sono anche evidenti globuli liberi non marcati. *T. alpestris apuanus*, ♀ 3, ovocita di mm. 0,69. 1320 ×.

- E. – *Loops* a matrice densa marcati dopo incubazione del contenuto nucleare per 2 ore in H^3 fenilalanina. *T. alpestris apuanus*, ♀ P, ovocita di mm. 1,00, bivalente I. 1320×.
- F. – *Loops* a matrice densa prevalentemente non marcati dopo incubazione dell'ovocita per 12 ore in H^3 uridina. *T. alpestris apuanus*, ♀ 3, ovocita di mm. 1,03. 1320×.
- G. – *Loops* a matrice densa marcati dopo incubazione del contenuto nucleare per 15 minuti in H^3 fenilalanina. *T. alpestris apuanus*, ♀ P, ovocita di mm. 1,07, bivalente I. 1320×.

TAVOLA II.

- A. – *Loop*, costituito da globuli, non marcato dopo incubazione dell'ovocita per 14 ore in H^3 uridina. *T. alpestris apuanus*, ♀ 3, ovocita di mm. 0,69. 1380×.
- B e C. – *Loops*, costituiti da globuli, marcati dopo incubazione del contenuto nucleare per 2 ore in H^3 fenilalanina, fotografati su due diversi piani: in B sono visibili i grani di Ag, in C è più evidente la struttura globulare dei *loops*. *T. alpestris apuanus*, ♀ P, ovocita di mm. 0,76. 1380×.
- D. – Sfera inserita non marcata dopo incubazione dell'ovocita per 19,30 ore in H^3 uridina. *T. vulgaris meridionalis*, ♀ VII, ovocita di mm. 0,69. 1380×.
- E. – Sfera inserita marcata dopo incubazione per 3 ore del contenuto nucleare in H^3 fenilalanina. *T. vulgaris meridionalis*, ♀ VIII. 1380×.
- F. – Sbarrette sprovviste di *loops* non marcate dopo incubazione dell'ovocita per 19,30 ore in H^3 uridina. *T. vulgaris meridionalis*, ♀ VII, ovocita di mm. 1,15. 1380×.
- G. – Sbarrette sprovviste di *loops* non marcate dopo incubazione del contenuto nucleare per 2 ore in H^3 fenilalanina. *T. alpestris apuanus*, ♀ P, ovocita di mm. 1,00. 1320×.

TAVOLA III.

- A. – Centromeri non marcati, 16 giorni dopo iniezione intracelomica di H^3 uridina. *T. italicus*, ♀ 2a, ovocita di mm. 1,23. 1380×.
- B. – Centromeri non marcati dopo incubazione del contenuto nucleare per 2 ore in H^3 fenilalanina. *T. italicus*, ♀ 2b, ovocita di mm. 0,92. 1380×.

