

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

# RENDICONTI

---

GIORGIO MANCINO, GIUSEPPINA BARSACCHI, IRMA  
NARDI

## **Effetti della actinomicina D tritiata sui 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.6, p. 591–596.*  
Accademia Nazionale dei Lincei

<[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1968\\_8\\_45\\_6\\_591\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1968_8_45_6_591_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.** — *Effetti della actinomicina D tritiata sui lampbrush chromosomes di Triturus (Anfibi Urodeli)* (\*). Nota di GIORGIO MANCINO, GIUSEPPINA BARSACCHI e IRMA NARDI, presentata (\*\*) dal Corrisp. M. BENAZZI.

SUMMARY. — Some experiments have been carried out in order to establish the effects on *Triturus* lampbrush chromosomes after treatment with H<sup>3</sup> actinomycin D following two methods:

1) By incubating intact oocytes in the antibiotic, all the normal loops, which represent the overwhelming majority of the loops, gradually collapse into the chromomeres: these loops represent active sites in RNA synthesis. Some loops with dense, granular and fibrillar matrix (for instance the dense loops of *T. alpestris apuanus* chromosome I and the sub-terminal granular loops of chromosome XI) are not so sensitive to actinomycin D; in fact they undergo only a light retraction even after a very prolonged incubation: these loops are the same which in medium and large size oocytes show a lower level of incorporation of H<sup>3</sup> uridine. Spheres, which perform no RNA synthesis but only protein synthesis, do not retract nor decrease in size even after several hours of incubation. The autoradiographic technique has revealed appreciable radioactivity on lampbrush chromosomes and nucleoli: this indicates that the retraction of the loops can be correlated with the binding of the antibiotic with the chromosomal DNA.

2) By incubating the nuclear content alone, no loop collapses and the morphology of lampbrush chromosomes appears to be unaffected. However radioactivity is clearly evident on chromosomes and nucleoli: therefore the retraction of the loops is probably also connected to the vitality and integrity of oocytes.

#### INTRODUZIONE.

L'azione dell'actinomicina D è principalmente quella di privare le cellule dell'informazione genetica contenuta nei nuclei: l'antibiotico impedisce infatti la sintesi dell'RNA DNA-dipendente combinandosi con il DNA ed inibendo l'azione della RNA-polimerasi. Ciò è stato verificato sperimentalmente nei DNA-virus, il cui accrescimento è impedito dall'actinomicina D (Reich *et al.* 1961); nei batteri, nei protisti, in molti organismi vegetali ed animali, e persino nelle cellule dei Mammiferi (cfr. Harbers *et al.* 1963; Dingman e Sporn 1965; Fraccaro *et al.* 1966; Arrighi 1967). Per questa proprietà l'actinomicina D ha trovato interessanti applicazioni negli studi embriologici (cfr. Denis 1966) e nel campo citologico: così, ad esempio, usando actinomicina H<sup>3</sup> o C<sup>14</sup> quale marcatore citochimico, de Vitry (1964) ha individuato DNA nei cloroplasti di *Acetabularia mediterranea*, mentre Brachet e Ficq (1965) hanno confermato la presenza di DNA nelle placchette di deutoplasma degli ovociti di Anfibi. In *Chironomus tentans* (Insetti Ditteri) la sommini-

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

(\*\*) Nella seduta del 14 dicembre 1968.

strazione dell'antibiotico determina una temporanea inibizione della sintesi di RNA e porta ad un corrispondente ritardo nella formazione di tutti i *puffs* indotta dall'ecdisione (Clever 1964). Izawa, Allfrey e Mirsky (1963) hanno sperimentato gli effetti dell'actinomicina D sul nucleo degli ovociti di Anfibi, notando che la sintesi dell'RNA viene bloccata e che tutti i *loops* dei *lampbrush chromosomes* scompaiono probabilmente per retrazione nei cromomeri; questi Autori riportano anche che effetti simili sui *lampbrush chromosomes* isolati hanno la polilisina e gli istoni ricchi di arginina. Ficq (1968) riferisce invece che solo l'actinomicina D inibisce l'incorporazione dell'uridina nell'RNA degli ovociti ovarici di *Asterias rubens*.

Tenendo conto di questi reperti abbiamo esaminato gli effetti prodotti dalla actinomicina D tritiata sia su ovociti integri che su *lampbrush chromosomes* isolati di Anfibi Urodela. Inoltre, poiché nel corso di ricerche con radioisotopi (Mancino, Barsacchi e Nardi 1967, 1968 *a* e *b*) è risultato possibile caratterizzare alcune strutture dei *lampbrush chromosomes* oltre che morfologicamente anche funzionalmente, abbiamo ritenuto interessante stabilire il comportamento di vari tipi di *loops* e delle sfere di fronte all'actinomicina D. Nel presente lavoro segnaliamo i primi risultati conseguiti.

#### MATERIALE E TECNICA.

Abbiamo utilizzato esemplari di *Triturus alpestris apuanus* (Bonaparte 1839), raccolti in natura a Levigliani (Alpi Apuane) a 600 mt circa sul livello del mare, e di *T. cristatus carnifex* (Laurenti 1768), provenienti dai dintorni di Napoli.

Le ricerche sono state condotte seguendo due metodi:

1) Incubazione di ovociti ovarici, bagnati da liquido celomico, in  $H^3$  actinomicina D preventivamente essiccata a temperatura ambiente. Campioni di ovario prelevati dalla ♀ P di *T. a. apuanus* sono stati incubati in  $30 \mu g$  di  $H^3$  actinomicina D (attiv. spec. 2,97 c/mM) per tempi compresi tra 1' e 10 hr; altri ovociti prelevati dalla ♀ B sono stati incubati in  $37 \mu g$  di  $H^3$  actinomicina D (attiv. spec. 3,38 c/mM) per tempi compresi tra 3 hr. e 26 hr. Per quanto riguarda *T. c. carnifex*, ovociti prelevati dalla ♀ I sono stati incubati in  $37 \mu g$  di  $H^3$  actinomicina D (attiv. spec. 3,38 c/mM) per tempi compresi tra 2 hr e 57 hr.

2) Incubazione dei *lampbrush chromosomes* di *T. a. apuanus* (♀ P, ♀ P<sub>1</sub> e ♀ B) in  $H^3$  actinomicina D. Nuclei isolati da ovociti di varie dimensioni sono stati liberati della membrana in una celletta contenente una soluzione fisiologica ( $CaCl_2$   $10^{-4}M$  in  $K/NaCl$  0,1M 5:1), cui era stata aggiunta  $H^3$  actinomicina D (attiv. spec. 2,97 c/mM) nella concentrazione di  $10 \mu g/ml$  (♀ P) e  $20 \mu g/ml$  (♀ P<sub>1</sub>). In questa soluzione i cromosomi hanno soggiornato per tempi compresi tra  $3 \frac{1}{2}$  hr e 21hr per la ♀ P, e tra 1hr e 24 hr per la ♀ P<sub>1</sub>. Il contenuto nucleare di ovociti prelevati dalla ♀ B è stato incubato nella stessa soluzione fisiologica contenente  $37 \mu g/ml$  di  $H^3$  actinomicina D (attiv. spec. 3,38 c/mM) per tempi compresi tra  $1 \frac{1}{2}$  hr e 31 hr.

Il prelievo dei nuclei e l'asportazione della membrana nucleare sono stati eseguiti secondo i metodi da noi già sperimentati. I preparati sono stati osservati *in vivo* al contrasto di fase, fotografati e quindi fissati. Per la tecnica autoradiografica abbiamo utilizzato pellicole Kodak AR-10, sviluppo Kodak D 19, fissatore Kodak Unifix. Il tempo di esposizione, a bassa temperatura, è stato di 25-30 giorni circa. È stata usata H<sup>3</sup> actinomicina D prodotta dalla Schwarz Bioresearch, Inc., Orangeburg, N. Y. Nel corso di questi esperimenti abbiamo allestito preparati di controllo da ovociti non incubati nell'isotopo.

#### OSSERVAZIONI.

La morfologia dei dodici bivalenti *lampbrush* del corredo di *T. alpestris apuanus* è ben nota (Mancino e Barsacchi 1965): essi sono contraddistinti da numerosi *landmarks*, rappresentati da *loops* estesi forniti di matrice granulare o fibrillare, da *loops* a matrice densa; da granuli assiali e da globuli. Tre cromosomi sono dotati di una sfera (cromosomi I, IV e IX), uno presenta due sfere (cromosoma II). Nella maggior parte dei cromosomi è stato inoltre individuato il centromero, rappresentato da un granulo o da una sbarretta assiale privi di *loops*. Le femmine utilizzate per il presente studio mostravano il corredo *lampbrush* tipico della specie e un *puffing* normalmente sviluppato, come risulta anche dai preparati di controllo (Tav. I, A e B). È stato perciò possibile controllare le modificazioni provocate dalla actinomicina D a carico delle varie strutture cromosomiche.

L'incubazione degli ovociti in H<sup>3</sup> actinomicina D causa una graduale retrazione dei *loops* normali, che è già evidente dopo 2 hr e tende a divenire totale con l'aumentare del tempo di incubazione. Ad ogni tempo, comunque, il grado di retrazione dei *loops* dipende dalle dimensioni dell'ovocita: infatti brevi tempi di incubazione sono sufficienti a provocare la totale scomparsa dei *loops* in ovociti di grande diametro, mentre occorrono tempi prolungati per ovociti di piccolo diametro (Tav. II, C e D). Con i metodi e le dosi da noi usati nella maggioranza degli ovociti viene raggiunta la totale retrazione dei *loops* normali dopo circa 30 hr di incubazione (Tav. II, F). Occorre però rilevare che ovociti prelevati da femmine prossime alla deposizione presentano una completa retrazione dei *loops* poco tempo dopo l'inizio dell'incubazione (Tav. III, A e B).

Comportamento diverso mostrano i *loops* a matrice densa, di cui sono un esempio quelli inseriti sul cromosoma I tra 104.7 e 132.7 unità; i *loops* a matrice granulare presenti sul cromosoma I in posizione subterminale sinistra; i *loops* a matrice fibrillare, che sono inseriti su alcuni cromosomi in posizione intermedia e su altri in posizione subterminale: tra questi ultimi sono evidenti i *loops* subterminali di destra del bivalente XI. Questi diversi tipi di *loops* appaiono ben sviluppati anche quando i *loops* normali mostrano chiari segni di retrazione, e persistono perfino dopo la loro totale scomparsa (Tav. I, C; Tav. II, A, C, D e E; Tav. III, A, B e C). Con il prolungarsi

del tempo di incubazione, tuttavia, anche questi *loops* appaiono ridotti rispetto alle dimensioni originarie (Tav. I, D e F).

Nel corso della retrazione dei *loops* gli assi cromosomici appaiono contornati da numerosi globuli e granuli, costituiti probabilmente dalla matrice di RNA-proteine dei *loops* che si accumula in prossimità delle inserzioni; globuli e granuli si distaccano quindi dai cromosomi, arricchendo il contenuto del succo nucleare (Tav. I, C; Tav. II, E). Con il procedere dell'incubazione, infatti, gli assi cromosomici rimangono costituiti solo dalla successione dei cromomeri divenuti più evidenti (Tav. II, F).

Le sfere, a differenza dei *loops*, permangono immutate per morfologia e dimensioni (Tav. I, F).

L'esame dei preparati ottenuti da ovociti incubati in H<sup>3</sup> actinomicina D e sottoposti a tecnica autoradiografica ha messo in evidenza che cromosomi e nucleoli erano marcati (Tav. III, D).

Risultati identici sono stati ottenuti incubando ovociti di *T. cristatus carnifex* in H<sup>3</sup> actinomicina D. La morfologia dei *lampbrush chromosomes* di questa specie è stata resa nota da Callan e Lloyd (1960).

L'altro metodo da noi applicato, cioè l'incubazione del contenuto nucleare in H<sup>3</sup> actinomicina D dà risultati completamente diversi: i cromosomi infatti non subiscono alcuna apparente modificazione morfologica, in quanto i *loops* non si retraggono neppure dopo lunga incubazione. Tuttavia lo studio dei preparati sottoposti a tecnica autoradiografica indica che, anche in queste condizioni, l'H<sup>3</sup> actinomicina D si lega al DNA dei cromosomi: risultano infatti marcati sia gli assi cromosomici che quelli della maggior parte dei *loops*. Anche i nucleoli mostrano grani di Ag, confermando la presenza di DNA in questi organuli (Tav. III, E e F).

#### DISCUSSIONE.

L'actinomicina D provoca la retrazione dei *loops* dei *lampbrush chromosomes* quando in essa vengano incubati ovociti integri. Tuttavia i vari tipi di *loops* non sembrano essere ugualmente sensibili all'antibiotico: infatti, mentre i *loops* di morfologia normale si retraggono completamente poco tempo dopo l'inizio dell'incubazione, i *loops* a matrice densa (come quelli del cromosoma I di *T. alpestris apuanus*) e certi *loops* a matrice fibrillare e granulare non si riducono se non dopo incubazione assai prolungata. Tenendo conto anche di precedenti osservazioni sull'incorporazione di H<sup>3</sup> uridina, appare evidente che la retrazione interessa principalmente i *loops* che, negli ovociti di medie e grandi dimensioni, sintetizzano attivamente RNA, mentre riguarda in misura minore quei *loops* che presentano una incorporazione scarsa o più lenta di H<sup>3</sup> uridina. A loro volta le sfere, che hanno un elevato metabolismo proteico ma non sintetizzano RNA, non risentono apparentemente dell'azione dell'actinomicina D anche dopo tempi prolungati di incubazione.

La tecnica autoradiografica ha messo in evidenza che l' $H^3$  actinomicina D penetra nel nucleo durante l'incubazione degli ovociti: i cromosomi e i nucleoli infatti risultano marcati. La retrazione dei *loops* potrebbe quindi essere in rapporto al legame dell'antibiotico con il DNA cromosomico. Tuttavia questa interpretazione ha bisogno di ulteriori verifiche, poiché, contrariamente a quanto osservato da Izawa, Allfrey e Mirsky (1963), l'incubazione del solo contenuto nucleare in actinomicina D non provoca retrazione dei *loops* né altra apparente modificazione morfologica: anche in questo caso, però, i cromosomi e i nucleoli risultano marcati, indicando che l' $H^3$  actinomicina D si è legata al DNA nucleare. A questo proposito Ebstein (1967) precisa che l'actinomicina D si lega al DNA cromosomico soprattutto a livello dei cromomeri; secondo le nostre osservazioni, anche gli assi dei *loops* sono marcati. I diversi risultati ottenuti con i due metodi di incubazione farebbero quindi pensare che la retrazione dei *loops* sia legata anche a condizioni di vitalità e integrità degli ovociti.

#### BIBLIOGRAFIA.

- ARRIGHI F. E., « J. Cell Phys. », 69, 45-52 (1967).  
 BRACHET J. e FICQ A., « Exptl. Cell Res. », 38, 153-159 (1965).  
 CALLAN H. G. e LLOYD L., « Phil. Trans. Roy. Soc. (London) », B, 243, 135-219 (1960).  
 CLEVER U., « Science », 146, 794-795 (1964).  
 DENIS H., *Activité des gènes au cours du développement embryonnaire*, « Editions Desoer », Liège 1966.  
 DE VITRY F., « C. R. Acad. Sc. (Paris) », 258, 4829-4831 (1964).  
 DINGMAN G. W. e SPORN M. B., « Science », 149, 1251-1254 (1965).  
 EBSTEIN B. S., « J. Cell Biol. », 35, 709-713 (1967).  
 FRACCARO M., MANNINI A., TIEPOLO L. e ALBERTINI A., « Exptl. Cell Res. », 43, 136-147 (1966).  
 HARBERS E., MÜLLER W. e BACKMANN R., « Biochem. Z. », 337, 224 (1963).  
 IZAWA M., ALFREY V. G. e MIRSKY A. E., « Proc. Nat. Acad. Sci. », 50, 811-817 (1963).  
 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 », 44, 840-849 (1968 a).  
 MANCINO G., BARSACCHI G. e NARDI I., « Atti Acc. Naz. Lincei », (1968, in corso di stampa).  
 REICH E., FRANCKLIN R. M., SHATKIN A. J. e TATUM E. L., « Science », 134, 556 (1961).

#### SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-III

##### TAVOLA I.

- A - *T. alpestris apuanus*, ♀ B. Ovocita di mm 0,92 non incubato in  $H^3$  actinomicina D. - 550×.  
 B - *T. alpestris apuanus*, ♀ P. Ovocita di mm 0,84 non incubato in  $H^3$  actinomicina D. Sono evidenti i *loops* a matrice fibrillare (LF) inseriti in posizione subterminale destra sul bivalente XI. - 550×.  
 C - *T. alpestris apuanus*, ♀ B. Ovocita di mm 0,92 incubato per 9 1/2 hr in  $H^3$  actinomicina D. I *loops* normali sono parzialmente retratti; i *loops* a matrice fibrillare (LF) sono ancora ben sviluppati. Numerosi globuli e granuli sono presenti lungo l'asse cromosomico e nel succo nucleare. - 550×.

- D - *T. alpestris apuanus*, ♀ B. Ovocita di mm 0,76 incubato per 26 hr. I *loops* normali sono quasi del tutto retratti; i *loops* a matrice fibrillare (*LF*) sono ancora presenti. - 550×.
- E - *T. alpestris apuanus*, ♀ B. Bivalente I appartenente allo stesso ovocita della fig. D. Sono evidenti i *loops* a matrice densa (*LD*) e i *loops* subterminali di sinistra a matrice granulare (*LG*). - 550×.
- F - *T. cristatus carnifex*, ♀ I. Ovocita di mm 1,2 incubato per 35 hr. I *loops* normali sono completamente retratti; le sfere (*S*) non hanno risentito dell'azione dell'actinomicina D. - 550×.

## TAVOLA II.

- A - *T. alpestris apuanus*, ♀ B. Ovocita di mm 0,69 incubato per 3 hr in H<sup>3</sup> actinomicina D; bivalente XI. I *loops* normali appaiono ridotti, mentre i *loops* a matrice fibrillare inseriti in posizione subterminale destra (*LF*) sono ancora ben sviluppati. - 550×.
- B - *T. alpestris apuanus*, ♀ B. Ovocita di mm 0,96 incubato per 3 1/2 hr. I *loops* normali sono ridotti. I centromeri sono indicati dalle frecce. - 550×.
- C - *T. alpestris apuanus*, ♀ B. Ovocita di mm 0,84 incubato per 5 hr. I *loops* normali mostrano evidenti segni di retrazione, mentre i *loops* a matrice densa (*LD*) inseriti sul bivalente I sono normalmente sviluppati. - 550×.
- D - *T. alpestris apuanus*, ♀ B. Ovocita di mm 1,1 incubato per 5 hr. I *loops* normali sono completamente retratti, mentre sono ancora presenti i *loops* a matrice granulare (*LG*) inseriti sul bivalente I in posizione subterminale sinistra. - 550×.
- E - *T. alpestris apuanus*, ♀ B. Ovocita di mm 0,84 incubato per 9 1/2 hr. I *loops* normali sono quasi completamente retratti, mentre sono ancora ben sviluppati i *loops* a matrice granulare (*LG*) inseriti sul bivalente I in posizione subterminale sinistra. Molti granuli e globuli sono presenti intorno all'asse cromosomico e nel succo nucleare. - 550×.
- F - *T. alpestris apuanus*, ♀ B. Ovocita di mm 0,76 incubato per 26 hr. I *loops* normali sono completamente retratti; gli assi cromosomici risultano costituiti esclusivamente dalla sequenza dei cromomeri. - 550×.

## TAVOLA III.

- A - *T. alpestris apuanus*, ♀ P. Ovocita di mm 0,76 incubato in H<sup>3</sup> actinomicina D per 9 1/2 hr. I *loops* normali sono completamente retratti; sono presenti solo *loops* subterminali a matrice fibrillare (*LF*). - 350×.
- B - *T. alpestris apuanus*, ♀ P. Ovocita di mm 0,80 incubato per 9 1/2 hr. I *loops* normali sono completamente retratti, mentre alcuni *loops* a matrice fibrillare (*LF*) sono ancora estesi. - 350×.
- C - *T. alpestris apuanus*, ♀ P. Ovocita di mm 1,00 incubato per 3 3/4 hr. Mentre i *loops* normali sono quasi completamente retratti, i *loops* a matrice densa del bivalente I (*LD*) sono normalmente sviluppati. - 550×.
- D - *T. alpestris apuanus*, ♀ B. Ovocita di mm 0,92 incubato per 10 hr in H<sup>3</sup> actinomicina D e successivamente sottoposto a tecnica autoradiografica: gli assi cromosomici risultano marcati, - 1340×.
- E - *T. alpestris apuanus*, ♀ B. Ovocita di mm 0,92: i *lampbrush chromosomes*, isolati e incubati per 24 hr in soluzione fisiologica contenente H<sup>3</sup> actinomicina D, non mostrano alcuna retrazione dei *loops*. - 550×.
- F - *T. alpestris apuanus*, ♀ B. Ovocita di mm 0,96: i bivalenti *lampbrush*, isolati e incubati per 6 hr in soluzione fisiologica contenente H<sup>3</sup> actinomicina D, non mostrano retrazione dei *loops*; dopo autoradiografia, appaiono marcati. - 1340×.





