
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

MIRELLA DI CASTRO, ENZO MARCHETTI, ANGELA
ROCCHI BRASIELLO

**Studio del cariotipo di *Asellus aquaticus* per mezzo
delle tecniche della tripsina e della fluorescenza**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 55 (1973), n.1-2, p.
116–118.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1973_8_55_1-2_116_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/>

Citogenetica. — *Studio del cariotipo di Asellus aquaticus per mezzo delle tecniche della tripsina e della fluorescenza.* Nota (*) di MIRELLA DI CASTRO, ENZO MARCHETTI e ANGELA ROCCHI BRASIELLO, presentata dal Socio G. MONTALENTI.

SUMMARY. — Trypsin and fluorescence banding techniques have been used on *Asellus aquaticus* chromosomes. Both methods revealed chromosome tracts much less stained than the rest of the chromosomes. Since these tracts have a constant position it has been possible to map them.

Già da alcuni anni sono stati descritti i cariotipi di tre specie, appartenenti al genere *Asellus*, la cui sistematica è molto complessa: *Asellus (Asellus) aquaticus*, *Asellus (Proasellus) coxalis* e *Asellus (Proasellus) meridianus*.

Il kariogramma di *Asellus aquaticus* ($2n = 16$) [3] è costituito di 7 coppie di cromosomi metacentrici o submetacentrici e di una coppia di subtelocentrici; quello di *Asellus coxalis* ($2n = 12$) [2] è costituito di 6 coppie tutte metacentriche o submetacentriche; quello di *Asellus meridianus* ($2n = 10$) [5] è costituito di 5 coppie di cromosomi metacentrici o submetacentrici.

Finora non si è potuto ipotizzare nulla sul tipo di riordinamenti cromosomici avvenuti nell'ambito di queste specie e quindi sulle possibili affinità fra questi cariotipi, inoltre la mancanza di cromosomi telocentrici, nella specie a più alto numero di cromosomi, ci ha impedito di pensare a riordinamenti di tipo robertsoniani.

Ci è sembrato molto interessante usare sui cromosomi di queste specie le nuove tecniche di « bandeggiatura » per avere una maggiore definizione dei singoli tratti cromosomici e poter così avanzare qualche ipotesi evolutiva. Abbiamo perciò cominciato con *Asellus aquaticus* e abbiamo tentato di ottenere le bande usando le tecniche della tripsina e della fluorescenza.

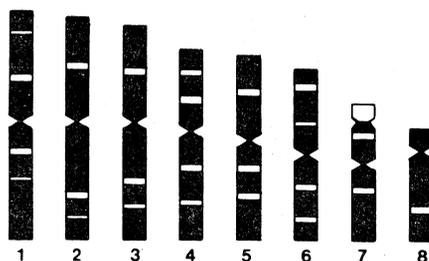
La ricerca è stata condotta su cellule spermatogoniali e su cellule embrionali. Nel primo caso è stata fatta una iniezione di colchicina alla concentrazione dello 0,05% a maschi adulti, dopo due o tre ore i testicoli sono stati estratti e schiacciati con acido acetico al 45%, i vetrini coprioggetto sono stati fatti saltare con la tecnica del ghiaccio secco, i preparati sono stati lavati in alcool a 70°, poi in H₂O dd e quindi lasciati asciugare all'aria. Nel secondo caso gli embrioni sono stati estratti dal marsupio della femmina ad uno stadio particolarmente adatto, posti in colchicina per circa 2 ore e quindi schiacciati come sopra.

Dopo 4-6 giorni i preparati sono stati trattati con tripsina seguendo la tecnica della Seabright [6] oppure con diidrocloreuro di quinacrina (Atebrin,

(*) Pervenuta all'Accademia il 3 agosto 1973.

Gurr), seguendo la tecnica descritta da Vosa [7]. Il trattamento con tripsina ha messo in evidenza lungo i cromosomi una serie di tratti scarsamente colorabili che sono costanti in ogni cromosoma e possono perciò essere mappati

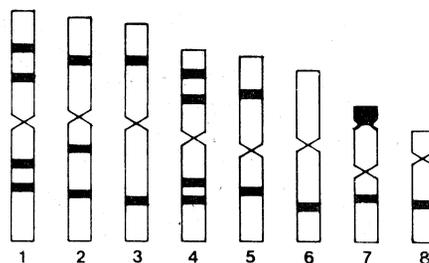
Fig. 1. — Idiogramma del cariotipo di *Asellus aquaticus*. Le bande chiare rappresentano i tratti scarsamente colorabili dopo trattamento con tripsina.



con una certa precisione (fig. 1 e Tav. I); non abbiamo ottenuto un pattern di bande del tipo di quelle che il trattamento con tripsina mette di solito in evidenza in altri organismi, ma molto probabilmente abbiamo ottenuto una mappa di tratti eterocromatici.

I motivi per cui non abbiamo ottenuto in *Asellus*, con tripsina, il tipo di bandeggiatura atteso possono essere molti; tra questi il metodo da noi usato per fissare i tessuti. Sappiamo che l'acido acetico al 45% estrae le frazioni istoniche ricche in lisina; al contrario, il fissativo di solito usato dai ricercatori in altri organismi nei quali sono state ottenute le bande, è il 3 : 1 alcool-acido acetico che estrae soprattutto le frazioni istoniche nucleari ricche in arginina [1]. D'altra parte, i nostri tentativi di usare il 3 : 1 come fissativo non ci hanno dato buoni risultati quindi, tenuto anche conto che non è molto facile in *Asellus* avere un certo numero di metafasi mitotiche di buona morfologia, abbiamo abbandonato il tentativo che potrebbe però essere ripreso in seguito.

Fig. 2. — Idiogramma del cariotipo di *Asellus aquaticus*. Le bande scure rappresentano i tratti scarsamente fluorescenti dopo colorazione con quinacrina.



La colorazione con quinacrina ha ancora una volta messo in evidenza lungo i cromosomi, una serie di tratti poco colorabili, cioè molto meno fluorescenti del resto dei cromosomi; questi tratti sono costanti, anche se non sono presenti quasi mai tutti insieme sulla stessa piastra mitotica (Tav. I), quindi osservando qualche decina di piastre abbiamo potuto mapparli (fig. 2). La corrispondenza tra i tratti poco colorabili dopo trattamento con tripsina e quelli poco fluorescenti è discreta anche se non perfetta, molto probabilmente perché il trattamento con tripsina, come è noto, altera lievemente la morfologia del cromosoma.

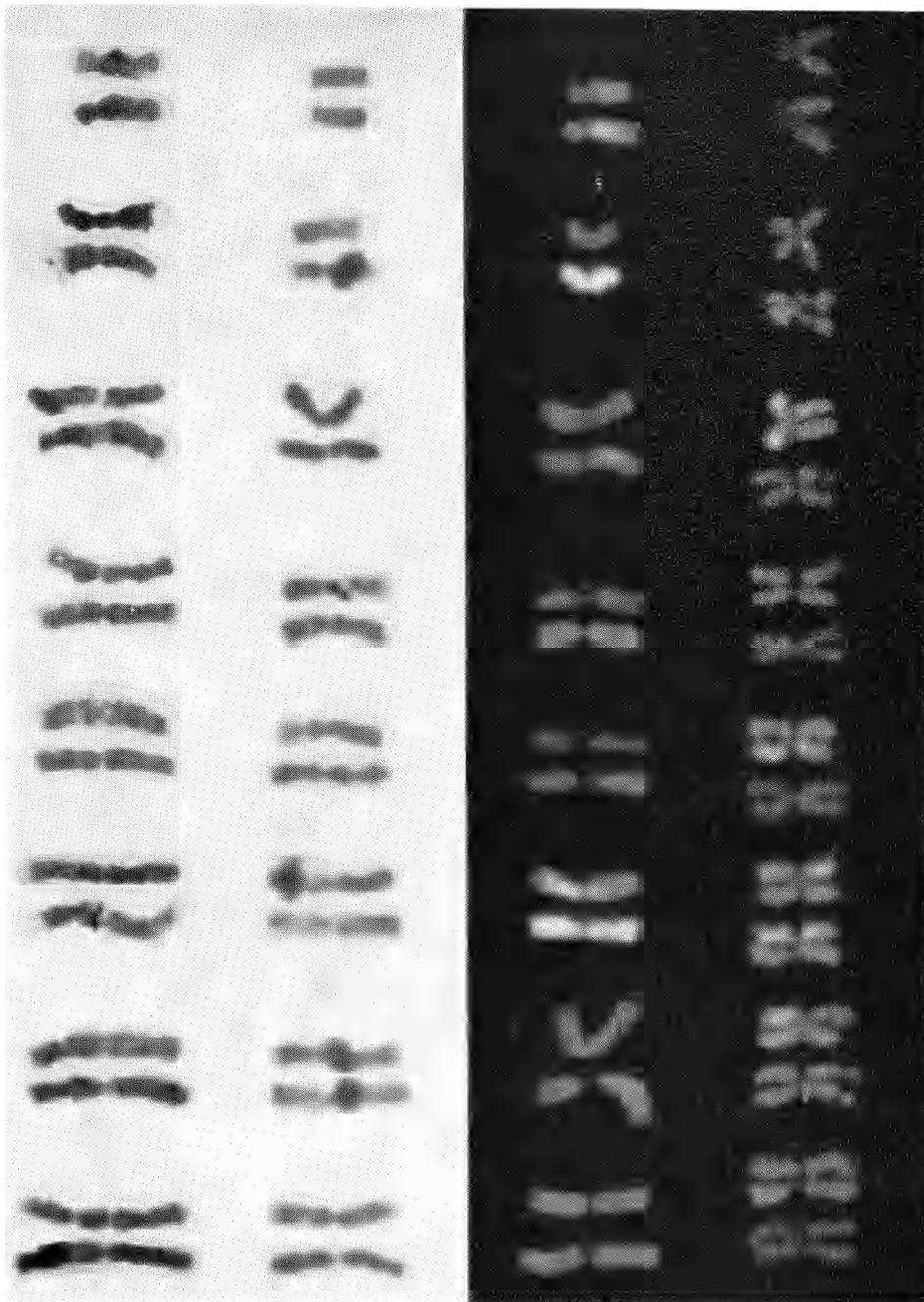
La mancanza di bande di fluorescenza intensa probabilmente non può essere attribuita all'uso dell'acido acetico al 45% come fissativo, perché Vosa [8], che usa regolarmente questo acido per schiacciare i tessuti vegetali dopo averli fissati con 3 : 1, ha ottenuto su piante differenti i due diversi tipi di bande: le molto fluorescenti (per esempio in *Vicia faba*) e quelle con fluorescenza ridotta (per esempio in *Tulbagia pulchella*). Vosa [8], abbinando allo studio del diverso grado di affinità al colorante fluorescente, lo studio della risposta negativa o positiva all'azione del freddo, ha concluso che l'uso della quinacrina permette di mettere in evidenza il fatto che esistono più tipi di eterocromatina e che le differenze sono, probabilmente, a livello chimico o chimico-fisico.

Su cromosomi umani è stato dimostrato [4] che tutte le costrizioni secondarie compaiono, dopo colorazione con quinacrina, come tratti molto poco fluorescenti. Questo fatto e la corrispondenza osservata in *Asellus* tra tratti poco fluorescenti, tratti poco colorabili dopo trattamento con tripsina e alcune costrizioni secondarie osservate su cromosomi non trattati, ci hanno fatto pensare che forse con entrambi i metodi abbiamo messo in evidenza delle costrizioni secondarie; non ne siamo, però, assolutamente certi.

Anche se ci sembra interessante aver messo in evidenza e mappato queste « costrizioni » non ci sembra per ora il caso di proseguire questa analisi sulle altre specie di *Asellus* che pensavamo di esaminare. Rinviemo perciò momentaneamente il problema al momento in cui saremo in grado di ottenere una vera e propria « bandeggiatura » dei cromosomi di queste specie.

BIBLIOGRAFIA

- [1] DICK C. e JOHNS E. W., *The effect of two acetic acid containing fixatives on the histone content of calf thymus deoxyribonucleoprotein and calf thymus tissue.*
- [2] MONTALENTI G. e ROCCHI A., *Il corredo cromosomico di Asellus coxalis (Crust. Isop.),* « Acc. Naz. dei Lincei », 36, 443-445 (1964).
- [3] MONTALENTI G. e ROCCHI A., *Note cariologiche sul genere Asellus,* « Boll. Zool. », 31, 341-348 (1964).
- [4] PAWLOWITZKI I. H., *The correspondence between quinacrine banding patterns and sites of secondary constrictions in human chromosomes,* « Humangenetik », 15, 236-241 (1972).
- [5] ROCCHI BRASIELLO A., *I cromosomi di Asellus meridianus Racovitza,* « Acc. Naz. dei Lincei », 43, 585-589 (1967).
- [6] SEABRIGHT M., *The use of proteolytic enzymes for the mapping of structural rearrangements in the chromosomes of man,* « Chromosoma », 36, 204-210 (1972).
- [7] VOSA C. G., *The quinacrine-fluorescence patterns of the chromosomes of Allium carinatum,* « Chromosoma », 33, 382-385 (1971).
- [8] VOSA C. G., *Heterochromatin recognition with fluorochromes,* « Chromosoma », 30, 366-372 (1970).



Quattro cariotipi di *Asellus aquaticus*: due ottenuti dopo trattamento con tripsina e due dopo colorazione con quinacrina.