
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

MATILDE RAGGHIANI, STEFANIA BUCCI INNOCENTI,
GIORGIO MANCINO

**Bandeggiatura indotta da "C-, G- e Q-staining
methods" e pattern di replicazione dei cromosomi di
Triturus**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 55 (1973), n.6, p. 764-770.*
Accademia Nazionale dei Lincei

http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1973_8_55_6_764_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. — *Bandeeggiatura indotta da «C-, G- e Q-staining methods» e pattern di replicazione dei cromosomi di Triturus.* Nota di MATILDE RAGGHIANI, STEFANIA BUCCI INNOCENTI e GIORGIO MANCINO (*), presentata (**) dal Socio M. BENAZZI.

SUMMARY. — The C-staining method and four G-staining methods induce, on newt chromosomes, the formation of darkly stained bands, whose distribution patterns are typical for each species studied so far (*Triturus alpestris apuanus*, *T. cristatus carnifex*, *T. italicus*, *T. marmoratus marmoratus*, *T. vulgaris meridionalis*). The localization of C- and G- bands appears to be identical within a specific karyotype.

Also the Q- staining method induces bands on *Triturus* chromosomes, but their brilliance greatly increases after treatment with a denaturation-renaturation process; however the nucleolus-organizing regions, which do not stain by Giemsa, show no fluorescence and the heteromorphic region of sex chromosomes, which darkly stains by Giemsa shows pale fluorescence even when the cytological preparations are previously submitted to the denaturation-renaturation process.

Evidence is supplied supporting the hypothesis of the coincidence rather than of the contiguity between the bands obtained by the Giemsa stain and those visible after use of the alkylating fluorochrome quinacrine. Therefore, in each newt species studied in the present work, the banding pattern seems to be unique for C-, G- and Q- bands.

Keeping in mind that these bands are often identified as to some heterochromatic tracts which appear after cold treatment, the opportunity has been taken into account to study also the DNA replication at those levels, using ^3H -thymidine and autoradiographic technique. At present, the results obtained so far seem to point out that most of the bands may correspond to chromosome regions characterized by a late replication process.

INTRODUZIONE

In questi ultimi anni sono state applicate ai cromosomi di animali e piante varie tecniche citologiche che, determinando la formazione di bande, si sono rese particolarmente utili per studi citotassonomici e citogenetici: esse permettono infatti un più preciso riconoscimento dei singoli elementi del corredo ed una più esatta ricostruzione dei cariotipi. Tali tecniche hanno altresì contribuito a far sviluppare maggiormente le indagini sulla natura e sull'organizzazione del DNA lungo i cromosomi con particolare riguardo alla composizione in basi (Caspersson *et al.*, 1968; Ellison e Barr, 1972), al grado di ripetitività (Pardue e Gall, 1970; Arrighi e Hsu, 1971; Yunis e Yasmineh, 1971; Schnedl, 1971; Cooper e Hsu, 1972; Pathak, Hsu e Utakoji, 1973) e all'interazione con le proteine del DNA presente a livello delle singole bande (Comings *et al.*, 1973; Sumner e Evans, 1973).

(*) Istituto di Istologia e Embriologia, Università di Pisa, Via Volta 4, Pisa. Lavoro svolto col contributo del C.N.R., Roma.

(**) Nella seduta del 15 dicembre 1973.

Sui cromosomi dei Mammiferi l'applicazione di queste tecniche ha raggiunto proporzioni tali da rendere necessaria la standardizzazione delle diverse metodiche per una più chiara e più esatta interpretazione dei risultati ottenuti con ciascuna di esse (Paris Conference, 1971). Negli altri Vertebrati, invece, studi cromosomici di questo tipo sono stati finora meno numerosi. Negli Anfibi, ad esempio, le tecniche di bandeggiatura sono state applicate con successo solo in alcuni Urodeli Salamandridi, come in *Pleurodeles waltlii*, dove bande sono state indotte con un «G-staining method» (Labrousse, Guillemin e Gallien, 1972) e con il «Q-staining method» (Bailly, 1972) e successivamente confrontate tra loro (Bailly, Guillemin e Labrousse, 1973). Nel genere *Triturus* è stato sperimentato con successo il «C-staining method» sui cromosomi di quattro specie (*T. vulgaris meridionalis*, *T. italicus*, *T. marmoratus* e *T. cristatus carnifex*), in ciascuna delle quali questa tecnica ha messo in evidenza un banding pattern tipico (Nardi, Ragghianti e Mancino, 1973; Mancino, Ragghianti e Bucci Innocenti, 1973 in press).

Proseguendo questo studio, abbiamo applicato il «C-staining method» anche ai cromosomi di *T. alpestris apuanus*, saggiando successivamente, in questa e nelle altre specie già menzionate, l'efficacia dei «G-staining methods» e del «Q-staining method» allo scopo di accertare l'eventuale sovrapposibilità dei banding patterns ottenuti con i tre diversi metodi. Le conclusioni cui siamo giunti ci hanno spinto ad iniziare una ricerca sulla replicazione del DNA lungo i cromosomi di *Triturus*, nell'intento di verificare la possibile relazione tra bande variamente ottenute e zone eterocromatiche a replicazione tardiva.

MATERIALI E METODI

Le specie prese in esame nel presente lavoro sono: *Triturus alpestris apuanus* (Bonaparte, 1839); *Triturus cristatus carnifex* (Laurenti, 1768), *Triturus italicus* (Peracca, 1898); *Triturus marmoratus marmoratus* (Latreille, 1800); *Triturus vulgaris meridionalis* (Boulenger, 1882).

I metodi usati sono stati i seguenti:

1) «C-staining method», in accordo con la tecnica introdotta da Pardue e Gall (1970) e successivamente descritta in dettaglio da Gall e Pardue (1971), omettendo l'uso di RNA radioattivo e usando HCl a concentrazione 1 N. Nel corso del lavoro questo metodo è talora indicato più semplicemente come tecnica del Giemsa.

2) «G-staining methods», in accordo rispettivamente a Drets e Shaw (1971), a Dutrillaux *et al.* (1971), a Sumner, Evans e Buckland (1971), a Schnedl (1972).

3) «Q-staining method». I preparati erano colorati con una soluzione acquosa allo 0,5 % di «Atebrin» (Gurr) per 20 min, poi sciacquati e montati in H₂O distillata. Le preparazioni erano esaminate con un microscopio C.

Zeiss a fluorescenza (con una lampada a vapori di mercurio HBO 200 W/4, con un filtro di eccitazione BG 3 e con la combinazione 50 e 44 dei filtri di sbarramento) e fotografati con «Kodak Tri-X Pan film».

4) Metodo autoradiografico per lo studio della replicazione del DNA cromosomico. Maschi e femmine di *Triturus vulgaris meridionalis* preventivamente trattati con 0,15 ml di colcemid (Ciba: 1 mg/ml), erano iniettati con 20 μ l di ^3H -timidina (att. spec.: 26 ci./mmol; The Radiochemical Centre, Amersham). Dopo 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 e 36 h; 2, 3 e 4 giorni dall'iniezione, i testicoli e l'intestino erano prelevati, posti in acqua distillata per 10 min, fissati in acido acetico glaciale: alcool etilico assoluto (1:3) e dissociati in acido acetico al 45%. Le preparazioni cromosomiche erano allestite secondo la consueta tecnica definita «dry-ice method». I preparati erano quindi coperti con emulsione K 2 (Ilford) e sviluppati dopo un periodo di esposizione compreso tra 1 e 2 settimane; essi venivano quindi colorati con 5 cc della soluzione stock di Giemsa in 95 cc di tampone fosfato a pH 7 e montati in Euparal. Per questo metodo ci siamo basati ampiamente sul lavoro di Callan e Taylor (1968) che fornisce dati riguardanti la replicazione del DNA nella meiosi.

RISULTATI E DISCUSSIONE

1) C-staining method.

Questo procedimento tecnico è stato applicato ai cromosomi di *T. a. apuanus*. Il banding pattern prodotto è paragonabile a quello di *T. marmoratus* e *T. c. carnifex*: si ottengono infatti regioni centromeriche evidenziate da un granulo scuro, bande pericentriche semplici e bande subterminali localizzate su alcuni cromosomi. Delle due regioni nucleolo-organizzatrici, presenti rispettivamente in posizione mediana sul braccio lungo del cromosoma VIII e in posizione subterminale sul braccio lungo del cromosoma X (Nardi, Ragghianti e Mancino, 1972), soprattutto la prima si evidenzia come tratto Giemsa negativo con il «C-staining method».

2) G-staining methods.

Applicati ai cromosomi di *T. v. meridionalis* questi metodi inducono la formazione di bande scure duplici ai lati della regione centromerica (bande pericentriche) e semplici in posizione subterminale (Tav. I). Per numero e distribuzione, tutte queste bande sono identiche a quelle che si ottengono con il «C-staining method» (Nardi, Ragghianti e Mancino, 1973): la sola notevole differenza riguarda le regioni centromeriche che si evidenziano facilmente come C-bands, mentre si rivelano come G-bands solo nelle preparazioni più favorevoli; fa eccezione il cromosoma VII che in ogni caso presenta un centromero ben marcato. Risultati simili sono stati ottenuti in altre specie, quali

T. marmoratus, a seguito dell'applicazione dei vari «G-staining methods»: ciò ci induce a ritenere che nelle specie studiate del genere *Triturus* C- e G-bands si sovrappongano.

3) Q-staining method.

L'uso di sostanze fluorescenti, quali la quinacrine, evidenzia in tutte le specie studiate una serie di bande che appaiono però chiare e brillanti solo quando i preparati sono sottoposti preventivamente ad un processo di denaturazione e rinaturazione (Tav. II). Ciò è in accordo con quanto riportato da de la Chapelle, Schröder e Selander (1971 e 1973), Evans, Buckton e Sumner (1971) e Gagné, Tanguay e Laberge (1971). Nel nostro caso, non è stata notata alcuna variazione quantitativa del pattern di fluorescenza abituale in preparati precedentemente trattati; Gagné, Tanguay e Laberge (1971) riferiscono, invece, che sottoponendo preparati di cromosomi umani alla tecnica del Giemsa prima di immergerli nella sostanza fluorescente, si verifica una riduzione numerica delle bande tipiche. Alcune regioni, e specificatamente le regioni nucleolo-organizzatrici, appaiono costantemente fluorescenti negative anche dopo trattamento, mentre Evans, Buckton e Sumner (1971), sottoponendo preparati di cromosomi umani all'azione di fluorocromi dopo trattamento con la tecnica ASG, ottenevano Q-bands brillanti non solo in regioni a fluorescenza debole, ma anche in regioni fluorescenti negative.

Per stabilire se le Q-bands siano solo contigue o coincidenti con le C-bands, abbiamo sottoposto alcuni preparati a doppia colorazione. Così in *T. v. meridionalis* e in *T. italicus* alcune preparazioni cromosomiche sono state prima trattate con il «C-staining method» e poi esposte all'azione del fluorocromo. I rispettivi banding patterns specifici, evidenziati con l'abbinamento delle due tecniche, risultano senza dubbio coincidenti (Tavv. III e IV).

In *T. a. apuanus*, viceversa, alcuni preparati sono stati prima trattati con sostanze fluorescenti poi sottoposti alla tecnica del Giemsa. Anche in questo caso, comunque, è stata notata la sovrapposizione fra le zone a fluorescenza brillante e quelle colorate in scuro con il Giemsa; la regione nucleolo-organizzatrice del cromosoma VIII, che appare come un tratto non fluorescente, non risulta colorata neppure con il «C-staining method» (Tav. V).

L'insieme dei risultati giustifica il nostro orientamento a ritenere la maggior parte delle C- e delle Q-bands coincidenti piuttosto che contigue. Una riserva va avanzata a questo proposito per gli eterocromosomi di *T. marmoratus* e *T. c. carnifex* che, come è noto, presentano una estesa regione sul braccio lungo fortemente colorata dopo trattamento con la tecnica del Giemsa (Mancino, Ragghianti e Bucci Innocenti, 1973 in press). Con il «Q-staining method» tale regione mostra fluorescenza pallida e tale fluorescenza non aumenta neppure dopo denaturazione-rinaturazione (Tav. VI).

4) *Pattern di replicazione del DNA.*

Ammessa la corrispondenza tra C- e Q-bands, ci siamo chiesti se tali zone potevano essere considerate eterocromatiche e a replicazione tardiva, dato che le Q-bands sono messe in rapporto a regioni eterocromatiche visualizzate dopo trattamento con freddo (Adkisson, Perreault e Gay, 1971; Caspersson *et al.*, 1969; Vosa, 1970) e le regioni eterocromatiche, a loro volta, vengono associate a zone late replicating (Lima-de-Faria e Jaworska, 1968).

La corrispondenza tra bande e regioni eterocromatiche appare chiara dal confronto del cariotipo di *T. vulgaris* dopo le varie tecniche di bandeggiatura e di quello che si ottiene dopo trattamento col freddo (Callan, 1942); soprattutto la distribuzione delle bande duplici pericentriche sembra coincidere con i tratti eterocromatici, generalmente duplici, che appaiono ai lati del centromero dopo shock termico.

Per accertare invece se le bande siano riportabili a tratti eterocromatici a replicazione tardiva, usufruendo della stessa specie, abbiamo analizzato il pattern di replicazione del DNA sui cromosomi mitotici. I risultati preliminari dimostrano la presenza di regioni cromosomiche late replicating localizzate principalmente ai lati del centromero (Tav. VII). Come già Callan e Taylor (1968) hanno prospettato, riteniamo perciò che la distribuzione spaziale di queste regioni coincida con la distribuzione delle costrizioni secondarie indotte da freddo e quindi con le C-, G- e Q-bands. Anche le regioni subterminali di alcuni cromosomi appaiono marcate tardivamente, ma al momento presente non siamo in grado di stabilire la loro corrispondenza con le bande subterminali; i centromeri appaiono marcati solo quando la marcatura è più intensa lungo tutto il cromosoma.

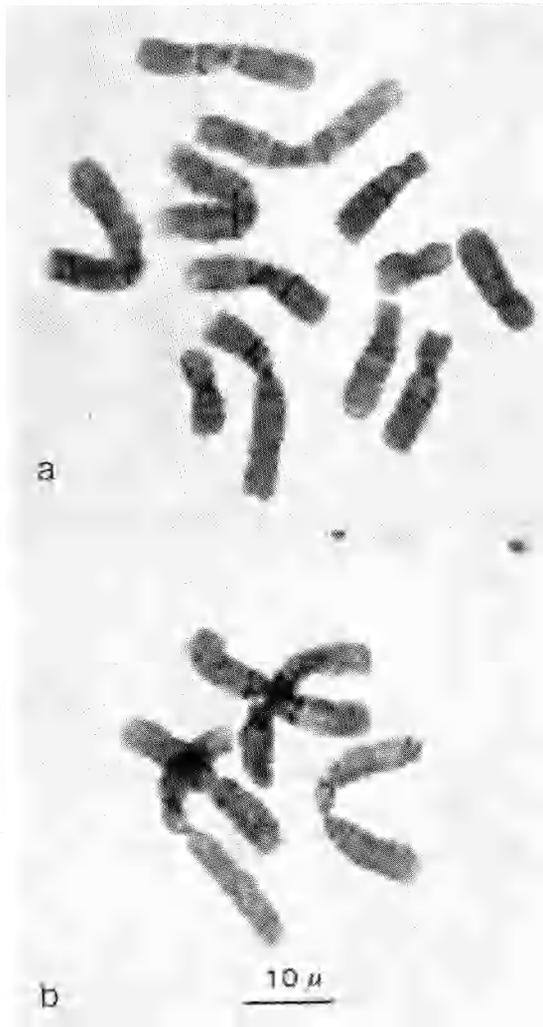
Per verificare se esista effettivamente la coincidenza tra C-bands e zone late labelling, alcuni preparati, già sviluppati autoradiograficamente, sono stati sottoposti alla tecnica del Giemsa: è stata così notata una sovrapposizione, su vari cromosomi, fra bande e tratti coperti dai granuli di Ag a conferma dell'opinione già espressa.

BIBLIOGRAFIA

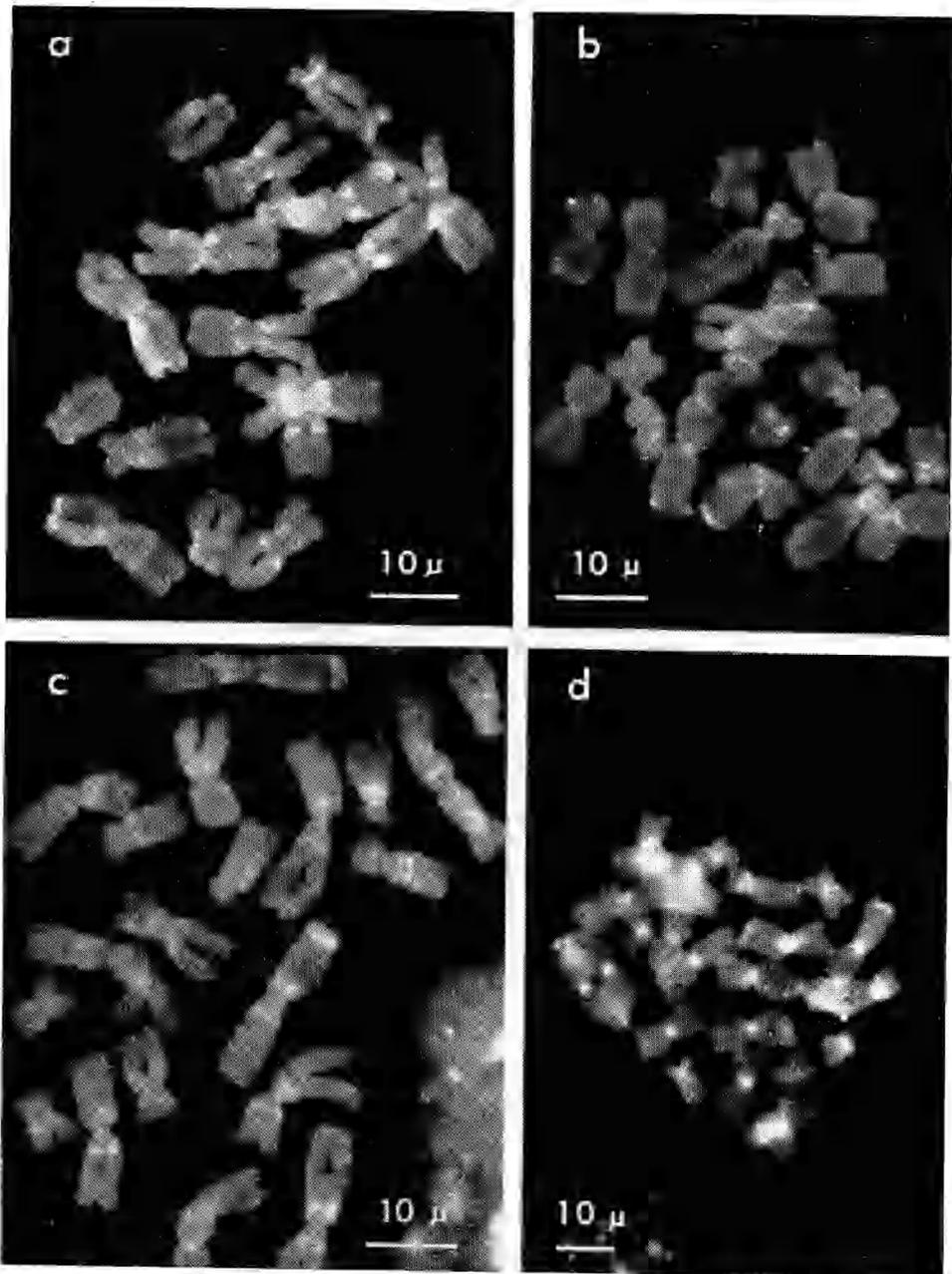
- ADKISSON K. P., PERREAULT W. J. e GAY H., *Differential fluorescent staining of Drosophila chromosomes with quinacrine mustard*, «Chromosoma», 34, 190-205 (1971).
- ARRIGHI F. E. e HSU T. C., *Localization of heterochromatin in human chromosomes*, «Cytogenetics», 10, 81-86 (1971).
- BAILLY S., *Etude de la fluorescence des chromosomes mitotiques de Pleurodeles waltlii Michah., après coloration par la moutarde de quinacrine*, «C. R. Acad. Sc. Paris», 275, 1267-1270 (1972).
- BAILLY S., GUILLEMIN C. e LABROUSSE M., *Comparison du nombre et de la position des zones spécifiques révélées sur les chromosomes mitotiques de l'Amphibien Urodèle Pleurodeles waltlii Michah. par les techniques de coloration au colorant de Giemsa et à la moutarde de quinacrine*, «C. R. Acad. Sc. Paris», 276, 1867-1869 (1973).
- CALLAN H. G., *Heterochromatin in Triton*, «Proc. roy. Soc.», B 130, 324-335 (1942).

- CALLAN H. G. e TAYLOR J. H., *A radioautographic study of the time course of male meiosis in the newt Triturus vulgaris*, « J. Cell Sc. », 3, 615-626 (1968).
- CASPERSSON T., FARBER S., FOLEY G. E., KUDYNOWSKI J., MODEST E. J., SIMONSSON E., WAGH U. e ZECH L., *Chemical differentiation along metaphase chromosomes*, « Exptl. Cell Res. », 49, 219-222 (1968).
- CASPERSSON T., ZECH L., MODEST E. J., FOLEY G. E., WAGH U. e SIMONSSON E., *DNA-binding fluorochromes for the study of the organization of the metaphase nucleus*, « Exptl. Cell Res. », 58, 141-152 (1969).
- CHAPELLE DE LA A., SCHRÖDER J. e SELANDER R.-K., *Repetitious DNA in mammalian chromosomes*, « Hereditas », 69, 149-153 (1971).
- CHAPELLE DE LA A., SCHRÖDER J. e SELANDER R.-K., *In situ localization and characterization of different classes of chromosomal DNA: acridine orange and quinacrine mustard fluorescence*, « Chromosoma », 40, 347-360 (1973).
- COMINGS D. E., AVELINO E., OKADA T. A. e WYANDT H. E., *The mechanism of C- and G-banding of chromosomes*, « Exptl. Cell Res. », 77, 469-493 (1973).
- COOPER J. E. K. e HSU T. C., *The C-band and G-band patterns of Microtus agrestis chromosomes*, « Cytogenetics », 11, 295-304 (1972).
- DRETS M. E. e SHAW M. W., *Specific banding-patterns of human chromosomes*, « Proc. Nat. Acad. Sci. USA », 68, 2073-2077 (1971).
- DUTRILLAUX B., DE GROUCHY J., FINAZ C. e LEJEUNE J., *Mise en évidence de la structure fine des chromosomes humains par digestion enzymatique (pronase en particulier)*, « C. R. Acad. Sc. Paris », 273, 587-588 (1971).
- GALL J. G. e PARDUE M. L., *Nucleic acid hybridization in cytological preparation*, « Methods in enzymology », 31 (Grossman L. and Moldave K., eds.), pp. 470-480. New York: Academic Press (1971).
- ELLISON J. R. e BARR H. J., *Quinacrine fluorescence of specific chromosome regions. Late replication and high A : T content in Samoia leonensis*, « Chromosoma », 36, 375-390 (1972).
- EVANS H. J., BUCKTON K. E. e SUMNER A. T., *Cytological mapping of human chromosomes: results obtained with quinacrine fluorescence and the acetic-saline-Giemsa techniques*, « Chromosoma », 35, 310-325 (1971).
- GAGNÉ R., TANGUAY R. e LABERGE C., *Differential staining patterns of heterochromatin in man*, « Nature new biology », 232, 29-30 (1971).
- LABROUSSE M., GUILLEMIN C. e GALLIEN M. L., *Mise en évidence sur les chromosomes de l'Amphibien Pleurodeles waltlii Michah., de secteurs d'affinité différente pour le colorant de Giemsa à pH 9*, « C. R. Acad. Sc. Paris », 274, 1063-1065 (1972).
- LIMA-DE-FARIA A. e JAWORSKA H., *Late DNA synthesis in heterochromatin*, « Nature », 217, 138-142 (1968).
- MANCINO G., RAGGHIANI M. e BUCCI INNOCENTI S., *I cariotipi di Triturus marmoratus e T. cristatus studiati con il «C-staining method»*, « Rend. Acc. Naz. Lincei » (1973, in press).
- NARDI I., RAGGHIANI M. e MANCINO G., *Morphology of the mitotic chromosomes of embryos and of adults of italian alpine newt Triturus alpestris apuanus (Bonaparte)*, « Experientia », 28, 591-592 (1972).
- NARDI I., RAGGHIANI M. e MANCINO G., *Banding patterns in newt chromosomes by the Giemsa stain*, « Chromosoma », 40, 321-331 (1973).
- PARDUE M. L. e GALL J. G., *Chromosomal localization of mouse satellite DNA*, « Science », 168, 1356-1358 (1970).
- PARIS CONFERENCE (1971), *Standardization in human cytogenetics*, « Cytogenetics », 11, 313-362 (1972).
- PATHAK S., HSU T. C. e UTAKOJI T., *Relationships between patterns of chromosome banding and DNA syntetic sequences: a study on the chromosomes of the Seba's fruit bat, Carollia perspicillata*, « Cytogenet. Cell Genet. », 12, 157-164 (1973).

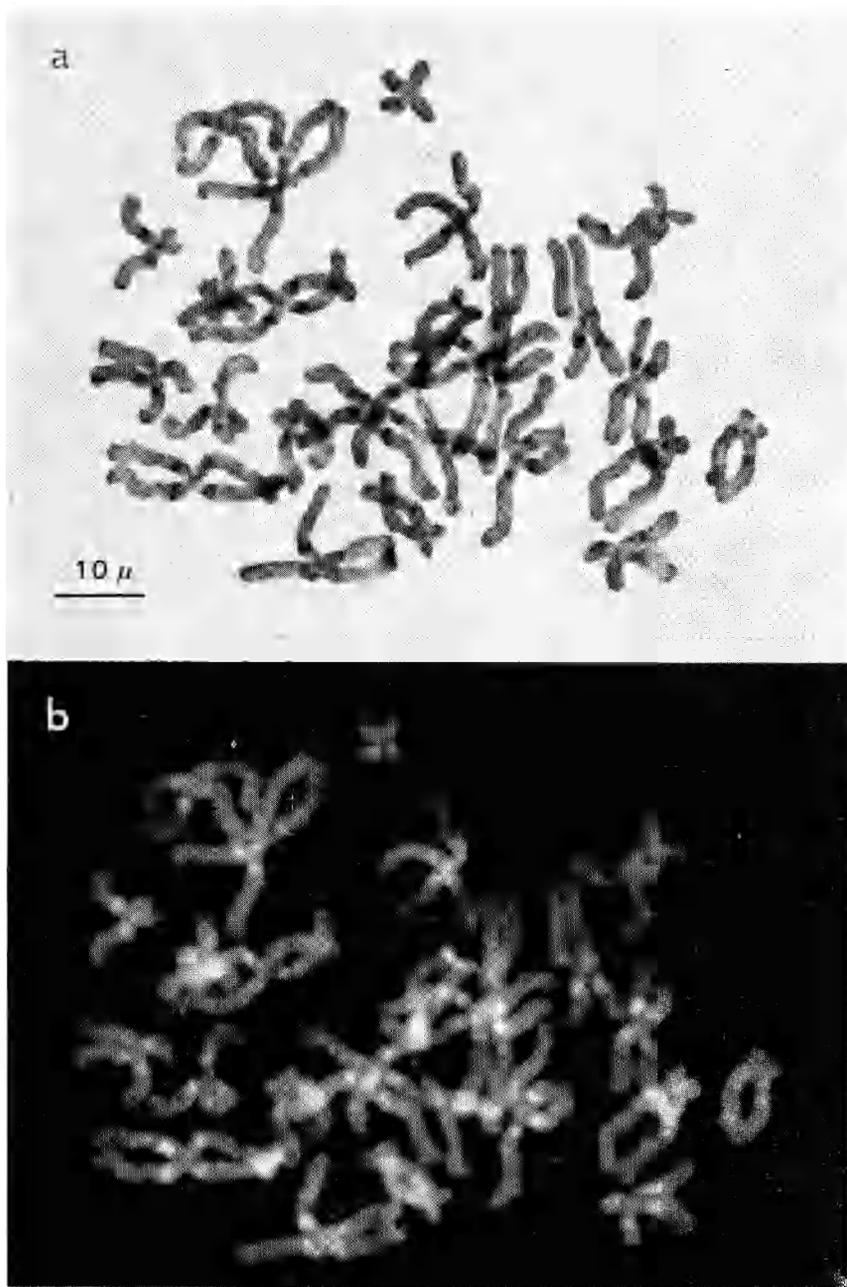
- SCHNEDL W., *Analysis of the human karyotype using a reassociation technique*, « Chromosoma », 34, 448-454 (1971).
- SCHNEDL W., *Giemsa banding, quinacrine fluorescence and DNA-replication in chromosomes of cattle (Bos taurus)*, « Chromosoma », 38, 319-328 (1972).
- SUMNER A. T. e EVANS H. J., *Mechanisms involved in the banding of chromosomes with quinacrine and Giemsa. II. The interaction of the dyes with the chromosomal components*, « Exptl. Cell Res. », 81, 223-236 (1973).
- SUMNER A. T., EVANS H. J. e BUCKLAND R. A., *New technique for distinguishing between human chromosomes*, « Nature new biology », 232, 31-32 (1971).
- VOSA C. G., *Heterochromatin recognition with fluorochromes*, « Chromosoma », 30, 366-372 (1970).
- YUNIS J. J. e YASMINEH W. G., *Heterochromatin, satellite DNA, and cell function*, « Science », 174, 1200-1209 (1971).



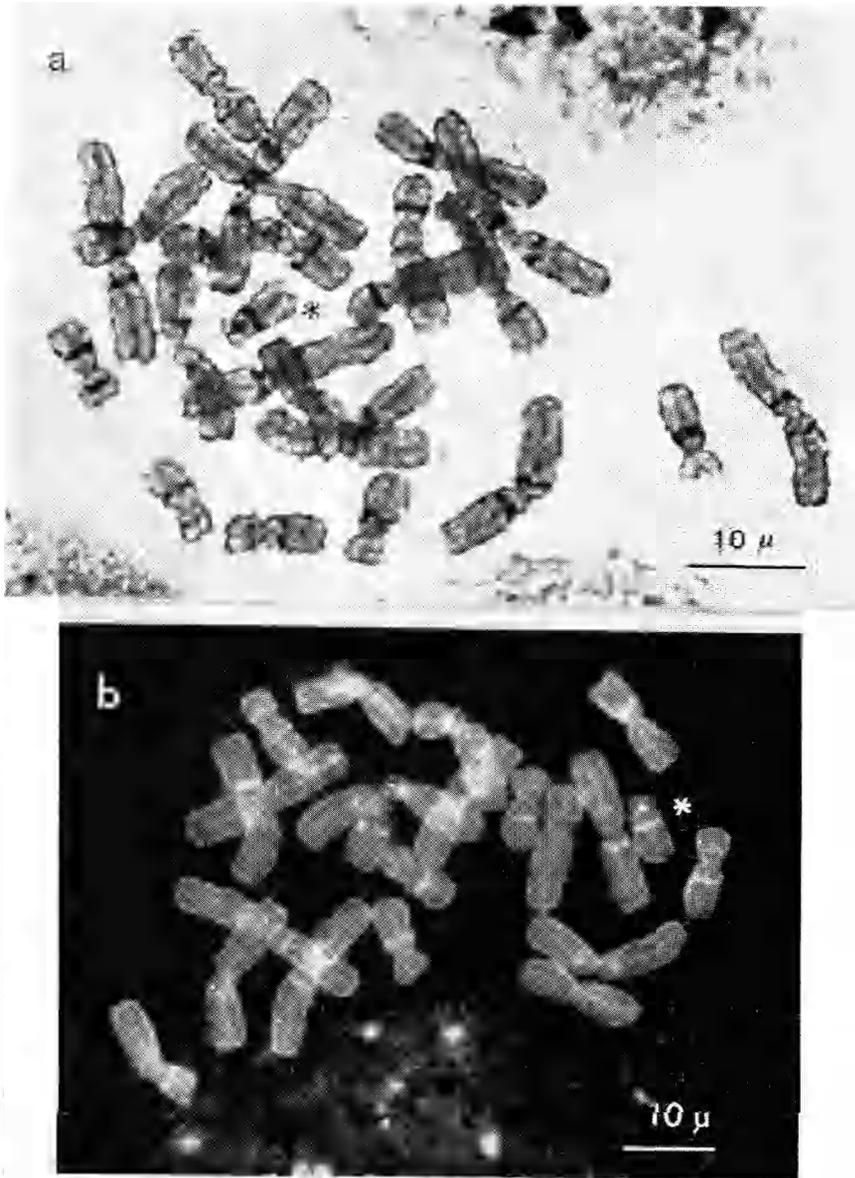
G-bands pericentriche doppie e subterminali semplici, indotte con il metodo di Schnedl (1972) su due gruppi di cromosomi (*a* e *b*) di spermatogoni metafasici di *T. vulgaris meridionalis*.



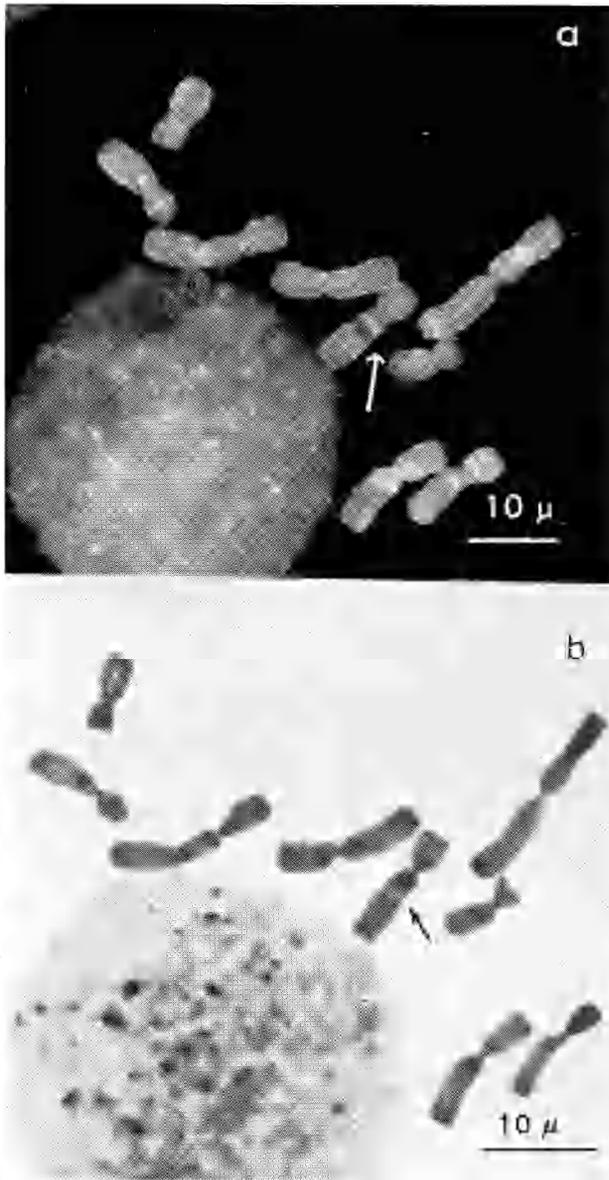
Q-bands indotte su cromosomi spermatogoniali con il « Q-staining method », senza preventivo processo di denaturazione-rinaturazione (*a e b*) e con pretrattamento (*c e d*). *a e c*: *T. v. meridionalis*; *b e d*: *T. marmoratus*.



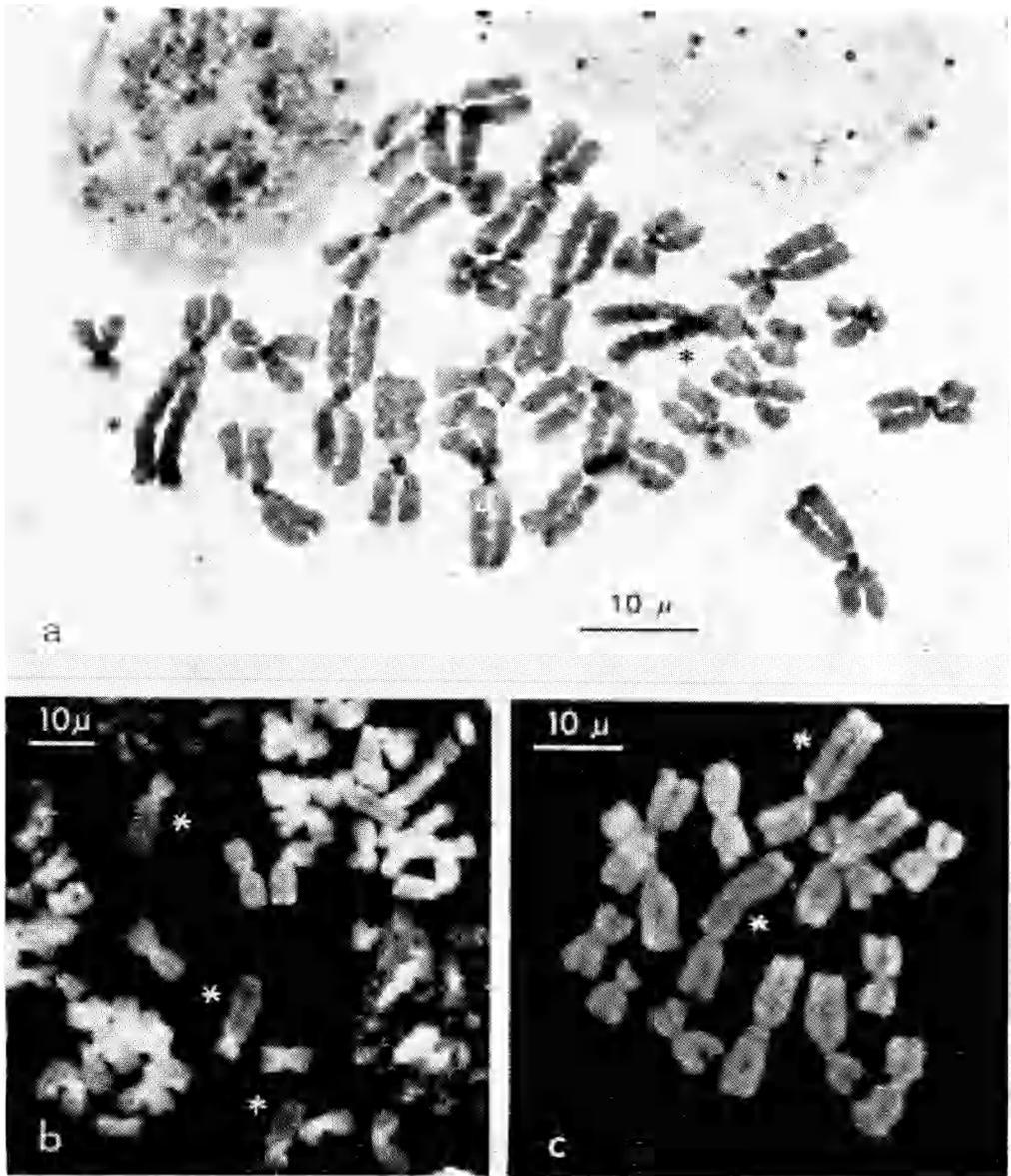
Metafase spermatogonale di *T. v. meridionalis* sottoposta prima al «C-staining method» (a) e quindi al «Q-staining method» (b). Notare la coincidenza delle bande.



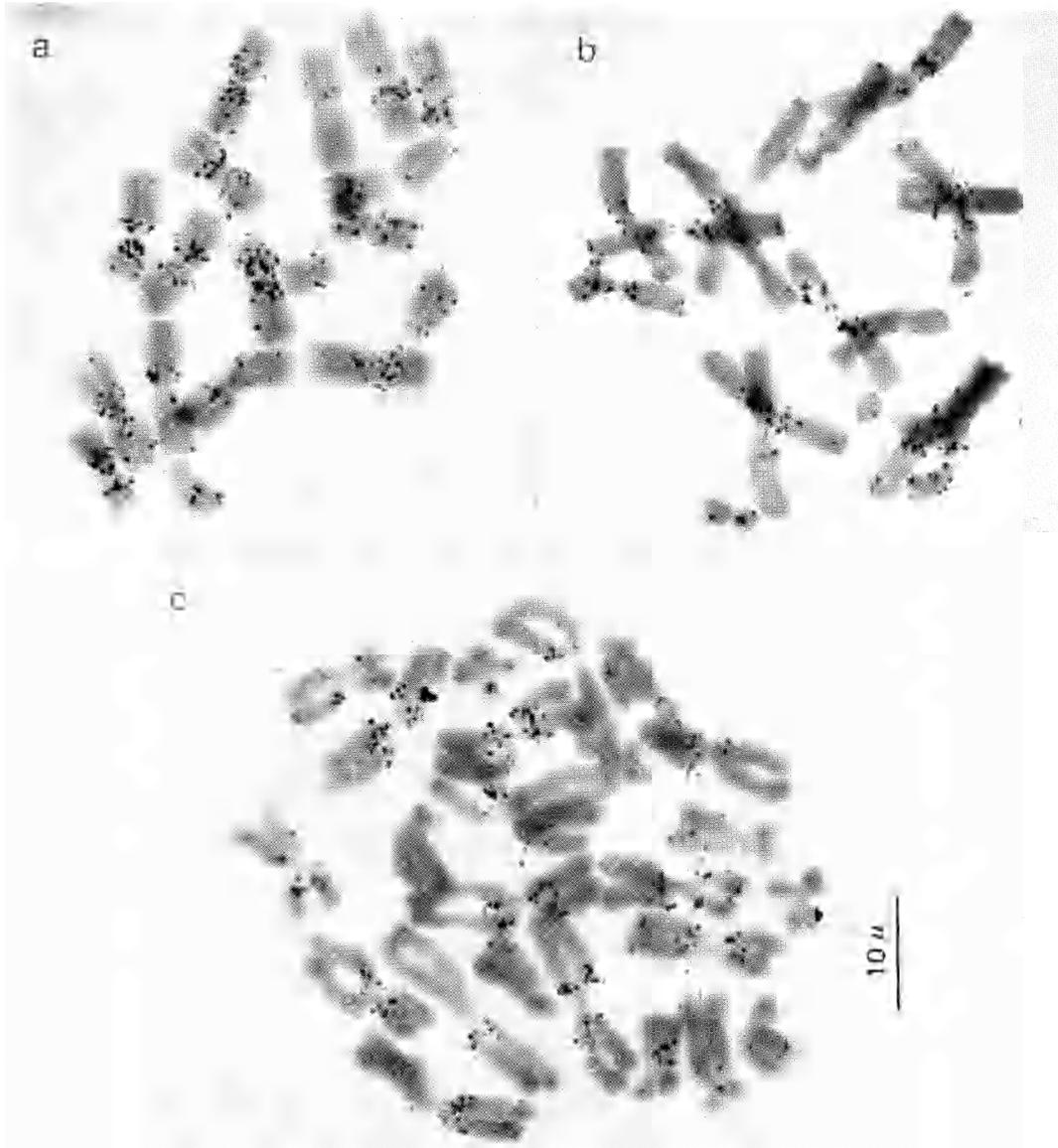
C-bands sui 24 cromosomi di uno spermatogonio di *T. italicus* (a) e Q-bands ottenute dopo denaturazione e rinaturazione su un altro gruppo di cromosomi della stessa specie (b). Notare la coincidenza tra C- e Q-bands. In *T. italicus* la regione centromerica è evidenziata dalle tecniche di bandeggiatura solo sul cromosoma XII (indicato con asterisco).



Cromosomi metafasici di *T. alpestris apuanus* trattati prima con il «Q-staining method» (*a*) e successivamente con il «C-staining method» (*b*). La regione nucleolo-organizzatrice del cromosoma VIII (indicata con freccia) appare fluorescente negativa (*a*) e non colorata dal Giemsa (*b*).



Piastra metafisica spermatogonale di *T. marmoratus*, dopo trattamento con il «C-staining method» (a): la regione eteromorfa dei cromosomi del sesso (indicata con asterisco) appare intensamente colorata con il Giemsa. Tale regione risulta a fluorescenza pallida dopo trattamento con la quinacrine, come si può notare su cromosomi spermatogoniali di *T. marmoratus* (b) e di *T. cristatus carnifex* (c).



Cromosomi metafasici di spermatogoni di un esemplare di *T. v. meridionalis*, 21 h dopo l'iniezione di ^3H -timidina. La marcatura interessa quasi esclusivamente le zone ai lati della regione centromerica, che corrispondono alle bande duplice evidenziate con i diversi metodi di bandeggiatura.