
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

ROBERTO MEZZANOTTE

Modificazioni specifiche indotte da trattamento alcalino-salino nei cromosomi politenici di *Anopheles atroparvus*

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 63 (1977), n.1-2, p.
98–102.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1977_8_63_1-2_98_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. — *Modificazioni specifiche indotte da trattamento alcalino-salino nei cromosomi politenici di Anopheles atroparvus* (*).
Nota (**) di ROBERTO MEZZANOTTE, presentata dal Socio A. STEFANELLI.

SUMMARY. — Polytene chromosomes of *Anopheles atroparvus* were treated with Barium hydroxide and $2 \times$ SSC followed by Giemsa staining. The banding pattern of the sex chromosome and some autosome segments showed a dramatic change. One can in fact observe two kinds of modifications: first, some bands, independently of their thickness, stain more darkly than others, and after chemical treatment tend to lose, at least partially, their affinity for Giemsa; secondly, some band-interband segments stain uniformly, forming new bands not identifiable in the normal banding-pattern. Moreover some bands tend to split into smaller subunits. The modifications described are more marked in the sex chromosome. The results are discussed.

Frizzi (1947 a, b, c; 1953), usando le tradizionali tecniche per l'evidenziazione dei cromosomi salivari dei Ditteri, ottenne il bandeggio dei politenici di alcune specie di *Anopheles* e pose particolare attenzione alla delineazione della mappa cromosomica dell'*Anopheles atroparvus*.

Una revisione del bandeggio di questa specie, eseguita da Farci *et al.* (1973) con la tecnica modificata ⁽¹⁾ di La Cour (1941), portò ad una descrizione più particolareggiata dei cromosomi e ad una suddivisione più dettagliata delle sezioni secondo la nomenclatura adottata da Bridges (1941): il cromosoma del sesso fu suddiviso in 5 sezioni nelle quali furono contate 49 bande. Il braccio destro del II cromosoma fu suddiviso in 10 sezioni in cui il numero totale di bande era di 124 ed il braccio sinistro dello stesso cromosoma fu diviso in altrettante sezioni contenenti pure 124 bande. Il braccio destro del III cromosoma è stato suddiviso in 15 sezioni con 185 bande mentre il braccio sinistro dello stesso cromosoma in 9 sezioni con 85 bande.

Un'ulteriore indagine sul cromosoma del sesso di questa specie ha portato il numero complessivo di bande a 78 (Di Lorenzo *et al.*, 1975) senza però fornire una numerazione per le nuove bande evidenziate. Tale lavoro mostrò inoltre la presenza di « puffs » in regioni specifiche determinandone la frequenza in funzione dell'età larvale.

Con il presente lavoro ci si propone di illustrare alcune modificazioni del bandeggio ottenuto con l'uso di una metodica che consente l'evidenziazione di zone contenenti eterocromatina costitutiva (Arrighi e Hsu, 1971; Newton *et al.*, 1974) in cromosomi metafasici.

(*) Ricerca eseguita nell'Istituto di Biologia Generale (Facoltà di Medicina e Chirurgia) dell'Università di Cagliari.

(**) Pervenuta all'Accademia il 20 luglio 1977.

(1) Alla normale Orceina-acetica veniva aggiunto Acido Lattico all'85% nella proporzione 1 : 1.

MATERIALI E METODI

Sono state usate larve di entrambi i sessi al IV stadio (tre giorni di età) allevate a 21 °C. Le ghiandole salivari erano estratte in Acido Propionico-Etanolo (3 : 1) usando la tecnica di dissezione di Rioux (1958); le ghiandole erano quindi poste per tre minuti in una goccia di una soluzione contenente Acido Propionico-Acido Lattico e H₂O nelle proporzioni 1 : 1 : 2; si eseguiva quindi lo schiacciamento usando coprioggetti siliconati; essi venivano rimossi dopo 7 minuti di permanenza in ghiaccio secco. I preparati di controllo erano osservati e fotografati in contrasto di fase oppure erano colorati con Orceina 0,5 % in soluzione propionico-lattica.

Il trattamento alcalino-salino era eseguito ponendo i vetrini per 10-14 minuti in una soluzione satura di Ba(OH)₂·8 H₂O a 21 °C; dopo un lavaggio di 10 minuti in H₂O distillata, si trattava con 2×SSC (NaCl 17,53 g e Citrato di tri-sodio 8,82 g in 1.000 ml di H₂O) a 65 °C per tre ore.

Dopo essere stati sciacquati ed asciugati, i preparati erano trattati con Xilene e montati in DPX.

Nella nostra indagine si sono considerati il cromosoma del sesso, le regioni centromerica e telomerica del II cromosoma e le regioni telomeriche del III cromosoma.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Cromosoma del Sesso

È da notare che il bandeggio dei controlli fissati in etanolo e Acido Propionico ma non colorati si risolve più nettamente di quello in cui i cromosomi sono colorati con le tecniche standard ma il numero di bande non presenta incremento numerico; il trattamento alcalino-salino pone in evidenza un bandeggio che si differenzia da quello dei controlli e consente la colorazione differenziale di alcune bande mentre alcuni gruppi di bande e interbande assumono l'aspetto di blocchi cromatici localizzati preferibilmente intorno ai «landmarks»; si nota inoltre che alcune bande si risolvono in substrutture banda-interbanda. In particolare si nota quanto segue: la banda 1a₄ assume struttura doppia con interbanda non colorata; la banda 1b₂ risulta molto più cromatica di quella del controllo. Nella zona 1c si pone in evidenza un bandeggio non consueto che viene da noi tentativamente interpretato nel seguente modo: la banda 1c₃ risulta suddivisibile in un complesso di almeno tre bande densamente colorate alternate a due strette interbande; inoltre l'ampia interbanda tra la 1c₂ e la 1c₃ non è presente fondendosi con la banda distale della sezione 1. Nella regione 2, a partire dall'estremità telomerica, compare una successione di complessi, non facilmente identificabili, comprendenti numerose bande-interbande. Il limite fra le sezioni 2 e 3 presenta un ammasso cromatico comprendente la parte distale della zona 3a. La sezione

4 non presenta differenze rispetto al controllo; la zona 5a risulta costituita da un ammasso unico colorabile in cui sono comprese bande e interbande. L'organizzatore nucleolare presenta la stessa morfologia del controllo (Tav. I).

II Cromosoma.

Zona Centromerica: la sezione 15 non presenta modificazioni di struttura; nella sezione 16 (Tav. II, fig. 1) il punto di giunzione centromerica tra i due bracci, che si colora densamente nei controlli, risponde negativamente nei preparati trattati con la metodica alcalino-salina.

Regioni Telomeriche: nelle sezioni 6 e 25 non si notano modificazioni del bandeggio.

III Cromosoma.

Telomero III D: la sezione 26 non presenta differenze tra i preparati trattati ed i controlli; la 27 si risolve invece in quattro blocchi che includono le bande $27a_1$, $27b_1$ (banda doppia), $27c_1$ (banda doppia) e $27d_6$ (Tav. II, fig. 2); attualmente non siamo in grado di determinare se anche le altre bande della sezione con le corrispondenti interbande, che si individuano nei controlli, siano inglobate nei blocchi cromatici oppure se queste non siano più evidenziabili in seguito al trattamento chimico subito.

Telomero III S: la sezione 49 presenta le bande $49a_3$, $49b_1$, $49b_2$ ed il complesso $49b_3$ - $49b_4$ - $49b_5$ simili a quelle del controllo.

La fissazione etanol-propionica pare avere una notevole influenza sulla definizione del bandeggio rispetto a quella ottenuta con fissativi tradizionali senza alterare tuttavia la sequenza del bandeggio stesso; questo trattamento consente una delineazione chiara delle strutture informative anche senza colorazione, in contrasto di fase.

Il trattamento alcalino-salino modifica il bandeggio del cromosoma del sesso e di alcuni dei tratti autosomici considerati. In primo luogo si nota una reazione cromatica differenziale di alcune bande interstiziali che si colorano più intensamente delle altre, indipendentemente dal loro spessore; un differenziamento della struttura del bandeggio è stato descritto nei cromosomi politenici di due specie del Genere *Simulium* (Bedo, 1975). Questo dato pone il problema di strutture considerate funzionalmente eucromatiche (Brown, 1966) che reagiscono in modo simile a quello dell'eterocromatina costitutiva.

Un seconda modificazione del bandeggio standard, non descritta in *Simulium*, consiste nella formazione di complessi banda-interbanda che si colorano omogeneamente e intensamente comportandosi come blocchi cromatici; l'interpretazione di queste strutture può a nostro avviso essere duplice; o alcuni tratti interbanda presentano una struttura cromatinica simile ad alcune bande specifiche, ad essi adiacenti, oppure il trattamento, «rigonfiando» differenzialmente alcune bande, maschera l'interbanda tra queste compresa unificando di fatto il segmento comprendente le bande e l'interbanda. È da notarsi che i complessi cromatici descritti non coincidono con bande che

abbiano una risposta particolarmente positiva al colorante nei preparati di controllo. La risposta omogenea di tratti banda-interbanda trova riscontro nel comportamento duplicativo di questi tratti (Tiepolo *et al.*, 1974): infatti, sia nel cromosoma del sesso che negli autosomi, i segmenti banda-interbanda considerati si comportano come entità omogenee durante tutto il ciclo replicativo.

La terza modificazione del bandeggio, notata solamente nel cromosoma del sesso, e consistente nella risoluzione di alcune bande in strutture banda-interbanda, è a nostro avviso dovuta allo «smascheramento» prodotto dall'idrolisi alcalina di tratti cromatinici discreti.

Per quanto riguarda il significato delle strutture rispondenti in modo selettivamente positivo al Giemsa non abbiamo evidenze che ci consentano di affermare che esse rappresentino zone di eterocromatina costitutiva, anche se eterocromatiche «sensu lato» possono definirsi tutte le aree cromosomiche cui si legano molto fortemente i coloranti basici per la cromatina (Heitz, 1934).

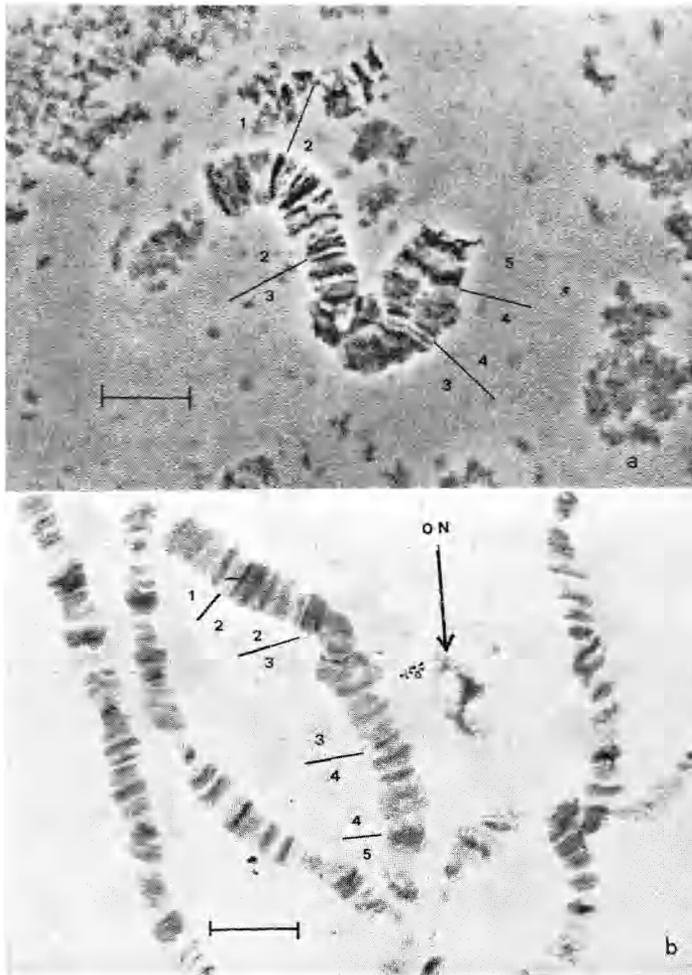
La frequenza delle bande con maggiore positività è notevole sul cromosoma del sesso ma non vi sono prove sulla presenza di queste bande nelle regioni centromeriche che, come è noto, sono prive di cromocentro ed in cui si nota correlatamente la mancanza di zone intensamente fluorescenti dopo colorazione con Cloruro di Quinacrina (Mezzanotte, 1976, dati non pubblicati). Si verifica quindi una situazione non analoga a quella propria di *Drosophila* in cui il cromocentro stesso, punto d'incontro e di fusione dei singoli centromeri includente i bracci eterocromatici dell'X ed il cromosoma Y, presenta zone che rispondono positivamente a questo fluorocromo e comunque in modo diverso da quello tipico della quasi totalità delle bande dei bracci cromosomici. La situazione presente in *Anopheles atroparvus* è anche diversa da quella riscontrabile in altre specie di Ditteri in cui non esiste cromocentro e nei quali però si notano segmenti considerati eterocromatici (ad esempio le regioni telomeriche) in base a caratteristiche quali lo «ectoping pairing» (Kaufmann e Iddles, 1963) o l'asincronia replicativa (Hagele, 1970). Si noti che alcuni di questi segmenti eterocromatici contengono DNA satellite (Hennig *et al.*, 1970) e possono mostrare intensa fluorescenza dopo colorazione con Quinacrina (Barr e Ellison, 1972).

Negli autosomi, complessivamente, si nota un considerevole numero di bande selettivamente positive al Giemsa; tuttavia queste non presentano un intenso salto d'intensità rispetto a quelle con colorazione meno intensa; tale risposta al trattamento alcalino-salino è notevolmente diversa da quella ottenuta da Bedo (1975) anche se la tecnica da noi usata è in effetti simile a quella descritta dall'Autore, che definisce le bande intensamente colorate col Giemsa come bande C. È nostra opinione che i dati ottenuti in *A. atroparvus* non ci consentono di affermare alcunché sul significato strutturale e funzionale della cromatina che presenta il comportamento differenziale; tuttavia i nostri dati, correlati a quelli ottenuti precedentemente (Fraccaro *et al.*, 1976) in cui si pone in evidenza la scarsa quantità di eterocromatina centromerica costitutiva degli autosomi metafisici, consentono un primo approccio al problema delle

relazioni strutturali che intercorrono tra i cromosomi mitotici ed i politenici e quello della distribuzione e del significato dei diversi tipi di cromatina in questi ultimi.

BIBLIOGRAFIA

- ARRIGHI F. E. e HSU T. C. (1971) - «Cytogenetics», 10, 81-86.
BARR H. J. e ELLISON J. R. (1972) - «Chromosoma», 39, 53-61.
BEDO D. G. (1975) - «Chromosoma», 51, 291-300.
BRIDGES C. B. (1941) - «Journ. Hered.», 32, 299-300.
BROWN S. W. (1966) - «Science», 151, 417-425.
DI LORENZO C., FALCHI A., GHIANI P. e MEZZANOTTE R. (1975) - «Rassegna Medica Sarda», 78, 417-426.
FARCI A., LAUDANI U. e LECIS A. R. (1973) - «Z. zool. Syst. Evolut.-forsch.», 11, 304-310.
FRACCARO M., LAUDANI U., MARCHI A. e TIEPOLO L. (1976) - «Chromosoma», 55, 27-36.
FRIZZI G. (1974a) - «Scienza Genetica», 111, 67-79.
FRIZZI G. (1974b) - «Scienza Genetica», 111, 80-88.
FRIZZI G. (1947c) - «Nature», 160, 226.
FRIZZI G. (1953) - «Nature», 171, 1072.
HAGELE K. (1970) - «Chromosoma», 31, 91-138.
HEITZ E. (1934) - «Biol. Zentralbl.», 54, 588.
HENNIG W., HENNIG I. e STEIN H. (1970) - «Chromosoma», 32, 31-63.
KAUFMANN B. P. e IDDLIS M. K. (1963) - «Port. Acta Biol.», Ser. A, 7, 225.
LA COUR L. (1941) - «Stain Technology», 16, 169-174.
NEWTON M. E., SOUTHERN D. I. e WOOD R. J. (1974) - «Chromosoma», 49, 41-49.
RIOUX J. A. (1958) - «Le Culicides», P. Lechevalier, Ed. Paris.
TIEPOLO L., DIAZ G. e LAUDANI U. (1974) - «Chromosoma», 45, 81-89.



Cromosoma del sesso come appare nel controllo (*a*) e dopo trattamento con la metodica alcalino-salina (*b*). Come descritto nei Risultati si nota la differente struttura del bandeggio nei due tipi di preparati.

ON = Organizzatore nucleolare ($5\delta_3$). Il segmento rappresenta il valore di 10μ .

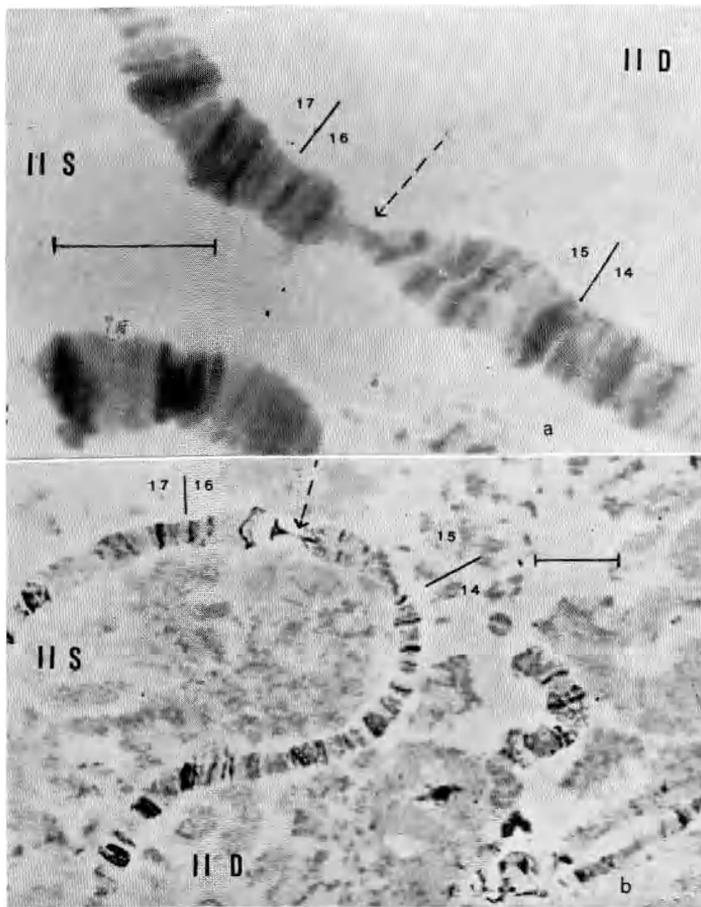


Fig. 1. - Regione centromerica del II cromosoma in preparati trattati (a) e nei controlli (b). La freccia indica il tratto centromerico che appare densamente colorato nel controllo mentre reagisce negativamente al Giemsa dopo il trattamento alcalino-salino. Ciascun segmento rappresenta il valore di 10 μ m.

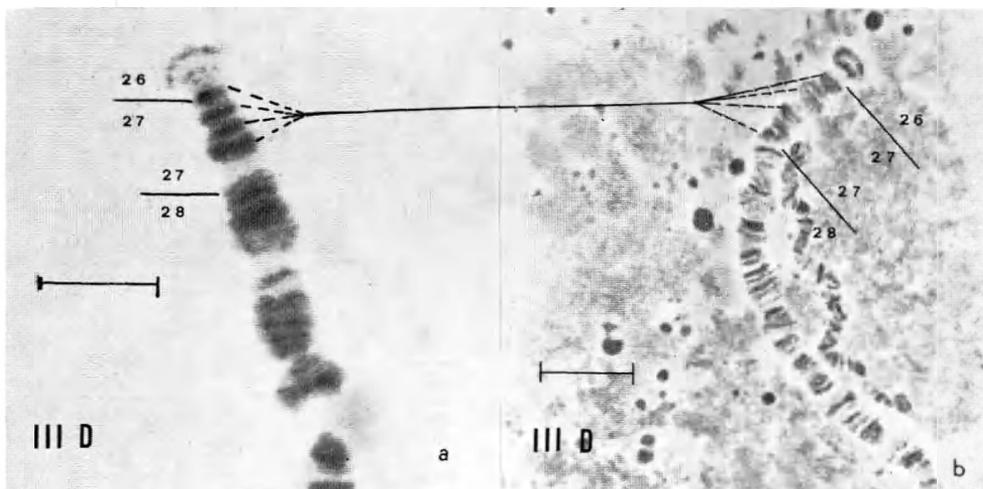


Fig. 2. - Regione del telomero del cromosoma III D dopo il trattamento alcalino-salino (a) e nel controllo (b). È indicata la zona della sezione 27 in cui si nota la condensazione di alcuni tratti banda-interbanda in blocchi cromatici; questa non è presente nel controllo. Il segmento rappresenta il valore di 10 μ m.