
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

IVANA LAZZARETTO, ANGELO LIBERTINI

**Organizzatori nucleolari in *Tisbe biminiensis*
Copepoda, Harpacticoida). Prime osservazioni**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 82 (1988), n.1, p. 125–129.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1988_8_82_1_125_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/>

SEZIONE III

(Botanica, zoologia, fisiologia e patologia)

Atti Acc. Lincei Rend. fis.
(8), LXXXII (1988), pp. 125-129

Zoologia. — *Organizzatori nucleolari in Tisbe biminiensis (Copepoda, Harpacticoida)*. Prime osservazioni. Nota di IVANA LAZZARETTO e ANGELO LIBERTINI, presentata (*) dal Corrisp. B. BATTAGLIA.

ABSTRACT. — *Nucleolar organizer regions in Tisbe biminiensis (Copepoda, Harpacticoida)*. *First results*. In the species *Tisbe biminiensis* with the aid of the silver staining technique it has been ascertained the presence of nucleolar organizer regions in the telomeres of two pairs and in the median zone of another pair of chromosomes. This species results differentiated from the others until now studied owing to the presence of a median NOR and in the greater evidence of these regions during the prophase.

KEY WORDS: NORs; Caryology; Copepods.

RIASSUNTO. — Con l'applicazione della tecnica di colorazione con AgNO_3 si è verificata la presenza in *Tisbe biminiensis* sia di organizzatori nucleolari nei telomeri di due paia che nella parte mediana di un terzo paio di cromosomi. Questa specie risulta differenziata dalle altre studiate per la presenza di un NOR mediano e la maggiore evidenza e permanenza, durante la profase, delle regioni dell'organizzatore nucleolare.

Il corredo cromosomico di *Tisbe biminiensis* è costituito da $2n = 16$ cromosomi di dimensioni notevoli (almeno due volte più lunghi di quelli descritti nelle altre specie) e tutti metacentrici (Lazzaretto-Colombera *et al.*, 1976; Lazzaretto, 1983).

La recente introduzione della tecnica di sospensione cellulare su materiale colchicinizzato (Lazzaretto e Libertini, 1986; Lazzaretto and Libertini, in stampa) e la conseguente possibilità di applicare alcune delle moderne tecniche di colorazione ci ha portato a riesaminare alcune delle specie già studiate nel tentativo di arrivare ad una caratterizzazione più approfondita del loro cariotipo.

Tisbe biminiensis è una specie che, dal punto di vista carilogico, si differenzia nettamente da tutte le altre non solo per il numero, le dimensioni e la morfologia dei cromosomi (Lazzaretto, 1983), ma anche per la assenza di costrizioni secondarie in *c*-metafase e per la persistenza del nucleolo in profase meiotica molto avanzata.

Nelle specie congeneri l'applicazione di tecniche specifiche ha dimostrato

(*) Nella seduta del 19 giugno 1987.

che la costrizione secondaria è la sede dell'organizzatore nucleolare (Lazzaretto e Libertini, in prep.); pertanto in considerazione della documentata proprietà degli organizzatori nucleolari di variare per numero, dimensioni e localizzazione cromosomica nelle diverse specie (Goodpasture and Bloom, 1975; King, 1980; Sessions and Kezer, 1987; Wallace e Newton, 1987) abbiamo ripreso lo studio cariologico con l'impiego della tecnica di colorazione con AgNO_3 oltre che per poter ricavare informazioni più approfondite sul cariotipo di questa specie anche per verificare se le peculiarità di comportamento da essa manifestate fossero il riflesso di differenze a livello strutturale.

Abbiamo applicato la tecnica della colorazione differenziale con AgNO_3 che determina la precipitazione elettiva dei grani di argento sugli organizzatori nucleolari e che è stata collaudata da tempo per questo genere di ricerche anche su Crostacei (Di Castro *et al.*, 1982).

MATERIALI E METODI

Gli animali utilizzati provengono da popolazioni di laboratorio mantenute da alcuni anni con il metodo standard (Battaglia, 1970). Queste popolazioni hanno preso origine da centinaia di individui pescati a Bimini (Bahamas).

Le osservazioni sono state condotte su femmine che provenivano da colture di massa sincronizzate alla nascita in modo da operare su uova appartenenti al primo o secondo sacco ovigero che, dal punto di vista cariologico, risultano i più prolifici.

Per poter disporre di zigoti alla prima o seconda divisione embrionale le femmine vengono prelevate dalle colture 2 ore dopo l'emissione del sacco ovigero; a questo scopo le colture devono essere controllate regolarmente ogni due ore.

I preparati cromosomici sono stati allestiti utilizzando la tecnica descritta da Lazzaretto e Libertini (1986).

Per la colorazione con AgNO_3 è stato utilizzato il metodo proposto da Howell e Black (1980).

Le osservazioni ed i conteggi sono stati effettuati su un centinaio di profasi ed altrettante metafasi provenienti da una ottantina di individui.

Osservazioni e foto sono state eseguite con un fotomicroscopio Zeiss III a contrasto di fase e 1250 ingrandimenti.

RISULTATI

La presenza di organizzatori nucleolari è stata verificata in tutte le profasi delle mitosi embrionali esaminate. In questo stadio si riscontrano normalmente da 3 a 5 zone pigmentate intensamente di nero mentre il resto del cromosoma risulta colorato di giallo; queste zone a pigmentazione differenziale occupano una frazione cospicua del cromosoma (Tav. I). Essendo le zone pigmentate

presenti in numero variante tra 3 a 5, il numero di coppie che portano NORs in questa specie corrisponde almeno a 2. In questa fase la zona centromerica non risulta differenziata dal resto del cromosoma.

Il numero di nucleoli rilevabile nelle piastre profasiche varia da 1 a 3 e il numero di cromosomi associati ad un nucleolo generalmente corrisponde a due. Questa associazione al nucleolo avviene prevalentemente in corrispondenza dei telomeri, in certe piastre, tuttavia, si è rilevata l'associazione al nucleolo di una zona mediana con impregnazione positiva; in questi casi il cromosoma appare ripiegato a V in corrispondenza della zona pigmentata che aderisce al nucleolo (Tav. I, figg. 2, 3).

I nucleoli in formazione appaiono di grandi dimensioni e colorati poco intensamente, quelli maturi risultano invece più piccoli e fortemente impregnati (Tav. I, fig. 3).

L'attività di sintesi dell'organizzatore nucleolare (Tav. I, figg. 2, 3) è riscontrabile fino alla tarda profase, all'inizio della metafase sembra avere un rapido declino deducibile dalla rapida diminuzione delle dimensioni relative dell'organizzatore nucleolare stesso.

Nella metafase la presenza di organizzatori nucleolari risulta meno frequente; nelle piastre in cui appaiono evidenti delle zone pigmentate differenzialmente esse presentano dimensioni limitate.

Le piastre in cui l'azione denaturante del calore appare più evidente (in esse i cromosomi risultano più pallidi, rigonfiati e con i contorni evanescenti) presentano in corrispondenza della zona mediana due masserelle appaiate, colorate intensamente di nero; in una frazione corrispondente al 10%, oltre alla zona paracentromerica risulta differenziata anche la zona telomerica per la presenza di due piccole masse intensamente pigmentate, pressoché identiche a quelle che occupano la zona centromerica.

DISCUSSIONE

Questa prima serie di osservazioni condotte su materiale trattato con AgNO_3 ha messo in evidenza che anche in *Tisbe biminiensis* le regioni dell'organizzatore nucleolare possono essere riconosciute senza difficoltà soprattutto in piastre profasiche. In questo stadio si può sempre accertare la presenza di NORs in corrispondenza dei telomeri di due coppie e meno frequentemente la presenza di un altro organizzatore nucleolare in corrispondenza della regione mediana di una terza coppia. La presenza di organizzatori nucleolari nella regione mediana del cromosoma è stata riscontrata in altri gruppi di organismi, ad esempio recentemente nel genere *Aeneides* (Session and Kezer, 1987).

Mentre durante la profase le zone telomeriche pigmentate elettivamente risultano evidenti in tutte le piastre disponibili, nella successiva metafase il fenomeno appare più limitato sia per la diminuita frequenza di zone telomeriche positive sia per le loro dimensioni più ridotte. Queste zone telomeriche inoltre si riscontrano esclusivamente in quelle piastre che presentano la zona mediana

impregnata positivamente. È da rilevare che questa zona risulta dello stesso aspetto in entrambe le localizzazioni e più precisamente assume la forma di due masserelle appaiate di colore nero intenso.

La impregnazione contemporanea o esclusiva dei centromeri è un fenomeno riscontrato normalmente con l'impiego di questa tecnica (Denton *et al.*, 1977; Wallace and Newton, 1987).

Come si è già rilevato l'interesse degli studi sull'organizzatore nucleolare risiede nel fatto che parecchi Autori hanno dimostrato che i cariotipi di specie distinte possono essere riconosciuti anche sulla base del numero, localizzazione e forma degli organizzatori nucleolari.

Una riprova diretta si può ricavare dal confronto di questi dati con quelli relativi alle specie *Tisbe holothuriae* e *T. battagliai* (Lazzaretto e Libertini, in prep.). In queste due specie si è innanzi tutto osservato che la presenza di zone telomeriche colorate elettivamente è costante in profase come in *Tisbe biminiensis* ma, a differenza di questa, è molto più frequente in metafase, per di più in questo stadio le zone positive risultano più evidenti e, soprattutto in *Tisbe holothuriae*, occupano una porzione molto estesa del cromosoma. D'altra parte anche in queste due specie si rileva la presenza in metafase di zone centromeriche a pigmentazione differenziale.

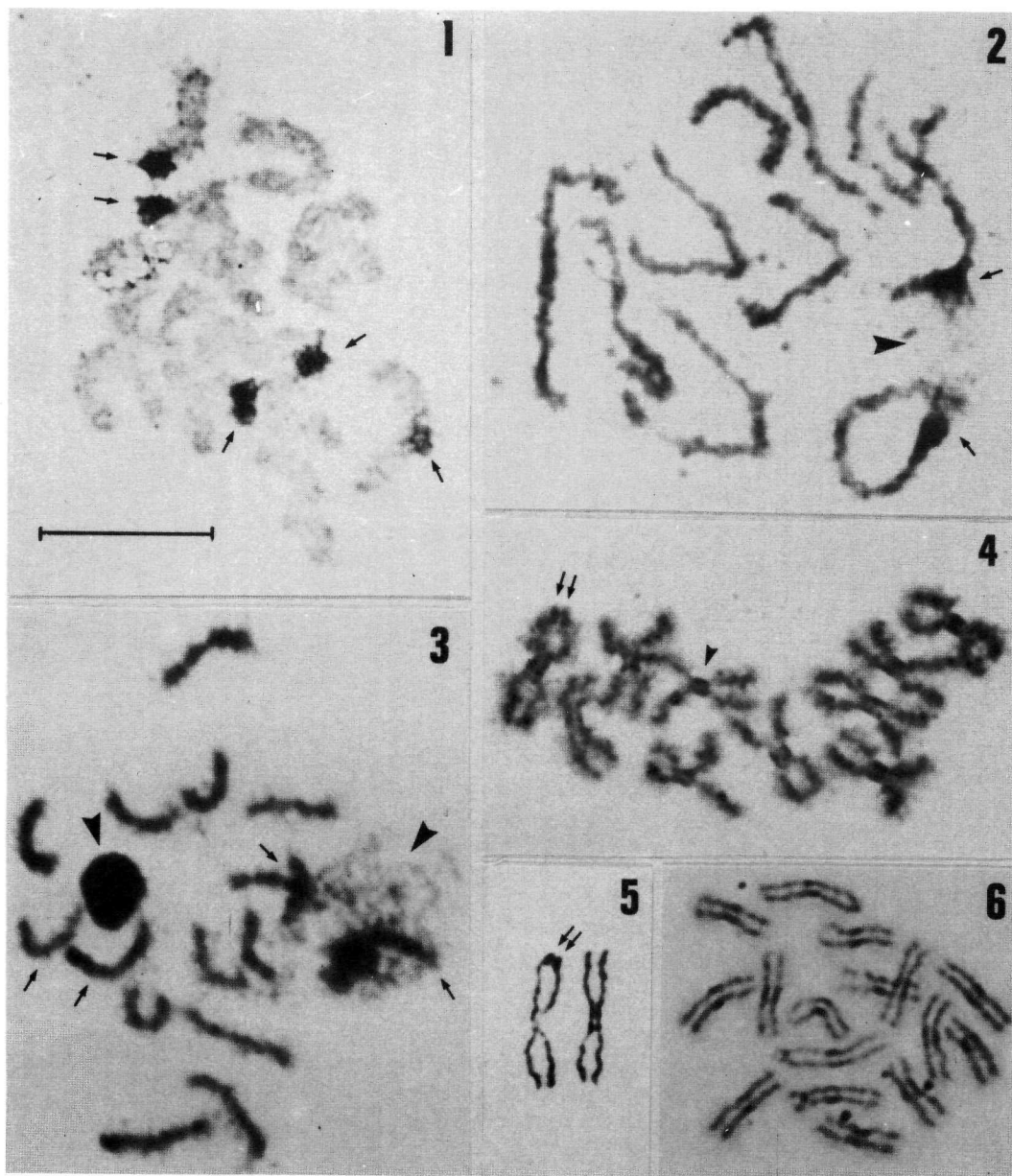
Si è verificato inoltre che in *Tisbe holothuriae* e *T. battagliai* sono presenti due organizzatori nucleolari che corrispondono ai satelliti che, come si è detto prima, in questa specie si osservano normalmente nelle c-metafasi. La impossibilità di evidenziare i satelliti nelle c-metafasi non trattate di *Tisbe biminiensis* può essere determinata dalla estrema riduzione dell'organizzatore nucleolare in questa fase del ciclo mitotico.

Tisbe biminiensis si differenzia ancora da queste specie per la presenza, durante la profase, di una coppia con una estesa zona mediana impregnata positivamente e considerata corrispondere ad un terzo organizzatore nucleolare che non sarebbe presente nelle altre specie considerate.

Un'altra differenza risiede nel maggior numero di nucleoli evidenziato in *Tisbe biminiensis* e nella loro permanenza fino alla tarda profase.

BIBLIOGRAFIA

- T.E. DENTON, W.R. BROOKE e W.M. HOWELL (1977) - *A technique for simultaneous staining of both nucleolar organizer regions and kinetochores of human chromosomes with silver*. Stain Technol. 52, 311-313.
- M. DI CASTRO, G. PRANTERA, L. CIPRIANI, V. LANZA e A. ROCCHI (1982) - *Attività degli organizzatori nucleolari durante la spermatogenesi di Asellus aquaticus studiata per mezzo della Ag-colorabilità*. «Atti Assoc. Genetica Italiana», 28, 149-151.
- C. GOODPASTURE e S.E. BLOOM (1975) - *Visualization of Nucleolar Organizer Regions in Mammalia Chromosomes Using Silver Staining*. «Chromosoma», 53, 37-50.
- W.M. HOWELL e D.A. BLACK (1980) - *Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method*. «Experientia», 36, 1014-1015.



- M. KING (1980) - *C-Banding Studies on Australian Hylid: Secondary Constriction Structure and the Concept of Euchromatin Transformation*. « Chromosoma », 80, 191-217.
- I. LAZZARETTO (1983) - *Karyology and chromosome evolution in the genus Tisbe (Copepoda)*. « Crustaceana », 45, 85-95.
- I. LAZZARETTO et A. LIBERTINI (1986) - *Les caryotypes de deux populations du genre Tisbe (Copepoda, Harpacticoida) des Iles Kerguelen*. « Vie et Milieu », 36, 91-95.
- I. LAZZARETTO and A. LIBERTINI - *Chromosomal differentiation in two reproductively isolated populations of the superspecies Tisbe clodiensis (Copepoda, Harpacticoida)*. « Biol. Zbl. », in stampa.
- I. LAZZARETTO e A. LIBERTINI - *Gli organizzatori nucleolari di due specie gemelle appartenenti al genere Tisbe (Copepoda)*. In preparazione.
- I. LAZZARETTO-COLOMBERA, D. COLOMBERA e G. PITACCO (1976) - *La cariologia della specie Tisbe biminiensis (Copepoda, Harpacticoida)*. « Atti Acc. Naz. Lincei », 60, 303-308.
- S.K. SESSION e J. KEZER (1987) - *Cytogenetic evolution in the plethodontid salamander genus Aneides*. « Chromosoma », 95, 17-30.
- A.J. WALLACE e M.E. NEWTON (1987) - *Heterochromatin diversity and cyclic responses to selective silver staining in Aedes aegypti (L.)*, « Chromosoma », 95, 89-93.

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA I

- Fig. 1. - *Tisbe biminiensis*, microfotografia di prometafase mitotica: le frecce indicano gli organizzatori nucleolari. La barra rappresenta 10 micrometri e vale per tutte le figure.
- Fig. 2. - *Tisbe biminiensis*, microfotografia di profase iniziale mitotica: le frecce piccole indicano gli organizzatori nucleolari; la freccia triangolare un nucleolo in formazione.
- Fig. 3. - *Tisbe biminiensis*, microfotografia di tarda profase mitotica: le frecce piccole indicano elementi associati al nucleolo; le frecce triangolari indicano i nucleoli.
- Fig. 4. - *Tisbe biminiensis*, microfotografia di 10 elementi in metafase: le frecce piccole indicano gli organizzatori nucleolari; la freccia triangolare indica le bande in zona paracentromerica di un elemento.
- Fig. 5. - *Tisbe biminiensis*, microfotografia di due elementi in metafase: le frecce indicano gli organizzatori nucleolari.
- Fig. 6. - *Tisbe biminiensis*, microfotografia di metafase mitotica: in tutti gli elementi sono visibili le bande in zona paracentromerica.