

L. VITELLI (*), S. DE LUCCHINI (*), R. BATISTONI (*)

BANDEGGIO CROMOSOMICO IN ALCUNE SPECIE DI ANFIBI ANURI. II. « N-BANDING »

Riassunto — E' stata applicata la tecnica delle N-bande ai cromosomi di tre specie di Anuri di diversa posizione sistematica (*Bombina variegata*, *Rana esculenta* e *Bufo xeros*) con lo scopo di chiarire se negli Anfibi le N-bande corrispondono specificatamente alle NORs, oppure anche ad altre regioni cromosomiche. I risultati mostrano che il locus cromosomico che in ciascuna specie viene colorato con l'« N-banding » corrisponde esattamente a quello rivelato da nostri precedenti esperimenti di ibridazione molecolare *in situ* con ^3H 18S + 28S rRNA. Tuttavia, occasionalmente compaiono N-bande addizionali in corrispondenza di bande C-positive. Questi risultati sono discussi in rapporto alle condizioni usate nella procedura di « N-banding » e alla interpretazione molecolare delle N-bande.

Abstract — *Chromosome banding in some species of anuran Amphibians. II. N-banding.* The N-banding procedure, which is considered to stain selectively the NORs, has been applied to the chromosomes of three anuran amphibians of different taxonomic position: *Bombina variegata*, *Rana esculenta* and *Bufo xeros*. As a result, in each species the only locus consistently marked by an N-band was the NOR, as identified by our previous *in situ* hybridization experiments. This demonstrates the specificity of the N-banding in these species. Occasionally, however, few heterochromatic segments were also differentially stained.

These results are discussed in relation to the procedure and to the available information on the molecular basis of N-banding.

Key words — N-banding; nucleolus organizer regions; Anura.

INTRODUZIONE

Come è noto, ogni corredo cromosomico eucariotico contiene specifici loci deputati alla formazione del nucleolo, e per questo

(*) Istituto di Istologia ed Embriologia dell'Università di Pisa.

denominati regioni nucleolo-organizzatrici (NORs⁽¹⁾). La prima individuazione delle regioni organizzatrici del nucleolo nei cromosomi di varie specie animali e vegetali è stata ottenuta analizzando i rapporti di contiguità esistenti tra determinate regioni cromosomiche ed il nucleolo, in cellule in profase iniziale (HEITZ, 1931; McCLINTOCK, 1934). Accurate indagini cariologiche hanno successivamente mostrato che le NORs spesso coincidono con alcune delle costrizioni secondarie presenti nei cromosomi metafasici (cfr. FERGUSON-SMITH, 1964; HSU et al., 1967).

A questi classici studi cariologici, è seguita la dimostrazione con metodi genetici e biochimici, che le regioni nucleolo-organizzatrici contengono il DNA che codifica per gli RNA ribosomali 18S + 28S (rDNA) (BROWN e GURDON, 1964; RITOSSA e SPIEGELMAN, 1965; WALLACE e BIRNSTIEL, 1966). L'introduzione, relativamente recente, di tecniche di ibridazione molecolare *in situ* ha fornito un mezzo diretto per evidenziare le NORs in un corredo cromosomico, mediante « visualizzazione » autoradiografica dell'rDNA in esse contenuto (GALL e PARDUE, 1969; JOHN et al., 1969). Negli ultimi anni, sono stati messi a punto metodi per la colorazione selettiva delle NORs: la tecnica delle N-bande (MATSUI e SASAKI, 1973; FUNAKI et al., 1975) e tecniche che fanno uso di soluzioni ammoniacali di argento (HOWELL et al., 1975; GOODPASTURE e BLOOM, 1975).

Per quanto riguarda la prima di queste colorazioni selettive (« N-banding »), è stata inizialmente avanzata l'ipotesi che essa dipenda da specifiche proteine non istoniche legate alla regione nucleolo-organizzatrice (MATSUI e SASAKI, 1973). Questa interpretazione è stata criticata da FAUST e VOGEL (1974), che non hanno trovato un'esatta coincidenza tra NORs e N-bande in alcune specie di mammiferi. Questi Autori hanno suggerito che le N-bande corrispondono ad una specifica classe di eterocromatina localizzata in molti, ma non in tutti i casi, in prossimità delle NORs. In seguito, FUNAKI et al. (1975) hanno sviluppato una variante dell'originale metodo di « N-banding », e con queste tecniche hanno studiato i cromosomi di 27 differenti specie di animali e piante: i risultati ottenuti hanno fornito a questi Autori una conferma dell'originale interpretazione di MATSUI e SASAKI (1973). Più recentemente, studi condotti

(¹) Abbreviazioni: NOR = regione nucleolo-organizzatrice; rRNA = RNA ribosomale; rDNA = DNA che codifica per il 18S + 28S rRNA, compresi gli « spacers » trascritti e non trascritti.

su cromosomi metafasici di varie specie di *Drosophila* hanno mostrato che le N-bande non corrispondono soltanto alle regioni nucleolo-organizzatrici (PIMPINELLI et al., 1976); inoltre, un'analisi più fine, condotta sui cromosomi politecnici di *Chironomus* e *Drosophila*, ha dimostrato che l'« N-banding » oltre a colorare intensamente il nucleolo, mette in evidenza sia l' α -eterocromatina [nella quale è localizzata la regione nucleolo-organizzatrice (HEITZ, 1934; RAE, 1970)] che regioni in cui sono presenti i « puffs » (HAGELE, 1977).

L'insieme di questi risultati rende non univoca l'interpretazione della natura delle N-bande. Un'importante verifica della specificità, o meno, del rapporto tra N-bande e NORs può derivare dal confronto dei risultati di « N-banding » con quelli ottenuti localizzando i geni che codificano per il 18S + 28S rRNA mediante ibridazione *in situ*, nella stessa specie. Questa verifica è stata ottenuta solo in alcune delle tante specie esaminate.

Per quanto riguarda gli Anfibi, l'« N-banding » è stato applicato in due sole specie di Urodeli, *Hynobius retardatus* (FUNAKI et al., 1975) e *Andrias japonicus* (MORESCALCHI et al., 1977), e in due specie di Anuri, *Xenopus laevis* e *Rana chensinensis* (MATSUI, 1974; FUNAKI et al., 1975). Solo in *Xenopus laevis*, è stata anche determinata la localizzazione cromosomica dei geni per il 18S + 28S e per il 5S rRNA mediante ibridazione molecolare *in situ* (PARDUE, 1973; PARDUE et al., 1973). In questa specie è stato trovato che le N-bande non solo coincidono con le regioni nucleolo-organizzatrici, ma anche con i *loci* che contengono i geni per il 5S rRNA (MATSUI, 1974).

Con lo scopo di chiarire se negli Anfibi le N-bande corrispondono specificamente alle NORs od anche ad altre regioni cromosomiche (es. *loci* per il 5S rRNA; zone eterocromatiche), abbiamo applicato l'« N-banding » ai cromosomi di tre specie di Anuri di diversa posizione sistematica: *Bombina variegata* (Discoglossidae), *Rana esculenta* (Ranidae) e *Bufo xeros* (Bufonidae). In queste stesse specie, mediante esperimenti di ibridazione molecolare *in situ*, abbiamo precedentemente determinato la localizzazione cromosomica dei geni per il 18S + 28S rRNA; in *Bombina variegata* e *Rana esculenta* abbiamo anche localizzato i geni per il 5S rRNA (VITELLI et al., 1981).

Per queste specie esistono, inoltre, informazioni sulla distribuzione cromosomica dell'eterocromatina costitutiva (SCHMID, 1978, 1980; per *Bufo xeros* fig. 3b): ciò consente di confrontare la localiz-

zazione delle N-bande con quella delle regioni eterocromatiche della stessa specie.

MATERIALI E METODI

Animali. Sono state esaminate tre specie di anuri di diversa posizione sistematica: *Bombina variegata* (L.), appartenente alla famiglia Discoglossidae; *Rana esculenta* (L.), della famiglia Ranidae; *Bufo xeros* (Tandy) appartenente alla famiglia Bufonidae. Per gli esperimenti di « N-banding » sono stati usati due individui maschi sia per *Bombina variegata* (provenienza: Cardoso di Stazzema, Massa) che per *Rana esculenta* (provenienza: Madonna dell'Acqua, Pisa). Sono inoltre stati analizzati un maschio ed una femmina di *Bufo xeros* provenienti da Mogadiscio (Somalia).

Preparati citologici. Per l'allestimento dei preparati citologici è stata usata la tecnica specificata in un nostro precedente lavoro (cfr. DE LUCCHINI et al., 1981).

N-banding. Per ottenere le N-bande, è stato usato il metodo di FUNAKI et al. (1975), che consiste nell'incubare i preparati a $96 \pm 1^\circ\text{C}$ per 15 minuti in una soluzione di NaH_2PO_4 1M (pH $4,2 \pm 0,2$). Dopo lavaggio in acqua distillata, i preparati sono stati colorati con Giemsa (diluito 1:20 in 1/100 M di tampone fosfato, pH 7) e montati in Permout.

Analisi dei cariotipi. In ciascuna specie sono state esaminate almeno venti metafasi mitotiche per individuo; nei maschi, informazioni sono state tratte anche dalle osservazioni delle figure meiotiche. Le metafasi migliori sono state fotografate ed è stato costruito il cariotipo di ciascuna specie in accordo a precedenti dati cariotipici (cfr. MORESCALCHI, 1973); alcune modifiche sono state introdotte nel cariotipo di *Bufo xeros* (cfr. VITELLI et al., 1981).

RISULTATI

N-bande. Dopo applicazione della tecnica di « N-banding » ai cromosomi mitotici e meiotici di *Bombina variegata*, *Rana esculenta* e *Bufo xeros*, la grande maggioranza (95%) delle metafasi osservate ha mostrato una sola N-banda per cariotipo aploide in tutte e tre le specie. Tuttavia, in ciascuna specie si osservano occasionalmente altre regioni cromosomiche colorate differenzialmen-

te con questo metodo: frequentemente, queste regioni corrispondono a bande C-positive.

In *Bombina variegata*, l'N-banda è localizzata in una posizione intercalare, vicino al centromero, sul braccio corto del cromosoma VII. In uno dei due individui analizzati, i due omologhi VII, sono « eterozigoti » per quanto riguarda la grandezza delle N-bande (Fig. 1b e c).

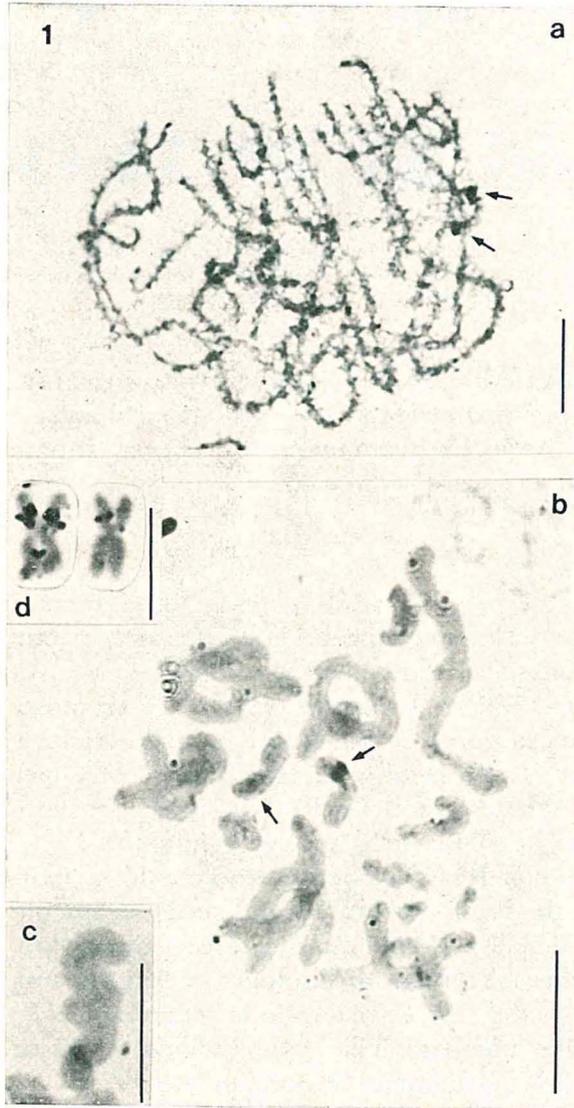


Fig. 1 - Preparati citologici di *Bombina variegata* ottenuti da testicolo dopo applicazione di « N-banding » (a, b e c) e dopo ibridazione molecolare *in situ* con ^3H 18S + 28S rRNA (d).

a) Profase meiotica (zigotene): sono evidenziate due distinte N-bande (freccia).

b) Prima metafase meiotica: l'N-banda è localizzata in una posizione intercalare sul braccio corto della VII coppia. In questo individuo (σ C) l'N-banda è di diversa grandezza sui due omologhi (freccia).

c) Bivalente VII ottenuto da un'altra metafase meiotica del σ C in cui è particolarmente evidente la differenza di grandezza della N-banda nei due omologhi.

d) Coppia cromosomica VII ottenuta da una metafase mitotica di preparati citologici del σ C sottoposti ad autoradiografia dopo ibridazione *in situ* con ^3H 18S + 28S rRNA: i due cromosomi omologhi presentano una diversa densità di grani autoradiografici a livello della NOR. Le sbarrette rappresentano 10 μm .

In *Rana esculenta* una evidente N-banda è localizzata a livello dell'ampia costrizione secondaria presente, in posizione intercalare, sul braccio lungo della coppia cromosomica X (Fig. 2).

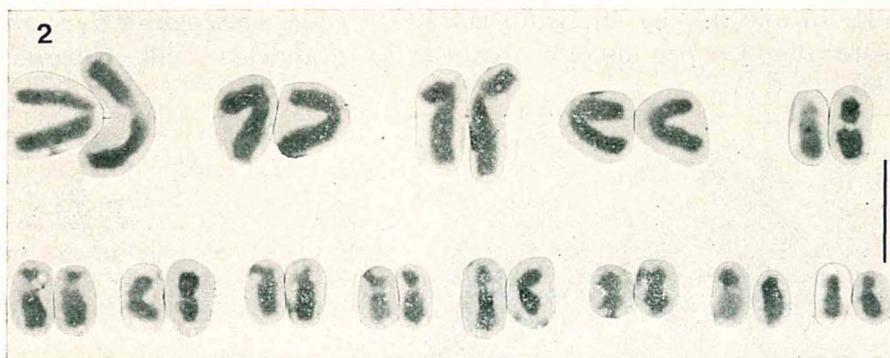


Fig. 2 - Cariotipo di *Rana esculenta* ottenuto da metafase spermatogoniale dopo applicazione di « N-banding »: è presente una sola N-banda in posizione intercalare sul braccio lungo della coppia X. La sbarretta rappresenta 10 μ m.

In *Bufo xeros* l'N-banda è localizzata vicino al centromero, sul braccio lungo della VI coppia. In alcune metafasi una N-banda è stata osservata anche a livello di una regione C-positiva, situata sul braccio corto della III coppia (Fig. 3a e b).

DISCUSSIONE

La tecnica delle N-bande è stata inizialmente applicata ai cromosomi metafasici di alcune specie di mammiferi e anfi, da MATSUI e SASAKI (1973) e MATSUI (1974). Nel metodo originale, i cromosomi erano colorati con Giemsa dopo trattamento con acido tricloroacetico al 5% (a 95°C per 30 m) seguito da HCl 0,1N (a 60°C per 30 m): questa procedura, che estrae DNA, RNA e istoni, permette di colorare specificamente le NORs delle specie esaminate.

Poiché il trattamento con HCl modifica notevolmente la morfologia dei cromosomi, gli stessi Autori hanno successivamente usato una variante dell'originale « N-banding ». Questa seconda procedura consiste nel riscaldare i preparati citologici a 96°C in una soluzione di fosfato a pH acido, che estrae tutte le macromolecole, ad eccezione delle proteine non istoniche: tale variante fornisce una migliore riproducibilità del metodo (FUNAKI et al., 1975).

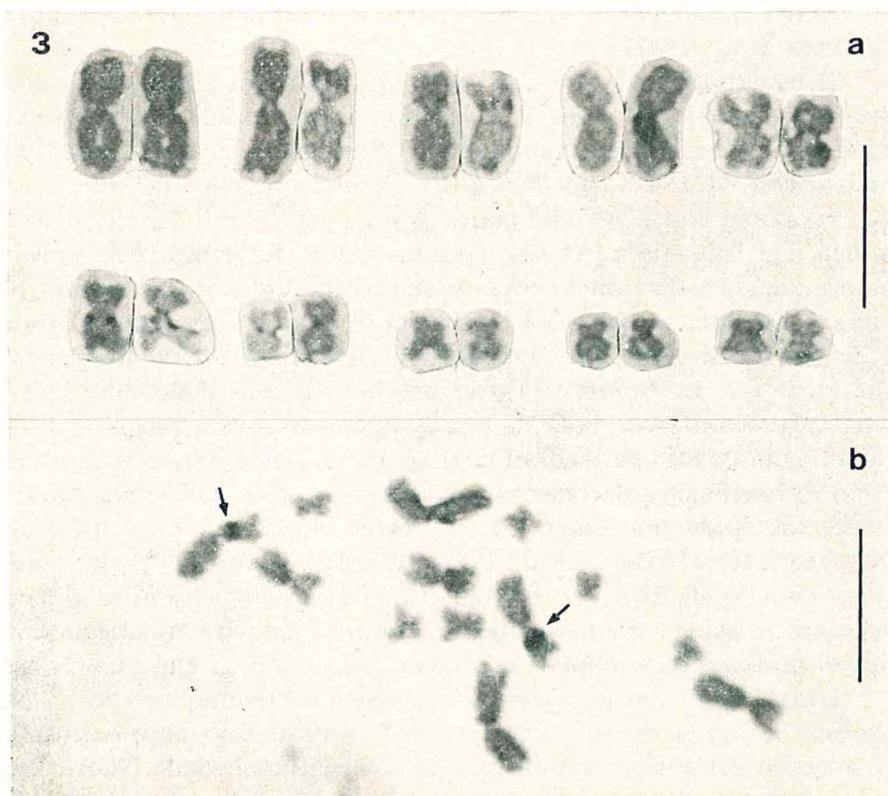


Fig. 3 - a) Cariotipo di *Bufo xeros* ottenuto da mitosi di cellule intestinali dopo applicazione di N-banding: una N-banda è presente nel braccio lungo della coppia VI, in prossimità del centromero. In questa metafase è presente anche una N-banda nel braccio corto della coppia III. b) Parte di una metafase intestinale dello stesso individuo dopo trattamento con C-banding: una cospicua C-banda è presente nel braccio corto di entrambi gli omologhi della coppia III (freccie). Le sbarrette rappresentano 10 μ m.

Nel presente lavoro abbiamo applicato la variante dell'originale « N-banding » ai preparati citologici di tre specie di Anfibi Anuri, di diversa posizione sistematica. Come risultato, abbiamo trovato che in ciascuna specie è in genere evidente una sola N-banda per cariotipo aploide. I dati ottenuti dopo applicazione dell'« N-banding » ai cromosomi di *Bombina variegata*, *Rana esculenta* e *Bufo xeros*, sono quindi messi a confronto con quelli conseguiti nelle stesse specie mediante ibridazione molecolare *in situ* con ^3H 18S + 28S e ^3H 5S rRNA. Gli esperimenti di ibridazione *in situ* hanno dimostrato che queste specie possiedono una sola NOR per corredo aploi-

de mentre i *loci* per il 5S rRNA sono più ampiamente distribuiti (VITELLI et al., 1981).

Il confronto tra i due tipi di risultati mostra che il *locus* cromosomico che in ciascuna specie viene colorato dall'« N-banding » corrisponde esattamente a quello rivelato attraverso l'ibridazione *in situ* con ^3H 18S + 28S rRNA. Le N-bande non hanno invece alcun rapporto con i *loci* che contengono i geni per il 5S rRNA. Ciò indica che l'N-banding colora specificamente le NORs nelle specie esaminate. Questa conclusione è rafforzata dalla osservazione di una correlazione positiva tra l'intensità di colorazione delle N-bande e la densità di grani autoradiografici sugli stessi *loci* dopo ibridazione *in situ*. In *Bombina variegata*, infatti, una delle due NORs omologhe è contrassegnata da una cospicua N-banda, mentre l'altra risulta solo debolmente colorata (Fig. 1b, c). Nello stesso individuo, dopo ibridazione molecolare *in situ* con ^3H 18S + 28S rRNA le due NORs omologhe mostrano una notevole differenza di densità di marcatura (cfr. VITELLI et al., 1981 e Fig. 1d). Dato che l'ibridazione *in situ* mette in evidenza l'rDNA e l'« N-banding » sembra dipendere da proteine non istoniche, le quantità relative di questi due tipi di molecole dovrebbero essere proporzionali in ciascuna NOR.

L'insieme di queste osservazioni porta a concludere che l'« N-banding », applicato ai cariotipi degli Anfibi, può rappresentare un metodo semplice e rapido per la localizzazione delle NORs. Occorre tuttavia rilevare che nei nostri esperimenti una minoranza (circa il 5%) delle piastre metafasiche ha mostrato altre regioni cromosomiche colorate differenzialmente oltre alle NORs. Queste regioni corrispondono a C-bande, come dimostra il confronto con i risultati ottenuti dopo applicazione del C-banding, ai cromosomi delle stesse specie (per *Bufo xeros* cfr. Fig. 3a, b).

L'eccezionale comparsa di N-bande in regioni cromosomiche diverse dalle NORs è riportata anche da FUNAKI et al. (1975) in diverse specie di animali e piante: anche in questo caso, le N-bande addizionali corrispondevano frequentemente a regioni di eterocromatina costitutiva. In accordo con quanto rilevato da questi Autori, le N-bande addizionali potrebbero essere dovute a condizioni chimico-fisiche differenti, che vengono a prodursi in parti diverse dello stesso preparato, rendendo la colorazione meno specifica per le NORs. Ad esempio, in *Drosophila melanogaster*, un blando trattamento di « N-banding » mette in evidenza l'eterocromatina costitutiva sia nei cromosomi mitotici che politenici, mentre un tratta-

mento più stringente mette in evidenza nei politenici solo l' α -eterocromatina situata nel cromocentro, che contiene la regione nucleolo-organizzatrice (FUNAKI et al., 1975). Nello stesso modo potrebbe essere spiegata la presenza, in *Xenopus laevis*, di N-bande in corrispondenza dei loci per il 5S rRNA. Queste bande compaiono, infatti, solo in seguito ad una blanda procedura, mentre scompaiono in condizioni più stringenti, in cui solo le NORs vengono colorate più intensamente. Poiché la differenza essenziale tra procedura blanda e stringente consiste in una diversa durata del trattamento acido, questi risultati possono essere spiegati ammettendo che le proteine non istoniche associate ai geni per il 5S rRNA siano più acido-solubili di quelle associate ai geni per il 18S + 28S rRNA.

Le N-bande corrispondenti alle NORs risultano essere costanti per numero e grandezza durante il ciclo cellulare (cfr. Fig. 1a, b e c): ciò implica che la colorazione delle NORs è indipendente dal loro stato funzionale. Per questo motivo è stato ipotizzato che le N-bande evidenziano elementi strutturali delle NORs, piuttosto che prodotti primari dei geni ribosomali o molecole a questi associate.

Poiché è possibile indurre la comparsa di N-bande in corrispondenza delle NORs nei più diversi eucarioti, come piante, insetti, mammiferi, uccelli, anfibi, etc., si presume che una specifica associazione tra geni ribosomali e proteine non istoniche responsabili dell'« N-banding » sia avvenuta precocemente nell'evoluzione, e si sia fissata stabilmente, prima della divergenza di questi vari organismi (cfr. FUNAKI et al., 1975). La caratterizzazione biochimica di queste proteine contribuirebbe a chiarire le basi molecolari della loro associazione con i geni ribosomali, tuttora sconosciute.

BIBLIOGRAFIA

- BROWN D. D., GURDON B. (1964) - Absence of ribosomal RNA synthesis in the anucleate mutant of *Xenopus laevis*. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **51**, 139-146.
- DE LUCCHINI S., VITELLI L., BATISTONI R. (1981) - Bandeggio cromosomico in alcune specie di Anfibi Anuri. I. C-banding. *Atti Soc. Tosc. Sci. Nat., Mem.*, ser. B, **88**, 93-101.
- FAUST J., VOGEL W. (1974) - Are « N-bands » selective staining of specific heterochromatin? *Nature (Lond.)*, **249**, 352-353.
- FERGUSON-SMITH M. A. (1964) - The sets of nucleolus formation in human pachytene chromosomes. *Cytogenetics*, **3**, 124-134.
- FUNAKI K., MATSUI S., SASAKI M. (1975) - Location of nucleolar organizers in animal and plant chromosomes by means of an improved N-banding technique. *Chromosoma (Berl.)*, **49**, 357-370.

- GALL J. G., PARDUE M. L. (1969) - Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **63**, 378-383.
- GOODPASTURE C., BLOOM S. E. (1975) - Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma (Berl.)*, **53**, 37-50.
- HAGELE K. (1977) - N-banding in Polytene Chromosomes of *Chironomus* and *Drosophila*. *Chromosoma (Berl.)*, **63**, 79-88.
- HEITZ E. (1931) - Nucleolen und Chromosomen in der Gattung *Vicia*. *Planta (Berl.)*, **15**, 495-505.
- HEITZ E. (1934) - Über α und β -heterochromatin sowie Konstanz und Ban der Chromosomen bei *Drosophila*. *Biol. Zbl.*, **54**, 588-609.
- HOWELL W. M., DENTON T. E., DIAMOND J. R. (1975) - Differential staining of the satellite regions of human acrocentric chromosomes. *Experientia (Basel)*, **31**, 260-262.
- HSU T. C., BRINKLEY B. R., ARRIGHI F. E. (1967) - The structure and behavior of the nucleolus organizers in mammalian cells. *Chromosoma (Berl.)*, **23**, 137-153.
- JOHN H. A., BIRNSTIEL M. L., JONES K. W. (1969) - RNA-DNA hybrids at a cytological level. *Nature*, **223**, 582-587.
- MATSUI S. (1974) - Structural proteins associated with ribosomal cistrons in *Xenopus laevis* chromosomes. *Exp. Cell Res.*, **88**, 88-94.
- MATSUI S., SASAKI M. (1973) - Differential staining of nucleolus organizers in mammalian chromosomes. *Nature (Lond.)*, **246**, 148-150.
- MCCCLINTOCK B. (1934) - The relation of a particular chromosome element to the development of the nucleoli in *Zea mays*. *Z. Zellforsch.*, **21**, 294-328.
- MORESCALCHI A. (1973) - Amphibia. In: Cytotaxonomy and Vertebrate evolution, A.B. Chiarelli and E. Capanna eds., Acad. Press, London and New York, pp. 233-348.
- MORESCALCHI A., ODIERNA G., OLMO E. (1977) - Karyological relationships between the Cryptobranchid salamanders. *Experientia (Basel)*, **33**, 1579-1581.
- PARDUE M. L. (1973) - Localization of repeated DNA sequences in *Xenopus* chromosomes. *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, **38**, 475-482.
- PARDUE M. L., BROWN D. D., BIRNSTIEL M. L. (1973) - Localization of the genes for 5S ribosomal RNA in *Xenopus laevis*. *Chromosoma (Berl.)*, **42**, 191-203.
- PIMPINELLI S., SANTINI G., GATTI M. (1976) - Characterization of *Drosophila* heterochromatin. II. C- and N-banding. *Chromosoma (Berl.)*, **57**, 377-386.
- RAE P. M. M. (1970) - Chromosomal distribution of rapidly reannealing DNA in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **67**, 1018-1025.
- RITOSSA F. M., SPIEGELMAN S. (1965) - Localization of DNA complementary to ribosomal RNA in the nucleolus organizer region of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **53**, 737-745.
- SCHMID M. (1978) - Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma (Berl.)*, **66**, 361-388.
- SCHMID M. (1980) - Chromosome banding in Amphibia. IV. Differentiation of GC and AT-rich chromosome regions in Anura. *Chromosoma (Berl.)*, **77**, 83-103.
- VITELLI L., BATISTONI R., ANDRONICO F., NARDI I., BARSACCHI PILONE G. (1981) - Chromosomal localization of 18S + 28S and 5S ribosomal RNA genes in evolutionarily diverse anuran amphibians. *Chromosoma (Berl.)*, in press.
- WALLACE H. R., BIRNSTIEL M. L. (1966) - Ribosomal cistrons and the nucleolus organizer. *Biochem. Biophys. Acta*, **114**, 296-310.

(ms. pres. il 18 ottobre 1981; ult. bozze il 15 dicembre 1981)