

R. BATISTONI, A. NEGRONI, D. LIBRI, G. BARSACCHI PILONE (*)

ETEROCROMATINA E DNA SATELLITE
IN *TRITURUS VULGARIS MERIDIONALIS* (ANFIBI URODELI)

Riassunto — Sono state studiate due diverse famiglie di DNA altamente ripetuto appartenenti al genoma di *Triturus vulgaris meridionalis* (Anfibi Urodela). I monomeri di queste sequenze di DNA, ottenuti mediante digestione con enzimi di restrizione, sono stati clonati nel plasmide pBR322 di *Escherichia coli*. Sono stati utilizzati alcuni dei cloni ricombinanti per analizzare l'organizzazione molecolare, la localizzazione cromosomica e la conservazione in specie diverse delle due famiglie di DNA.

Summary — *Heterochromatin and highly repetitive DNA families in Triturus vulgaris meridionalis* (Amphibia Urodela). Two highly repetitive DNA families from the genome of *Triturus vulgaris meridionalis* (Amphibia Urodela) have been studied. The monomers of these DNA sequences, obtained by restriction enzyme digestion, have been cloned in *Escherichia coli* plasmid pBR322. Some of the recombinant clones were used to analyze the molecular organization, chromosome location and degree of conservation of the two DNA families, in other species of *Triturus*.

Key words — Satellite DNA / Amphibia.

La quantità totale di DNA per genoma aploide, nota come valore C, varia enormemente negli eucarioti, non risultando, tuttavia, strettamente correlata con il numero dei geni e con la complessità dello sviluppo di un organismo. Negli Anfibi Urodela, organismi caratterizzati da valori C molto alti, l'aumento della grandezza del genoma si accompagna all'aumento della quantità di DNA altamente e mediamente ripetuto, essendo simile l'ammontare delle sequenze uniche (MORESCALCHI e SERRA, 1974; ROSBASH et al., 1974; BALDARI e AMALDI, 1976, 1977).

(*) Istituto di Istologia ed Embriologia, Via A. Volta 4, Pisa..

L'utilizzazione della tecnica di ibridazione molecolare *in situ* ha consentito di stabilire una precisa correlazione tra DNA satelliti, costituiti da sequenze altamente ripetute, ed eterocromatina costitutiva. In numerosi organismi eucarioti è stato infatti dimostrato che i DNA satelliti sono appunto localizzati in regioni cromosomiche eterocromatiche.

Grazie allo sviluppo di una tecnica di bandeggio, il «C-banding», è divenuto semplice stabilire una correlazione tra particolari regioni cromosomiche e l'eterocromatina costitutiva. In numerose specie di Anfibi Urodela, l'insieme dei risultati acquisiti con il «C-banding» ha rivelato una distribuzione dell'eterocromatina costitutiva in siti cromosomici particolari: a livello del centromero, di qualche zona telomerica ed in corrispondenza di regioni situate ad entrambi i lati del centromero (regioni paracentriche) (MANCINO et al., 1977; BIRNSTEIN, 1982).

Noi abbiamo intrapreso uno studio sulle sequenze satelliti di *Triturus vulgaris meridionalis*, una specie appartenente alla famiglia Salamandridae degli Anfibi Urodela, allo scopo di caratterizzarne il DNA eterocromatico.

Mediante digestione del DNA genomico con enzimi di restrizione, abbiamo individuato in questo organismo tre diverse famiglie di DNA satellite. Queste famiglie vengono chiamate rispettivamente Hind III, Bgl II e Bam HI, sulla base della presenza di specifici siti per enzimi di restrizione nelle rispettive unità di ripetizione.

Le famiglie Hind III e Bgl II mostrano, dopo digestione del DNA genomico totale con i rispettivi enzimi ed elettroforesi su gel di agarosio, monomeri di circa 330 pb e la famiglia Bam HI monomeri di circa 390 pb. I monomeri delle famiglie Bgl II e Hind III sono stati eluiti dal gel e clonati nel plasmide pBR322 di *Escherichia coli*. I cloni ricombinanti ottenuti sono stati utilizzati come sonda per studiare l'organizzazione genomica delle relative famiglie di sequenze, per determinarne la localizzazione cromosomica ed i rapporti con l'eterocromatina costitutiva e per valutare il grado di conservazione delle sequenze in altre specie del genere *Triturus*, come anche in altri generi di Anfibi Urodela.

I risultati ottenuti possono essere così riassunti:

1. Famiglia Hind III

Esperimenti di «Southern blot» del DNA genomico di *Triturus vulgaris meridionalis*, tagliato con vari enzimi di restrizione ed ibri-

dato con i cloni della famiglia Hind III, dimostrano che tale famiglia è costituita da sequenze altamente ripetute, ripartite in parecchi gruppi: ciascun gruppo di sequenze contiene un alto numero di unità di ripetizione. Si tratta perciò di un tipico DNA satellite. Esperimenti analoghi, effettuati con DNA genomici di altre specie di *Triturus*, hanno dimostrato che il satellite Hind III è ben conservato come sequenza altamente ripetuta ed organizzata in gruppi, entro il genere *Triturus*, mentre le sue sequenze non sono rappresentate, o lo sono in minima proporzione, al di fuori del genere.

Esperimenti di ibridazione molecolare *in situ*, condotti con i cromosomi mitotici di *T.v. meridionalis* hanno rivelato che il satellite Hind III è localizzato a livello della C-bande paracentriche di quasi tutti i cromosomi del corredo. Questa localizzazione, sebbene con variazioni specie-specifiche, è mantenuta anche nei cromosomi delle altre specie di *Triturus* analizzate (BARSACCHI-PILONE et al., 1982; 1985, in press).

La sequenza nucleotidica di un monomero del satellite Hind III, lungo 310 pb, dimostra che si tratta di una sequenza ricca in A/T, che presenta codoni di termine della traduzione su ambedue le eliche in tutte le cornici di lettura. Inoltre nella sequenza sono presenti inversioni, palindromi e ripetizioni dirette.

2. Famiglia Bgl II

Anche la famiglia Bgl II è costituita da sequenze di DNA altamente ripetute e raggruppate nel genoma: tuttavia, a differenza dei tipici satelliti, ciascun gruppo contiene un numero limitato di sequenze. In accordo con questa struttura, i primi esperimenti di localizzazione cromosomica indicano che le sequenze Bgl II non sono associate in grandi blocchi alle regioni eterocromatiche, ma sono piuttosto distribuite in modo sparso, in una grande molteplicità di loci cromosomici.

Analogamente al satellite Hind III, la famiglia di sequenze Bgl II è ben conservata nel genoma di altre specie del genere *Triturus*, in cui mantiene anche la caratteristica distribuzione sparsa nei cromosomi.

I nostri dati fanno ragionevolmente pensare che il satellite Bgl II di *T.v. meridionalis* corrisponda al satellite Bgl II studiato da MACGREGOR et al. (1981) in *Triturus cristatus carnifex*, e al satellite 2 studiato da MAHON e GALL in *Notophthalmus viridiscens* (com. persona-

le; EPSTEIN et al., 1985). Di fatto questi satelliti presentano caratteristiche strutturali, organizzazione genomica e distribuzione cromosomica simili a quelle del satellite Bgl II di *T.v. meridionalis*.

L'analisi del terzo satellite (Bam HI) individuato nel genoma di *T.v. meridionalis* dovrebbe contribuire alla comprensione dei rapporti strutturali ed evolutivi esistenti tra le diverse famiglie di DNA altamente ripetuto nel genere *Triturus*.

BIBLIOGRAFIA

- BALDARI C.T., AMALDI F. (1976) - DNA reassociation kinetics in relation to genome size in four Amphibian species. *Chromosoma*, **59**, 13-22.
- BARSACCHI G., ANDRONICO F., BATISTONI R., NARDI I. (1982) - Satellite DNA in *Triturus* (Amphibia: Urodela) 22nd ASCB Meeting. *J. Cell Biol.*, **95**, 86 a.
- BARSACCHI-PILONE G., BATISTONI R., NARDI I., ANDRONICO F., VITELLI L. (1985) - Heterochromatic DNA in *Triturus* (Amphibia, Urodela). I. A satellite DNA component of the paracentric C-bands. *Chromosoma*, in press.
- BIRNSTEIN V.J. (1982) - Structural characteristics of genome organization in Amphibians: differential staining of chromosomes and DNA structure. *J. Mol. Evol.*, **18**, 73-91.
- EPSTEIN L.M., MAHON K.A., GALL J.G. (1985) - A small RNA transcript homologous to satellite DNA in the newt. *25th Am. Soc. Cell Biol. Meeting*, in press.
- MACGREGOR H.C., VARLEY J.M., MORGAN G.T. (1981) - The transcription of satellite and ribosomal DNA sequences on lampbrush chromosomes of crested newts. In: *International Cell Biol. 1980-81*. Schweiger H.G. (ed.). Springer, Berlin-Heidelberg, 33-46.
- MANCINO G., RAGGHIANI M., BUCCI-INNOCENTI S. (1977) - Cytotaxonomy and cytogenetics in european newt species. In: *The reproductive biology of Amphibians*. D.H. Taylor and S. Guttman, eds. Plebum Publ. Cor., New York, 411-447.
- MORESCALCHI A., SERRA V. (1974) - DNA renaturation kinetics in some paedogenetic urodeles. *Experientia*, **30**, 487-489.
- ROSBASH H., FORD P.J., BISHOP J.O. (1974) - Analysis of the C-value paradox by molecular hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 3746-3750.

(ms. pres. il 29 maggio; ult. bozze il 30 dicembre 1985)