

L. GALLENi (\*), R. CANOVAI (\*), A. ESPOSITO (\*), M. GUALANDI (\*),  
R. STANYON (\*\*)

## BANDEGGIO GIEMSA E QUINACRINA NEI TRICLADI

**Riassunto** — Per una più corretta analisi cariológica dei Turbellari è ormai necessario il ricorso a tecniche di bandeggio cromosomico.

In questi ultimi mesi abbiamo cercato di mettere a punto una tecnica che, per semplicità di realizzazione e livello dei risultati, può essere un buon punto di partenza.

La tecnica è rivolta per ora ai Tricladi dulciacquicoli, ma può essere estesa, senza troppe difficoltà a molti altri gruppi di Turbellari.

**Abstract** — *Giemsa and Quinacrine Banding in the Triclads.* An adequate karyological analysis of the Turbellaria requires the development of more refined staining techniques such as banding.

Good results in banding the chromosomes of this taxon have been obtained using the following technique presently on fresh water Triclads. Specimens are cut in half to obtain regenerating blastems. After three or four days the specimens are placed into spring water containing colchicine (0,3%, final concentration) for about three hours. Then the regenerative blastem is cut away and transferred for 20 minutes to a hypotonic solution consisting of a 1% solution of sodium citrate. The sample is then fixed in Carnoy's solution for 30 minutes. Slides are made by dispersing the cells in a few drops of 60% acetic acid.

For quinacrine banding the slides were passed through a series of decreasing ethanol concentrations (95%, 75%, 40%) and finally, stained in quinacrine (GIBCO) dissolved in citric acid buffer at pH 5.0 for 10 minutes. The slides were then placed in two changes of the same buffer for a total of 3 minutes. For observation slides were mounted with the same buffer.

For Giemsa banding the slides were first treated with HCl, 0.2 N, for 20 minutes. They were then placed into a saturated solution of barium hydroxide at 60° C for 20 minutes. The slides were rinsed in acid water and incubated in 2 x SSC at 60° C for an hour. An alternate procedure that produced equally good results consisted of incubating the slides in barium hydroxide for only 6-8 minutes and then mounting

---

(\*) Istituto di Zoologia e Anatomia Comparata - Università degli Studi di Pisa  
- Via A. Volta 4 - 56100 Pisa - Italia.

(\*\*) Istituto di Antropologia - Università degli Studi di Pisa - Via S. Maria 53  
- 56100 Pisa - Italia.

the slides in 2 x SSC and placing them in a wet chamber at 60° C for 16 hours. In both cases the slides were stained after rinsing in distilled water in a 4% solution of Giemsa diluted in Sorensen's buffer (0.1 M, pH 6.8).

**Key words** — Tricladis - chromosome banding.

L'analisi kariologica dei Turbellari richiede ormai la messa a punto di tecniche più raffinate di colorazione cromosomica quali quelle di bandeggio. Numerosi tentativi sono stati compiuti (TESHIROGI e ISHIDA, 1981; DE VRIES *et al.*, 1984; SLUYS e DE YONG, 1984; BENAZZI *et al.*, 1981), con risultati anche interessanti, ma che non hanno finora permesso una esatta individuazione di sistemi di bande.

Interessanti risultati sono stati ottenuti nei Tricladis dulciacquicoli con i procedimenti descritti come segue: ciascun esemplare è tagliato in due parti per ottenere un blastema di rigenerazione. Dopo tre o quattro giorni dal taglio gli esemplari sono trasferiti per tre-quattro ore in colchicina (Sigma) diluita in acqua di fonte (0,3% concentrazione finale). La parte con il blastema rigenerativo viene asportata e trasferita per 20 minuti in una soluzione 1% di sodio-citrato e fissata in una soluzione Carnoy per 30 minuti. Il blastema viene poi disperso in poche gocce di acido acetico al 60%.

Dopo aver lasciato asciugare all'aria e sciacquato con il fissativo, i preparati sono colorati con una colorazione Giemsa al 5% in una soluzione tampone di Sorensen pH 7.

I vetrini così ottenuti sono esaminati per scegliere i migliori preparati e su questi sono eseguite le procedure di bandeggio.

Procedure di bandeggio: i preparati sono decolorati in due passaggi nel fissativo (1:3 acido acetico-metanolo) per un totale di 60 minuti.

Per la Quinacrina i vetrini sono passati attraverso una serie di etanolo a concentrazioni decrescenti (95%, 75%, 40%) e colorati in diidrocloreuro di Quinacrina (GIBCO) disciolto in un tampone di acido citrico a pH 5 per 10 minuti. I vetrini sono poi passati attraverso due passaggi di soluzione tampone per 3 minuti e montati con lo stesso tampone per osservazione.

Per il bandeggio Giemsa i vetrini sono prima trattati con acido cloridrico 0,2 N per 20 minuti, essi sono poi trasferiti in una soluzione satura di idrossido di bario a 60° C per 20 minuti, sciacquati in acqua acida e incubati in 2 x SSC a 60° C per un'ora. La soluzione colorante è costituita da Giemsa 4% (BDH, Gurr) disciolta in una

soluzione di Sorensen (pH 6,8; 0,1 M). I vetrini sono colorati per 20 minuti.

Un'altra procedura usata è quella di incubare i vetrini in idrossido di Bario per soli 6-8 minuti, e poi posare i vetrini, trattati con 2 x SSC, in una camera umida a 60° C per 16 ore.

La colorazione in Giemsa è la stessa descritta precedentemente.

Questo metodo ha per ora permesso di evidenziare bande centromeriche, telomeriche e lungo alcuni bracci dei cromosomi del Triclade *Dugesia polychroa* (GALLENI et al., 1985).

#### BIBLIOGRAFIA

- BENAZZI M., FORMENTI D., MANFREDI ROMANINI M.G., PELLICCIARI C., REDI C.A. (1981) - Feulgen DNA content and C-banding of Robertsonian transformed karyotypes in *Dugesia lugubris*. *Caryologia*, **34**, 129-139.
- DE VRIES E.J., BAGUNA J., BALL I.R. (1984) - Chromosomal polymorphism in planarians (Turbellaria, Tricladida) and the plate tectonics of the Western Mediterranean. *Genetica*, **62**, 187-192.
- GALLENI L., CANOVAI R., GUALANDI M., PELLICCIARI C., GARAGNA S., STANYON R. (1985) - Fine characterization of Turbellarian chromosomes I. Giemsa and Quinicrine banding in *Dugesia polychroa* (O. Schmidt). *Genetica*, in stampa.
- SLUYS R., DE YONG H. (1984) - Chromosome morphological studies of *Dugesia gonocéphala* s.l. (Platyhelminthes, Tricladida). *Caryologia*, **37**, 9-20.
- TESHIROGI W., ISHIDA S. (1981) - Studies on the speciation of Japanese freshwater planarian *Polycelis auriculata* based on the analysis of its karyotypes and constitutive proteins. *Hydrobiologia*, **84**, 69-77.

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

