
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

GIORGIO MANCINO, GIUSEPPINA BARSACCHI, IRMA
NARDI

**Incorporazione di fenilalanina tritiata nei lampbrush
chromosomes e nei nucleoli di *Triturus vulgaris*
meridionalis (Anfibi Urodeli)**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 44 (1968), n.6, p. 840–849.*
Accademia Nazionale dei Lincei

http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1968_8_44_6_840_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/>

Citologia. — *Incorporazione di fenilalanina tritiata nei lampbrush chromosomes e nei nucleoli di Triturus vulgaris meridionalis (Anfibi Urodeli)* (*). Nota di GIORGIO MANCINO, GIUSEPPINA BARSACCHI e IRMA NARDI, presentata (**) dal Corrisp. M. BENAZZI.

SUMMARY. — Radioautographic studies using tritiated phenylalanine have been performed on ovarian oocyte nuclei of *Triturus vulgaris meridionalis*.

In a first experiment, the tritium-labeled aminoacid was intracoelomically injected in females; then pieces of ovary were repeatedly excised at variable time intervals (3 hours to 13 days) after injections.

In a second experiment, clusters of oocytes were incubated in H³ phenylalanine and their nuclei were isolated after 2 to 10 1/2 hr of incubation. The results turned out alike in both experiments: nucleoli were labeled after 3 hr and lampbrush chromosomes after 6 hr from the beginning of exposure to tritiated phenylalanine.

Furthermore, by incubating isolated nuclei—repeatedly washed and freed from cytoplasm—or the nuclear content alone (in this case the nuclear membrane had been previously removed), nucleoli and lampbrush chromosomes were labeled shortly after the beginning of incubation.

These last experiments show that protein synthesis may be carried out in oocyte nuclei isolated from cytoplasm: nucleoli and lampbrush chromosomes incorporate H³ phenylalanine and therefore they could be thought to represent nuclear sites of protein synthesis. The lateral structures of lampbrush chromosomes—including those which do not incorporate H³ uridine, such as spheres and globules—are labeled after treatment with H³ phenylalanine.

In this respect, spheres and globules are similar to the so-called “*Binnenkörper*” found in oocyte nuclei of panoistic and meroistic ovaries of Insects.

INTRODUZIONE.

I *lampbrush chromosomes*, presenti nella vescicola germinativa degli oociti ovarici di molti gruppi animali, sono cromosomi «giganti» costituiti da numerosi cromomeri in sequenza lineare, sui quali si inseriscono paia di *loops* laterali. Ciascun *loop* è formato da un asse di DNA del diametro di 30 Å, avvolto da una matrice di materiale ribonucleoproteico (Miller 1964 a). Questa matrice è considerata un prodotto genico, in quanto lungo i *loops* ha luogo la sintesi di RNA DNA-dipendente, come è stato messo in evidenza con l'uso di precursori marcati dell'RNA ed applicazione del metodo autoradiografico (Gall e Callan 1962; Izawa, Allfrey e Mirsky 1963). A livello dei *loops* si ha anche incorporazione di aminoacidi marcati; infatti Gall e Callan (1962), dopo aver iniettato fenilalanina tritiata in femmine di *Triturus cristatus* hanno notato che i *loops* si presentano radioattivi per tutta l'estensione a partire da 1 giorno dall'iniezione. Analogamente Izawa, Allfrey

(*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Zoologia e Anatomia Comparata dell'Università di Pisa, col contributo del C.N.R.

(**) Nella seduta dell'8 giugno 1968.

e Mirsky (1963), dopo incubazione di ovociti di *Triturus viridescens* in H^3 leucina, hanno osservato che l'incorporazione dell'aminoacido lungo i cromosomi avviene già a partire da 6 ore; tale incorporazione viene bloccata dalla somministrazione di puomicina, l'antibiotico che arresta la sintesi proteica. Pure a livello dei nucleoli si compie un'attiva sintesi di RNA (Lane 1966, 1967; Macgregor 1967) che continua anche quando la sintesi di RNA lungo i *loops* è cessata in seguito alla spiralizzazione dei *lampbrush chromosomes* (Mancino, Barsacchi e Nardi 1967). Questa sintesi, come quella che interessa i *loops*, è DNA-dipendente; in ciascun nucleolo è presente infatti un filamento di DNA, dello stesso diametro dell'asse dei *loops*, avvolto da un materiale di morfologia simile alla matrice ribonucleoproteica dei *loops* (Miller 1964 b, 1966). I tentativi di marcare i cromosomi *lampbrush* con H^3 timidina sono risultati negativi, poiché in questa fase non si ha sintesi di DNA (Ficq 1961).

Dato l'interesse di questi reperti, abbiamo approfondito lo studio dell'attività biosintetica che si svolge nei nuclei degli ovociti ovarici mediante impiego di fenilalanina tritiata. Abbiamo infatti ritenuto opportuno cercare di chiarire innanzitutto se la sintesi proteica lungo i *lampbrush chromosomes* sia limitata ai *loops* laterali di morfologia normale o sia estesa anche a strutture che non sintetizzano RNA (Mancino, Barsacchi e Nardi 1967). Un altro scopo di questo studio è stato quello di stabilire se a livello dei nucleoli vi sia incorporazione di H^3 fenilalanina e di indagare sul rapporto tra la sintesi proteica nucleolare e quella cromosomica a vari tempi dal trattamento con l'aminoacido marcato. Abbiamo infine ritenuto utile verificare se la sintesi proteica nei cromosomi e nei nucleoli possa compiersi anche in nuclei isolati dal citoplasma, mediante incubazione dei nuclei o del solo contenuto nucleare in soluzione contenente fenilalanina tritiata.

MATERIALE E TECNICA.

Le ricerche sono state compiute su femmine di *Triturus vulgaris meridionalis*, raccolte nei dintorni di Pisa e di Napoli. Sono stati seguiti quattro metodi:

1) Iniezioni intracelomiche di fenilalanina tritiata.

Per questi e per i successivi esperimenti è stata usata la L-3 Phenylalanine-2,3-T (attività specifica: 900 mc/mM) prodotta dal Radiochemical Center - Amersham; alla sola ♀ I è stata iniettata L-3-Phenylalanine-T (G) (attività specifica: 750 mc/mM) della stessa casa. A due femmine (♀ I e ♀ II) sono stati somministrati rispettivamente 0,2 e 0,225 mc di H^3 fenilalanina; sono stati quindi prelevati campioni di ovario in tempi successivi, compresi tra 3 ore e 13 giorni.

2) Incubazione di ovociti ovarici, bagnati da liquido celomico, in H^3 fenilalanina preventivamente essiccata a temperatura ambiente. Frammenti di ovario prelevati da due femmine (♀ VI e ♀ VIII) sono stati incubati rispettivamente in 0,5 e 0,125 mc di H^3 fenilalanina, per tempi compresi tra 2 e 10,30 ore.

3) Incubazione di nuclei, isolati da ovociti ovarici e ripetutamente lavati dal citoplasma, in una soluzione fisiologica (CaCl_2 10^{-4}M in K/NaCl $0,1\text{M}$ $5:1$) contenente $0,0357$ mc/ml di H^3 fenilalanina.

I tempi di incubazione variavano tra $1'$ e $75'$. Una incubazione più prolungata è risultata impossibile per la rottura della membrana nucleare.

4) Incubazione del contenuto nucleare, liberato da nuclei accuratamente lavati, in soluzione fisiologica (CaCl_2 10^{-4}M in K/NaCl $0,1\text{M}$ $5:1$), contenente $0,0357$ mc/ml di H^3 fenilalanina, per tempi variabili tra $1,30$ e $3,20$ ore.

I cromosomi sono stati isolati seguendo tecniche da noi già sperimentate (Mancino e Barsacchi 1965). I preparati sono stati fissati in vapori di aldeide formica al 40% in vol. contenente l' 1% di acido acetico glaciale. È probabile che tale fissazione non abbia avuto effetto immediato, e che le reazioni siano perciò proseguite per qualche tempo.

Per la tecnica autoradiografica è stato adottato il metodo dello *stripping-film* (cfr. Gall e Callan 1962; Gall 1965), utilizzando pellicole Kodak AR-10, sviluppo Kodak D 19, fissatore Kodak Unifix. Il tempo di esposizione è stato di circa 25 giorni.

OSSERVAZIONI.

Illustriamo sinteticamente i risultati delle ricerche, seguendo l'ordine con cui sono stati compiuti gli esperimenti.

1. - *Iniezioni intracelomiche di H^3 fenilalanina.*

I dati si riferiscono a due femmine (♀ I e ♀ II), dalle quali abbiamo prelevato campioni di ovario ad intervalli di tempo compresi tra 3 ore e 13 giorni dall'iniezione. I risultati ottenuti sono compendati nelle Tabelle I e II, dalle quali risulta che l'incorporazione di H^3 fenilalanina, a livello cromosomico, è evidente a partire da circa 6 ore dalla somministrazione dell'isotopo (Tav. I, A); a 3 ore dall'iniezione, i cromosomi non sono marcati o mostrano solo tracce di incorporazione.

In genere, la marcatura dei cromosomi cresce progressivamente con l'aumentare del tempo di incubazione e permane fino a 7 giorni; a 13 giorni, i cromosomi non sono più marcati. I *loops* di morfologia normale sono per lo più marcati lungo tutta l'estensione, ma possono anche essere sprovvisti di grani o soltanto parzialmente marcati (Tav. I, B). Una ripetizione sequenziale di grani a livello dei cromomeri fa ritenere che i tratti intercromomerici non incorporino H^3 fenilalanina. Certamente non marcati sono alcuni brevi tratti cromosomici privi di *loops*.

Le sfere, inserite sui cromosomi VI e XI, incorporano H^3 fenilalanina, in genere con la stessa progressione mostrata dai cromosomi (Tav. I, B e C). Per quanto riguarda i globuli, ne abbiamo osservati alcuni non marcati, altri chiaramente marcati, ed altri ancora con grani limitati alla zona periferica.

TABELLA I.

*Incorporazione di H³ fenilalanina negli ovociti ovarici della ♀ I
in seguito ad iniezione intracelomica.*

Tempo decorso dall'iniezione	Numero ovociti	Diametro ovociti (mm)	Cromosomi	Sfere	Nucleoli	Deutoplasma
13 ore	14	da 0,69 a 1,07	marcati	marcate	marcati	marcato
21 »	5	» 0,50 » 1,03	»	»	»	»
37 »	9	» 0,69 » 1,07	»	»	»	»
60 »	6	» 0,50 » 1,07	»	»	»	»
5 giorni	4	» 0,84 » 1,07	»	»	»	»

Ulteriori spiegazioni sono contenute nel testo.

TABELLA II.

*Incorporazione di H³ fenilalanina negli ovociti ovarici della ♀ II
in seguito ad iniezione intracelomica.*

Tempo decorso dall'iniezione	Numero ovociti	Diametro ovociti (mm)	Cromosomi	Sfere	Nucleoli	Deutoplasma
3 ore	11	da 0,57 a 1,15	non marcati o leggermente marcati	non marcate	marcati	non marcato
6 »	11	» 0,53 » 1,19	leggermente marcati	leggermente marcate	»	» »
45 »	4	» 0,80 » 0,96	marcati	marcate	»	marcato
117 »	6	» 0,46 » 1,07	»	»	»	»
7 giorni	7	» 0,76 » 1,19	»	»	»	»
13 »	7	» 0,69 » 1,15	non marcati	non marcate	non marcati	non marcato

Ulteriori spiegazioni sono contenute nel testo.

Anche i nucleoli incorporano H³ fenilalanina. Tale incorporazione si manifesta già a partire da 3 ore e persiste fino a 7 giorni. A 3 ore alcune preparazioni hanno chiaramente mostrato nucleoli marcati e cromosomi nei quali l'incorporazione non era evidente o era appena agli inizi. La marcatura dei nucleoli sferoidali inizia di preferenza in una zona limitata ed eccentrica e

si estende successivamente a tutta la superficie nucleolare. A 13 giorni i nucleoli non sono più marcati; un solo ovocita (mm 0,69 di diametro) ha mostrato a questo tempo cromosomi e nucleoli leggermente marcati. Placchette di deutoplasma di varia grandezza hanno mostrato incorporazione di H^3 fenilalanina. Tale incorporazione non sembra avvenire contemporaneamente in tutte le placchette, poiché ve ne sono insieme di marcate e di non marcate. La marcatura è evidente da 13 ore a 7 giorni (Tav. I, E).

2. - *Incubazione di ovociti ovarici in H^3 fenilalanina.*

I risultati di questa esperienza, compiuta su campioni di ovario prelevati da due femmine (♀ VI e ♀ VIII), sono compendiate nelle Tabelle III e IV: risulta che l'incorporazione di H^3 fenilalanina nei nuclei segue uno schema riportabile a quello già illustrato per la esperienza precedente.

TABELLA III.

Incorporazione di H^3 fenilalanina negli ovociti ovarici della ♀ VI incubati nell'isotopo.

Tempo di incubazione	Numero ovociti	Diametro ovociti (mm)	Cromosomi	Nucleoli	Deutoplasma
3 ore	9	da 0,69 a 1,15	non marcati o leggermente marcati	marcati	non marcato
4 »	7	» 0,76 » 1,15	non marcati o leggermente marcati	»	» »
5 »	4	» 0,92 » 1,11	non marcati o leggermente marcati	»	» »
6 »	6	» 0,61 » 1,15	marcati	»	» »
10 » 30'	11	» 0,69 » 1,15	»	»	» »

Ulteriori spiegazioni sono contenute nel testo.

TABELLA IV.

Incorporazione di H^3 fenilalanina negli ovociti ovarici della ♀ VIII incubati nell'isotopo.

Tempo di incubazione	Numero ovociti	Diametro ovociti (mm)	Cromosomi	Nucleoli	Deutoplasma
2 ore	7	da 0,69 a 0,88	non marcati	non marcati o leggermente marcati	non marcato

Ulteriori spiegazioni sono contenute nel testo.

La marcatura delle strutture cromosomiche è ben evidente soltanto dopo 6 ore di incubazione, mentre i nucleoli mostrano un'incorporazione più precoce ed appaiono leggermente marcati già dopo 2 ore. A partire da 3 ore, l'incorporazione dei nucleoli diviene più intensa (Tav. II, A e B). Anche in questa prova, abbiamo osservato che la marcatura dei nucleoli è inizialmente asimmetrica (Tav. I, D). Le poche placchette deutoplasmatiche presenti non hanno mostrato traccia di radioattività.

3. - *Incubazione di nuclei in H³ fenilalanina.*

L'esame dei dati compendati nella Tabella V dimostra che l'incorporazione di H³ fenilalanina lungo i cromosomi e nei nucleoli ha luogo anche in nuclei isolati dal citoplasma. Per quanto riguarda i tempi di incubazione è necessario tener conto del fatto che la fissazione usata non ha effetto immediato; inoltre, alcuni preparati sono stati osservati e studiati prima di essere fissati, allo scopo di riconoscerne meglio, dopo l'autoradiografia, le strutture cromosomiche più caratteristiche.

TABELLA V.

Incorporazione di H³ fenilalanina in nuclei isolati da ovociti ovarici della ♀ VIII ed incubati nell'isotopo.

Tempi di incubazione	Numero ovociti	Diametro ovociti (mm)	Cromosomi	Nucleoli
30'' +	3	?-?-0,80	marcati	marcati
1' +	3	0,69-0,69-0,76	»	»
1'30'' ++	1	0,76	»	»
2' ++	1	?	»	»
3' ++	1	?	»	»
4' +	1	0,88	»	»
5' ++	1	1,07	»	»
14' ++	2	0,69-1,00	»	»
16' +	1	0,69	»	»
18' +	1	0,69	»	»
20' +	1	0,69	»	»
25' +	2	0,92-1,15	»	»
75' +	1	0,80	»	»

+ = Preparati fissati immediatamente dopo l'apertura dei nuclei.

++ = Preparati fissati circa 2 ore dopo l'apertura dei nuclei.

Ulteriori spiegazioni sono contenute nel testo.

4. - *Incubazione del contenuto nucleare in H³ fenilalanina.*

Nella Tabella VI sono compendiate i risultati di questa esperienza; come nel caso precedente i tempi di incubazione risentono senza dubbio della mancanza di una fissazione rapida.

TABELLA VI.

Incorporazione di H³ fenilalanina nei lampbrush chromosomes e nei nucleoli isolati da ovociti ovarici della ♀ VIII ed incubati nell'isotopo.

Tempo di incubazione	Numero ovociti	Diametro ovociti (mm)	Cromosomi	Nucleoli
1 ora 30'	1	1,00	marcati	marcati
2 ore	1	0,61	»	»
2 » 30'	1	1,07	»	»
3 »	8	da 0,53 a 1,19	»	»
3 » 20'	2	0,73 - 0,84	»	»

Ulteriori spiegazioni sono contenute nel testo.

I cromosomi e i nucleoli, liberati dal nucleo nella soluzione fisiologica contenente l'aminoacido marcato, mantengono la capacità di incorporare. I *loops* di morfologia normale, i *loops* a matrice « densa » e le sfere sono marcati (Tav. II, C, D e E). L'incorporazione è intensa anche nei nucleoli: sui nucleoli a forma di anello, presenti in alcune preparazioni, i grani sono localizzati sulle masse sferoidali di matrice e mancano sui tratti sottili che le uniscono (Tav. II, F e G).

DISCUSSIONE.

Durante la permanenza nell'ovario, gli ovociti profasici sono interessati da un progressivo accrescimento dovuto all'accumulo di materiale macromolecolare, in gran parte elaborato al di fuori degli ovociti (Tyler 1955). In essi, tuttavia, si ha pure un'attiva sintesi proteica endogena, che è intensa soprattutto nelle prime fasi dell'accrescimento e decresce col progredire dell'ovogenesi (Ficq 1953 e 1955 *a* e *b*). Anche il nucleo degli ovociti ovarici si accresce per aumento del succo nucleare: in questa fase i cromosomi hanno struttura ed organizzazione di bivalenti *lampbrush*. Sullo svolgimento delle sintesi proteiche durante l'ovogenesi e nelle prime fasi dello sviluppo embrionale, rimandiamo ai lavori di Monroy e Tyler (1967) e di Gross (1967).

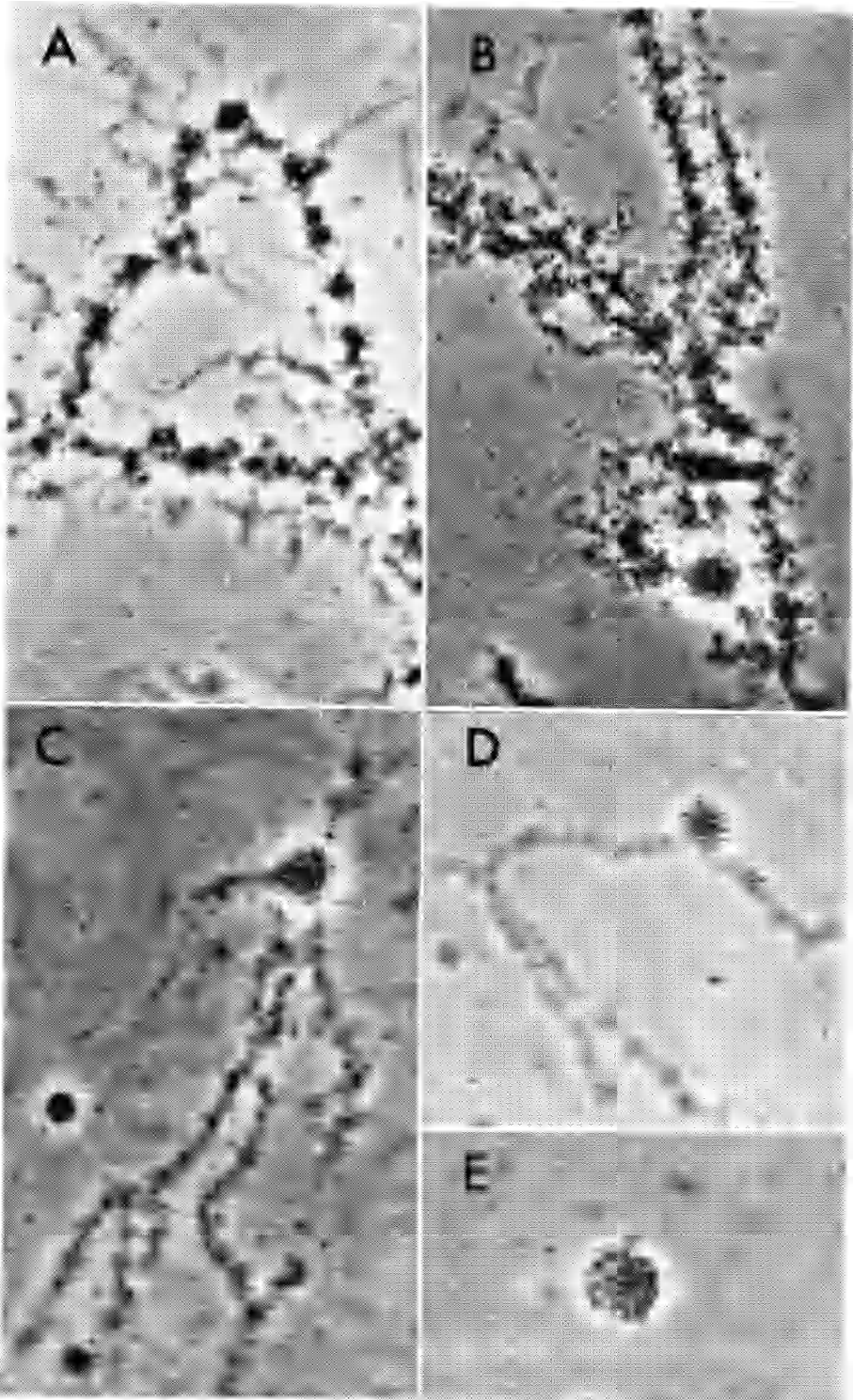
Il presente studio autoradiografico ha mostrato che i *lampbrush chromosomes* e i nucleoli incorporano H^3 fenilalanina. Poiché ciò si verifica anche in seguito ad incubazione dei nuclei isolati dal citoplasma o del solo contenuto nucleare, si può supporre che cromosomi e nucleoli siano sede di sintesi proteiche. Si noti che l'asportazione della membrana nucleare, da noi realizzata nella quarta serie di esperienze, riduce al minimo le possibili contaminazioni citoplasmatiche. A questo riguardo ricordiamo che alcuni Autori hanno provato che sintesi proteiche possono compiersi in nuclei isolati: tra questi Mirsky *et alii* (1956), Allfrey *et alii* (1957) e Beck *et alii* (1968). L'incorporazione degli aminoacidi avviene anche in parecchie frazioni proteiche del nucleo; ciò è stato dimostrato mediante esperimenti *in vivo* (Rendi 1960; Frenster *et alii* 1960; Wang 1963) e *in vitro* (Rozenchwajg-Lahalle e Zalta 1965). Il problema delle sintesi proteiche endonucleari è tuttavia ancora aperto, anche per la difficoltà di chiarire quali siano i meccanismi con cui tali sintesi possono compiersi. Alcuni Autori, tra i quali Rendi (1960), Elaev e Rykhlik (1963) e McCarthy *et alii* (1966) hanno segnalato nel fegato di ratto la presenza di ribosomi nucleari paragonabili a quelli citoplasmatici e risultati biochimicamente attivi *in vitro*; altri Autori, tra cui Flamm e Birnstiel (1964) e Rogers (1966), avrebbero individuato precursori dei ribosomi citoplasmatici in nuclei di altri tipi di cellule. Rozenchwajg-Lahalle e Zalta (1965) avanzano l'ipotesi che uno dei luoghi di sintesi proteica nel nucleo sia costituito da un complesso nucleoproteico, presente sotto forma di particelle strutturate, senza poter ancora precisare a quale struttura nucleare (nucleolo o cromatina) esso corrisponda; tali ribonucleoproteine avrebbero caratteristiche diverse da quelle dei ribosomi nucleari.

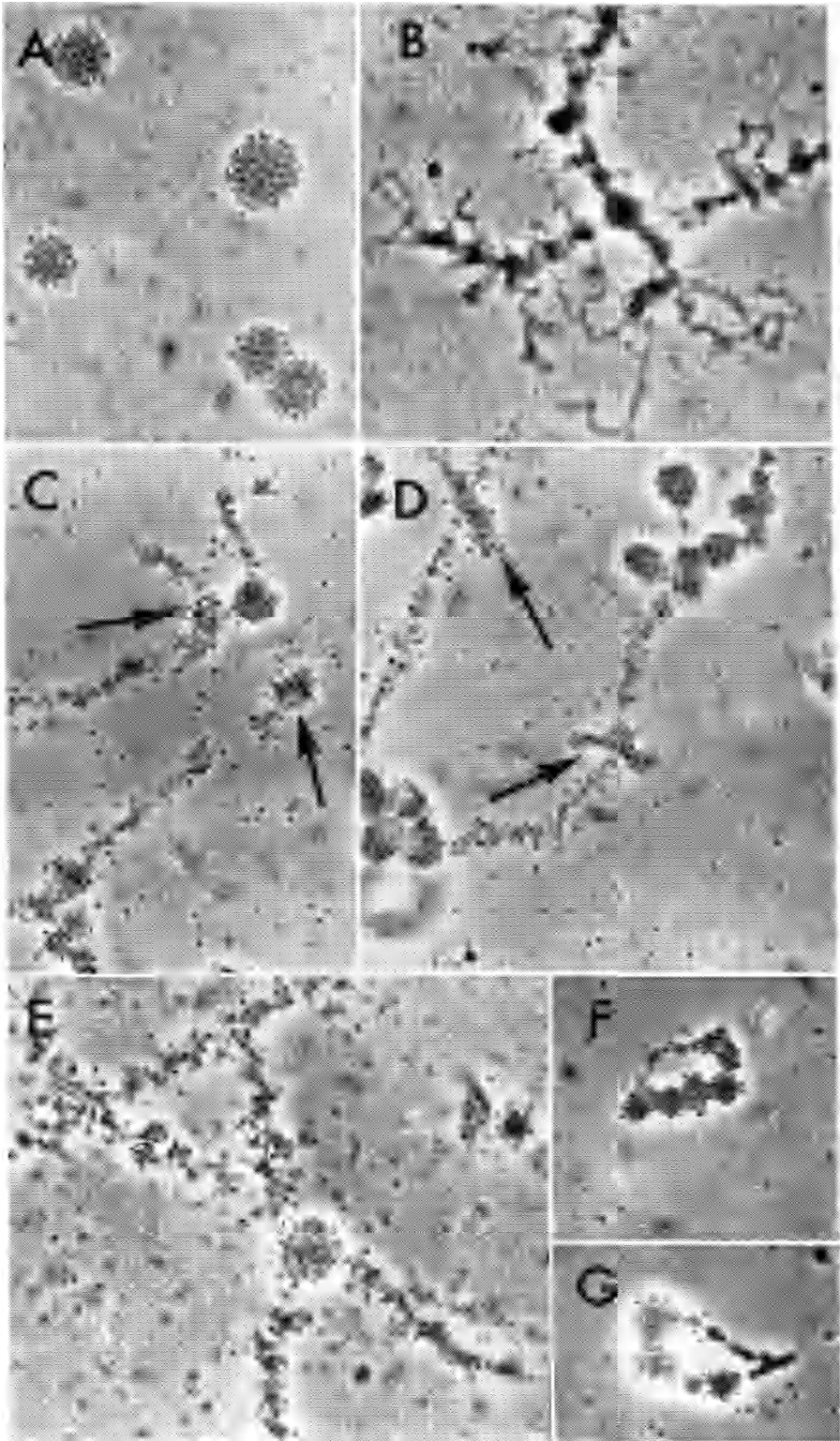
Di interesse risulta poi il fatto che l'incorporazione dell'aminoacido nei nucleoli è evidente con un certo anticipo rispetto a quella che si verifica nei cromosomi: i nucleoli presentano infatti grani di Ag già a partire da 3 ore, mentre i cromosomi appaiono marcati a 6 ore. Anche nei nuclei delle ghiandole salivari del Chironomide *Smittia* (Sirlin 1960) e nei nuclei interfasci di *Allium cepa* (Chouinard e Leblond 1967), i nucleoli appaiono radioattivi qualche tempo prima dei cromosomi. Questi ultimi Autori ritengono che nucleoli e cromatina rappresentino luoghi distinti di sintesi proteica e che la velocità di sintesi sia maggiore nel nucleolo che nelle altre regioni del nucleo.

Facciamo infine notare che l'incorporazione di H^3 fenilalanina lungo i *loops* dei *lampbrush chromosomes* segue un modello simile a quello dell'incorporazione di H^3 uridina (Mancino, Barsacchi e Nardi 1967 e dati non pubblicati): si deve tuttavia rilevare come alcune strutture che non incorporano H^3 uridina, in particolare le sfere e i globuli, incorporino invece H^3 fenilalanina. Per questo aspetto sfere e globuli hanno quindi caratteristiche simili al « *Binnenkörper* », rilevato da Bier *et alii* (1967) nei nuclei di ovociti di ovari panoistici e meroistici di Insetti. Il « *Binnenkörper* », infatti, non incorpora uridina, ma solo aminoacidi; al suo livello avverrebbe uno scambio di molecole proteiche con la cariolinfa.

BIBLIOGRAFIA.

- ALLFREY V. G., MIRSKY A. E. e OSAWA S., « J. Gen. Physiol. », 40, 451 (1957).
- BECK J. P., GUERNÉ J. M., SCHMITT G., STUTINSKY F. e EBEL J. P., « C. R. Acad. Sc. Paris », 26, 940 (1968).
- BIER K., KUNZ W. e RIBBERT D., « Chromosoma », 23, 214 (1967).
- CHOUINARD L. A. e LEBLOND C. P., « J. Cell Sci. », 2, 473 (1967).
- ELAEV N. R. e RYKHLIK I., « Biokhimiya », 28, 1047 (1963).
- FICQ A., « Experientia », 9, 377 (1953).
- FICQ A., « Arch. Biol. », 66, 509 (1955 a).
- FICQ A., « Exptl. Cell Res. », 9, 286 (1955 b).
- FICQ A., *Symposium on Germ Cells and Development*, Fondaz. A. Baselli, Milano, 121 (1961).
- FLAMM W. G. e BIRNSTIEL N. L., « Biochim. Biophys. Acta », 87, 101 (1964).
- FRENSTER J. H., ALLFREY V. G. e MIRSKY A. E., « Proc. Natl. Acad. Sci. », 46, 432 (1960).
- GALL J. G., in *Methods in Cell Physiology* (Ed. by D. Prescott), « Acad. Press Inc. », New York, 37 (1965).
- GALL J. G. e CALLAN H. G., « Proc. Natl. Acad. Sci. », 48, 562 (1962).
- GROSS P. R., in: *Current Topics in Developmental Biology* (Ed. by Monroy A. and Moscona A. A.), « Acad. Press. New York-London », 2, 1 (1967).
- IZAWA M., ALLFREY V. G. e MIRSKY A. E., « Proc. Natl. Acad. Sci. », 49, 544 (1963).
- LANE N. J., « J. Cell Biol. », 31, 65 A (1966).
- LANE N. J., « J. Cell Biol. », 35, 421 (1967).
- MCCARTY K. S., PARSONS J. T., CARTER W. A. e LASZLO J., « J. Biol. Chem. », 241, 5489 (1966).
- MACGREGOR H. C., « J. Cell Sci. », 2, 145 (1967).
- MANCINO G. e BARSACCHI G., « Caryologia », 18, 637 (1965).
- MANCINO G., BARSACCHI G. e NARDI I., « Boll. Zool. », 34, 134 (1967).
- MILLER O. L., Jr., *Symposium on Genes and Chromosomes, Structures and Function*, Buenos Aires, 30 November — 4 December 1964 (1964 a).
- MILLER O. L., Jr., « J. Cell Biol. », 23, 60 A (1964 b).
- MILLER O. L., Jr., « Natl. Can. Inst. Monograph. », 23, 53 (1966).
- MIRSKY A. E., OSAWA S. e ALLFREY V. G., « Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol. », 21, 49 (1956).
- MONROY A. e TYLER A., in: *Fertilization* (Ed. by Metz C. B. and Monroy A.), « Acad. Press. New York - London », 1, 369 (1967).
- RENDI R., « Exp. Cell Res. », 19, 489 (1960).
- ROGERS M. E., « J. Cell Biol. », 31, 95 A (1966).
- ROZENCWAJG-LAHALLE R. e ZALTA J.-P., « C. R. Acad. Sc. Paris », 261, 5701 (1965).
- SIRLIN J. L., « Exptl. Cell Res. », 19, 177 (1960).
- TYLER A., in: *Analysis of Development* (Ed. by Williers B. H., Weiss P. A. and Hamburger V.), Saunders, Philadelphia, 170 (1955).
- WANG T. Y., « Biochim. Biophys. Acta », 68, 150 (1963).





SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I E II

TAVOLA I.

- A: Autoradiografia che mostra *lampbrush chromosomes* marcati dopo 6 ore dall'iniezione di H₃ fenilalanina (ov. di mm 0,53, ♀ II; 1380 ×).
- B: Autoradiografia del bivalente VI intensamente marcato 45 ore dopo l'iniezione; sfera e *loops* presentano numerosi grani (ov. di mm 0,96, ♀ II; 1380 ×).
- C: Autoradiografia di un bivalente *lampbrush* con sfera, marcato 5 giorni dopo l'iniezione (ov. di mm 0,57, ♀ I; 1380 ×).
- D: Autoradiografia che mostra un bivalente non marcato ed un nucleolo sferoidale, nel quale l'incorporazione inizia eccentricamente; tempo di incubazione dell'ovocita: 5 ore (ov. di mm 1,1, ♀ VI; 1380 ×).
- E: Placchetta di deutoplasma marcata dopo 37 ore di incubazione dell'ovocita (ov. di mm 0,69, ♀ I; 1380 ×).

TAVOLA II.

- A: Nucleoli marcati dopo 3 ore di incubazione dell'ovocita (ov. di mm 0,73, ♀ VI; 1380 ×).
- B: Autoradiografia di un bivalente con sfera appartenente all'ovocita precedente; l'incorporazione non è ancora evidente (1380 ×).
- C: Autoradiografia del bivalente VI: cromosomi, sfera e *loops* a matrice « densa » (indicati con frecce) sono marcati dopo 3 ore di incubazione del contenuto nucleare (ov. di mm 1,19, ♀ VIII; 1380 ×).
- D: Altri *loops* « densi » marcati, inseriti su un bivalente dell'ovocita precedente (1380 ×).
- E: Autoradiografia del bivalente VI; la marcatura è intensa lungo i cromosomi e sulla sfera (ov. di mm ?, ♀ VIII; 1380 ×).
- F e G: Nucleoli ad anello marcati in corrispondenza delle masse di matrice, dopo 3 ore di incubazione del contenuto nucleare (ov. di mm 1,19, ♀ VIII; ov. di mm 0,84, ♀ VIII; 1380 ×).