

ESPERIENZA DI LABORATORIO: DISSEZIONE DI LARVE DI DROSOPHILA E PREPARAZIONE DI CROMOSOMI POLITENICI



I cromosomi politenici "giganti" sono stati messi in evidenza nelle ghiandole salivari di alcuni ditteri dal biologo Edouard-Gerard Balbiani alla fine del 1800. L'analisi della struttura cromosomica nel moscerino della frutta *Drosophila melanogaster* è stata molto facilitata dalla presenza di questi cromosomi "speciali".

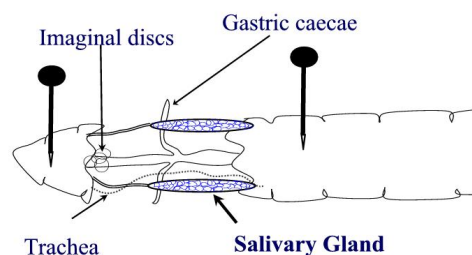
In *Drosophila melanogaster*, dopo la schiusa dell'uovo emerge una piccola larva di I stadio che inizia una fase di accrescimento che la porterà attraverso due mute successive a trasformarsi in una larva di III stadio dalle dimensioni dieci volte superiori a quelle iniziali. Durante questa crescita, le cellule delle ghiandole salivari vanno incontro a numerosi cicli di replicazione del DNA, mentre la divisione cellulare non ha luogo. Di conseguenza, nella larva di III stadio, le cellule delle ghiandole salivari raggiungono dimensioni molto grandi con un contenuto di DNA che può essere fino a 1024 volte maggiore rispetto a quello delle normali cellule diploidi. I filamenti multipli di DNA restano appaiati tra loro dando luogo alla formazione dei cromosomi politenici "giganti", dotati di una bandeggiatura naturale e specifica. Poiché ogni cromosoma politenico è formato dai due omologhi, uno di origine paterna e l'altro materna, molte aberrazioni cromosomiche in eterozigosi, quali deficienze, traslocazioni, inversioni etc., danno luogo ad appaiamenti particolari con la formazione di strutture non canoniche che possono essere evidenti a livello citologico (vedi lezione su mutazioni cromosomiche di struttura).

In questa esperienza di laboratorio isoleremo i cromosomi politenici di *Drosophila* da cellule delle ghiandole salivari di larve di III stadio. Per far ciò, le ghiandole saranno dissezionate, fissate, colorate e schiacciate. Il preparato sarà poi osservato al microscopio a 40 e a 100 ingrandimenti.

Strumenti	Occorrenti
Vetrini portaoggetto Vetrini coprioggetto Microscopio per dissezione Aghi da dissezione Pipette e puntali Pinzetta	Larve di III stadio di <i>Drosophila melanogaster</i> 1) Soluzione di Ringer (o altra soluzione isotonica) 2) 45% acido acetico (HOAc) 3) Colorante aceto-orceina (filtrato e senza cristalli)

- **LA DISSEZIONE DELLE LARVE**

- Le ghiandole salivari si trovano nella parte anteriore della larva, in particolare nella regione della testa. Esse appaiono come due sacchetti allungati e simmetrici rispetto all'asse del corpo, tenuti insieme da un peduncolo. Di solito sono circondate da strutture biancastre, i cosiddetti corpi grassi.

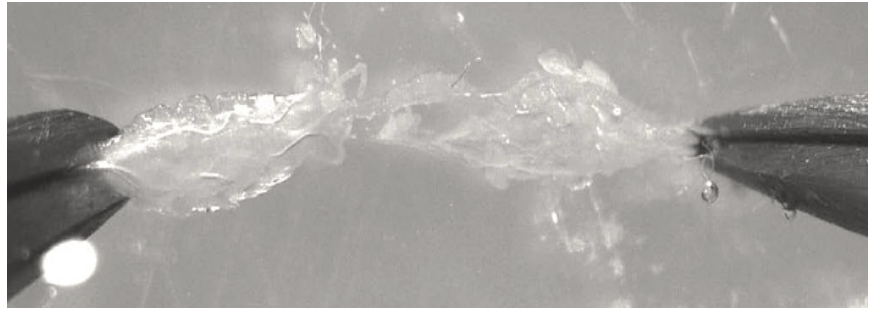
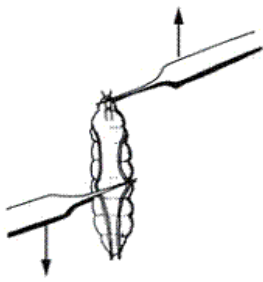


- Prelevare le larve al terzo stadio dai barattolini con una pinzetta senza schiacciarle, ma usando le punte per sollevarle.



- Trasferire le larve in una goccia di soluzione fisiologica (0.7% NaCl) posta su di un vetrino da microscopio o su di una capsula di Petri

- Afferrare con una pinzetta la parte mediana della larva e con l'altra la parte della bocca, poi tirare.



- Le ghiandole salivari nella maggior parte dei casi rimarranno attaccate alle parti della bocca (vedi immagine sottostante).



A sinistra, le ghiandole (frecce) sono ancora attaccate alla testa con le parti della bocca. A destra, ad ingrandimento maggiore sono evidenti due ghiandole isolate. Una delle due ghiandole possiede ancora un pezzo di corpo grasso attaccato

• LA PREPARAZIONE DEI CROMOSOMI

- Rimuovere eventuali corpi grassi o parti della bocca attaccate alle ghiandole e trasferire le ghiandole in una goccia di acido acetico al 45% su di un vetrino porta oggetto
- Dopo 30 secondi rimuovere l'eccesso di acido acetico con un pezzetto di kleenex o con una pipetta (attenzione a non portare via le ghiandole!)
- Aggiungere alle ghiandole una goccia del colorante Orceina acetica ed incubare per 5 minuti
- Coprire la goccia con un vetrino coprioggetto (evitare che si formino bolle d'aria). La ghiandola, imbevuta di soluzione colorante, rimane tra il vetrino coprioggetto e quello portaoggetto, in una sorta di sandwich.
- Con la gomma di una matita dare dei piccoli colpi e muovere leggermente il coprioggetto a zig-zag.

- Coprire il vetrino con un foglio di carta assorbente (bibula) e schiacciare esercitando una forte pressione con il pollice perpendicolarmente al vetrino stesso per almeno 10 secondi
- Osservare al microscopio il preparato per controllare se i nuclei si sono aperti ed esaminare le figure cromosomiche, quelle migliori hanno le braccia distese ed allungate.

ESEMPI DI BUONI PREPARATI

