
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

GERMANO SALVATORELLI, GIUSEPPE GARDENGHI

Primi risultati di culture organotipiche di gonadi indifferenziate e differenziate di Bufo bufo

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 41 (1966), n.1-2, p.
130-133.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1966_8_41_1-2_130_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/>

Biologia. — *Primi risultati di culture organotipiche di gonadi indifferenziate e differenziate di Bufo bufo* (*). Nota (**) di GERMANO SALVATORELLI e GIUSEPPE GARDENGHI, presentata dal Corrisp. P. PASQUINI.

SUMMARY. — Undifferentiated genital ridges of *Bufo bufo* tadpoles, after 26 days of organotypic culture, are unable to differentiate either Bidder organ or gonadic part. Genital organs of metamorphosing animals, after 20 days of culture, preserve ripening oocytes in Bidder organ; in the gonad some gonocytes in mitosis are present, but no sex-differentiation occurs. Differentiated genital organs of new-metamorphosed animals maintain quite normal Bidder organs until 30 days of cultivation; in the gonads however after 20 days conspicuous alterations occur, particularly consisting in a strong decreasing in the number of gonocytes.

La cultura *in vitro* della gonade ha permesso di risolvere o precisare un gran numero di problemi di morfologia sessuale riguardanti: l'autodifferenziamento delle ghiandole genitali, l'inversione sessuale e il ruolo delle gonadi embrionali nel differenziamento del tratto genitale (ved. a questo proposito l'ottima rassegna di Haffen) ⁽¹⁾.

Le ricerche più importanti sono state realizzate negli Uccelli e nei Mammiferi; meno numerose quelle eseguite sui Vertebrati inferiori. Ricordiamo a questo proposito le esperienze di Foote e Foote ⁽²⁾ sulle culture organotipiche di gonadi larvali di *Rana clamitans*, *Rana catesbeiana*, *Xenopus laevis*, *Pleurodeles waltlii* e di gonadi adulte di *Triturus cristatus* e *Pleurodeles waltlii*.

Non ci constano esperienze di culture organotipiche di organo di Bidder di Bufonidi in genere, ed essendo i fattori determinanti la genesi di questa struttura non ancora ben noti nel loro complesso (ved. in proposito i lavori di Vannini e Ghirardelli) ⁽³⁾, abbiamo ritenuto interessante studiare il compor-

(*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Anatomia Comparata dell'Università di Ferrara diretto dal prof. L. Raunich e nell'Istituto di Zoologia dell'Università di Bologna diretto dal prof. E. Vannini, col contributo finanziario del C.N.R.

(**) Pervenuta all'Accademia il 18 luglio 1966.

(1) K. HAFFEN, *Différenciation sexuelle et intersexualité* in vitro, da *Les cultures organotypiques*, pubblicato sotto la direzione di J. André Thomas, Masson e C. editori, Parigi (1965).

(2) CH. L. FOOTE e F. M. FOOTE, *In vitro cultivation of gonads of adult Amphibia*, «Anat. Rec.», 127, 415 (1957); CH. L. FOOTE e F. M. FOOTE, *In vitro cultivation of gonads of larval Anurans*, «Anat. Rec.», 130, 553-565 (1958); CH. L. FOOTE e F. M. FOOTE, *Maintenance of gonads of Xenopus laevis in organ cultures*, «Proc. Soc. exp. Biol. Med.», 105, 107-108 (1960); CH. L. FOOTE e F. M. FOOTE, *The culture in vitro of urogenital organs of Pleurodeles waltlii*, «J. Embryol. exp. Morph.», 10, 465-470 (1962).

(3) E. VANNINI, *Esperimenti sul differenziamento regionale della gonade in embrioni e larve di Bufo*, «Atti Acc. Sc. Ist. Bologna», ser. XI, 9, 30-36 (1962); E. GHIRARDELLI, *Sulle potenzialità morfogenetiche del territorio bidderiano presuntivo in Bufo bufo*, «Boll. Zool.», 29, fasc. II, 307-318 (1962).

tamento della gonade e dell'organo di Bidder in cultura organotipica secondo la tecnica di Wolff e Haffen (4).

È noto che in *Bufo bufo* la gonade risulta già abbozzata allo stadio III₁₀ (delle tavole di Cambar e Gipouloux) (5) sotto forma di due creste genitali disposte ai lati del mesenterio dorsale; ciascuna di esse è fornita di una quarantina di protogoni migrati nelle creste genitali in precoci stadi di sviluppo (Vannini e Ghirardelli) (3) e distribuiti secondo un gradiente cefalocaudale di affollamento.

Allo stadio IV₇-IV₈ (stadio con arti posteriori a forma di paletta con contorni sinuosi), i gonociti della regione più cefalica di ciascun corpo genitale cominciano a presentare dei fenomeni di accrescimento e di modificazioni nucleari che in breve tempo portano alla loro trasformazione in ovociti (ovociti bidderiani della prima ondata).

Alla fine della metamorfosi, il corpo genitale risulta formato da una parte craniale assai voluminosa (organo di Bidder) e da una parte caudale costituita dalla gonade vera e propria ormai differenziata, ovario o testicolo.

I risultati esposti succintamente in questa Nota e limitati solo ai fatti essenziali, si riferiscono a tre gruppi di esemplari di *Bufo bufo* allevati in laboratorio:

- 1° girini allo stadio IV₃-IV₄;
- 2° girini allo stadio IV₁₁-IV₁₂;
- 3° rospetti neometamorfosati.

I mesoreni e le gonadi sono stati prelevati, in condizione di asepsi, in un unico blocco. Gli espianti sono stati eseguiti secondo la tecnica di Wolff e Haffen (4) su mezzo solido ricoperto da frammenti di membrana vitellina di uovo di pollo non incubato (Wolff) (6).

Il mezzo solido da noi impiegato si compone di:

geloso in sol. all'1% in liquido di Gey	10	gocce
estratto embrionale di pollo di 8 giorni e 1/2	4	»
siero di cavallo	4	»
Mycostatin in sol. all'1% in acqua bidist.	1	»
Diidrostreptomina solfato (2 g) + Penicillina G potassica (1.000.000 di unità) sciolti in 100 ml. di acqua bidist.	1	»

1° *Girini allo stadio IV₃-IV₄*. - A questo stadio di sviluppo ciascuna cresta genitale non contiene che un numero relativamente scarso di gonociti (meno di un'ottantina) e nel territorio bidderiano non si sono ancora differenziati gli ovociti.

(4) E. WOLFF e K. HAFEN, *Sur une méthode de culture d'organes embryonnaires in vitro*, « Texas Rep. Biol. Med. », 10, 463-472 (1952).

(5) R. CAMBAR e J. D. GIPOULOUX, *Table chronologique du développement embryonnaire et larvaire du Crapaud commun, Bufo bufo (L.)*, « Bull. Biol. France Belgique », 90, 198-217 (1956).

(6) E. WOLFF, *Utilisation de la membrane vitelline de l'oeuf de poule en culture organotypique*. - I. *Technique et possibilités*, « Developmental Biology », 3, 767-786 (1961).

Dopo 26 giorni di cultura i gonociti sono pressoché scomparsi (probabilmente dispersi nel parenchima renale contiguo alla gonade); neppure l'organo di Bidder si è differenziato, come invece accade nei controlli *in vivo*. Il mesorene presenta nella propria compagine alcune aree necrotiche.

2° *Girini allo stadio IV₁₁-IV₁₂*. - A questo stadio l'organo di Bidder è già assai bene sviluppato e ricco di ovociti; la gonade, sessualmente indifferenziata, contiene numerosi elementi germinali.

Dopo 15 giorni di cultura, sia la gonade che l'organo di Bidder mantengono la loro struttura e la loro composizione cellulare normale. Nell'organo di Bidder si notano ovociti in tutte le fasi dell'ovogenesi, dagli ovociti allo stadio di leptotene a quelli voluminosi con cromosomi a spazzola (ved. Tav. I, figg. 1, 2, 3, 4). Nella gonade non è raro trovare alcuni gonociti in mitosi. A 20 giorni di cultura la situazione rimane pressoché immutata, senza alcun segno di differenziamento della gonade.

3° *Rospetti neometamorfosati*. - A questo stadio la gonade è già sessualmente differenziata in ovario o testicolo e l'organo di Bidder contiene numerosi grossi ovociti.

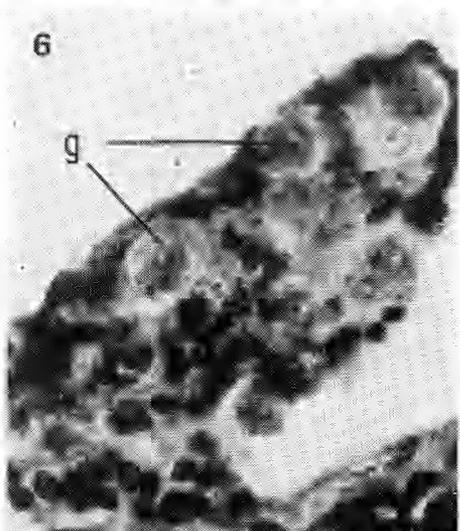
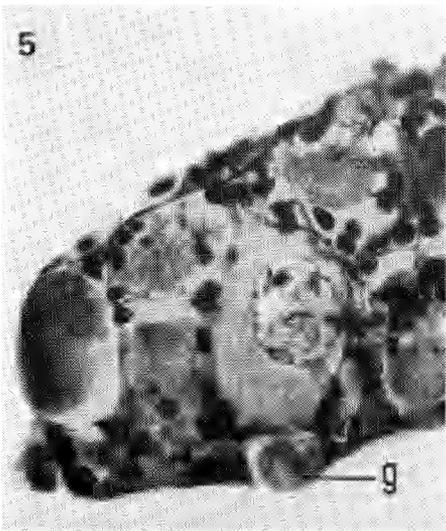
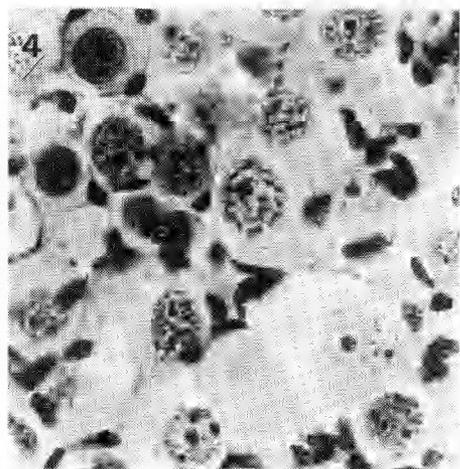
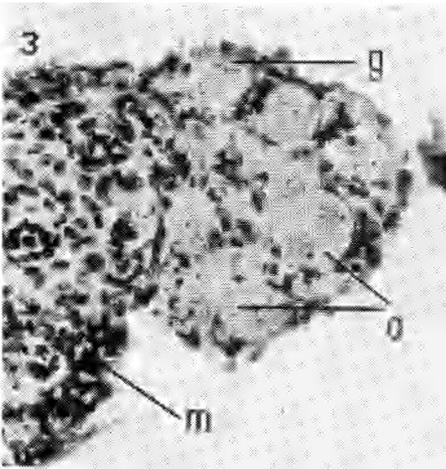
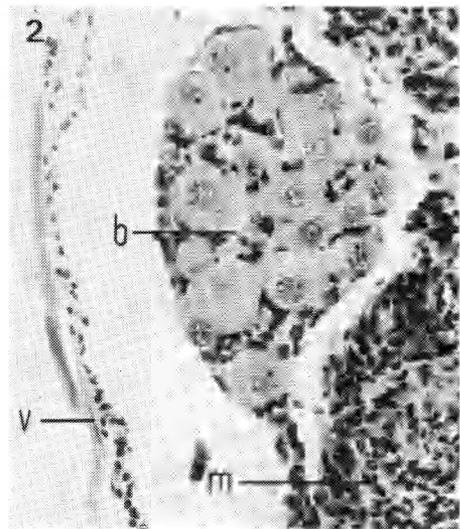
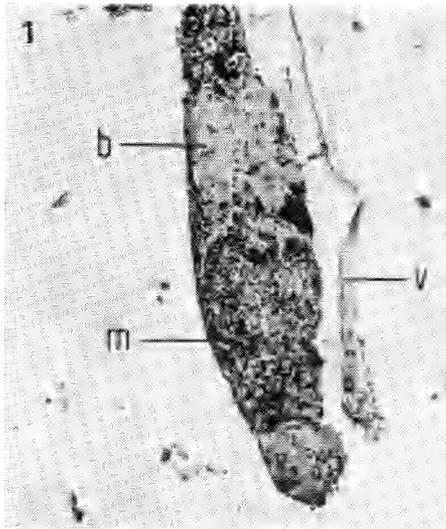
Dopo 30 giorni di cultura gli ovociti bidderiani presentano un aspetto del tutto normale salvo qualche sporadico reperto di ovociti in degenerazione (ved. Tav. I, fig. 5). La gonade, al contrario, che fino al 15° giorno di cultura era del tutto normale, presenta in parecchi casi, a partire dal 20° giorno, notevoli alterazioni a scapito soprattutto del numero dei gonociti (ved. Tav. I, fig. 6). Essa tende infatti ad affondare all'interno del mesorene dove i gonociti probabilmente si disperdono, come sembra documentato dal fatto che il loro numero è ridotto senza che sia possibile riscontrare processi degenerativi all'interno della gonade.

* * *

Da quanto esposto ci sembra di potere affermare che, negli espianti ottenuti da stadi progrediti, l'organo di Bidder, una volta differenziatosi, mantiene *in vitro* la propria struttura e la propria composizione cellulare per almeno un mese di cultura. Negli espianti da stadi più giovani, non ci è invece stato possibile ottenere il differenziamento di ovociti bidderiani in quella regione della cresta genitale che *in vivo* si sarebbe differenziata nell'organo di Bidder.

La gonade indifferenziata si coltiva assai meno bene soprattutto se espianata a stadi precoci del suo sviluppo; non ci è stato possibile ottenere *in vitro* il differenziamento di questa gonade in ovario o testicolo e questo risultato concorda con quelli di analoghe esperienze compiute da Foote e Foote in *Xenopus laevis* e in *Pleurodeles waltlii* ⁽²⁾.

Da aggiungere che il mesorene si coltiva molto bene e conserva in genere un aspetto indenne per tutto il tempo di cultura.



Risulta, in conclusione, che il mezzo di cultura di Wolff e Haffen permette, per quanto riguarda gli elementi germinali, la sopravvivenza (per circa un mese) degli ovociti bidderiani, la moltiplicazione e forse anche l'entrata in meiosi dei gonociti nel tratto bidderiano; in queste condizioni sperimentali la gonade indifferenziata, espantata col solo rene, non sembra in grado di potersi trasformare in testicolo o in ovario.

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA I

- Fig. 1. – Sezione trasversale del blocco mesorene-gonade di girino di *Bufo bufo* allo stadio IV₁₁-IV₁₂ espantato e coltivato *in vitro* per 20 giorni. La sezione, fotografata a piccolo ingrandimento, è eseguita a livello dell'organo di Bidder: *m*, mesorene; *b*, organo di Bidder; *v*, membrana vitellina di uovo di pollo.
- Fig. 2. – Come in fig. 1 a ingrandimento più forte.
- Fig. 3. – Particolare di sezione di espanto (come in fig. 1), dove sono evidenti alcuni ovociti bidderiani e qualche gonocita: *m*, mesorene; *o*, ovociti; *g*, gonociti.
- Fig. 4. – Particolare di sezione di organo di Bidder di girino allo stadio IV₁₁-IV₁₂ coltivato *in vitro* per 20 giorni. Si notano ovociti a diverse fasi dell'ovogenesi.
- Fig. 5. – Sezione di un organo di Bidder di un rospetto neometamorfosato coltivato *in vitro* per 30 giorni. Si notano alcuni ovociti in degenerazione, un ovocita indenne e un gonocita (*g*).
- Fig. 6. – Sezione di gonade di rospetto neometamorfosato coltivata *in vitro* per 30 giorni. Si possono contare 7-8 gonociti (*g*) in buone condizioni.