
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

FOSCARINA DI GRANDE

**Modalità della sterilizzazione degli abbozzi genitali
in girini di Bufo bufo panirradiati con raggi X in
stadi embrionali**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 50 (1971), n.5, p. 593-599.*
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1971_8_50_5_593_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/>

SEZIONE III

(Botanica, zoologia, fisiologia e patologia)

Zoologia. — *Modalità della sterilizzazione degli abbozzi genitali in girini di Bufo bufo panirradiati con raggi X in stadi embrionali*^(*). Nota di FOSCARINA DI GRANDE, presentata^(**) dal Corrisp. P. PASQUINI.

SUMMARY. — *Bufo bufo* embryos were subjected to 800 r X-ray panirradiation at the III₈ stage and killed for the histological examination stage by stage in the following days.

In their genital bodies the number of germ-cells persists almost unchanged during the first 16 days. Then, at the larval stages in which, in normal developmental conditions, should have begun the mitotic multiplication of germ-cells, their number suddenly decreases to complete sterility.

In due precedenti Note ho dimostrato che embrioni o giovani larve di *Bufo bufo*, panirradiati con dosi adeguate di raggi X, riescono a sopravvivere e a continuare lo sviluppo sino alla metamorfosi⁽¹⁾ o anche dopo⁽²⁾, dando origine a animali i cui abbozzi genitali, al momento dell'esame istologico, risultano più o meno poveri o sprovvisti di cellule germinali. Ciò mi ha permesso di iniziare una serie di ricerche (che tuttora sto continuando) sull'autonomo comportamento dei componenti somatici degli abbozzi genitali (gonadi propriamente dette ed organi di Bidder), nel corso di un differenziamento sessuale che si svolge in assenza completa o quasi completa di cellule germinali.

Nel quadro di queste indagini, scopo della presente Nota è quello di precisare ulteriormente il meccanismo della sterilizzazione delle gonadi larvali, cercando di dimostrare in quale momento della vita del girino, panirradiato in uno stadio embrionale, inizi la diminuzione numerica delle cellule germinali.

L'esperimento sul quale riferisco (eseguito con la medesima tecnica descritta nelle due Note precedenti) è consistito nel panirradiare con la dose di 800 r 100 embrioni di *Bufo bufo* mentre si trovavano allo stadio III₈ delle

(*) Indagini eseguite nell'Istituto di Zoologia dell'Università di Bologna diretto dal Prof. Enrico Vannini, con una sovvenzione del C.N.R.

(**) Nella seduta dell'8 maggio 1971.

(1) F. DI GRANDE, *Effetti della panirradiazione con raggi X sulle gonadi e gli organi di Bidder di embrioni e larve di Bufo bufo*, « Rend. Accad. Naz. Lincei », ser. VIII, 43, 393-400 (1967).

(2) F. DI GRANDE, *Sviluppo postmetamorfico delle gonadi e degli organi di Bidder in esemplari di Bufo bufo precocemente panirradiati con raggi X*, « Rend. Accad. Naz. Lincei », ser. VIII, 45, 437-442 (1968).

tavole di Cambar e Gipouloux (3). In tale stadio di sviluppo le cellule germinali primordiali (che, come è noto, provengono dall'entoderma e vengono attratte chemiotatticamente nella regione genitale (4)) sono tuttora disposte in prevalenza in un cordone impari mediano alla radice del mesenterio e solo ai livelli più cefalici hanno cominciato a collocarsi nelle due creste genitali, ai lati del mesenterio.

Nel ceppo di *Bufo bufo* da me adoperato (proveniente dai dintorni di Bologna), in normali condizioni di sviluppo tali cellule germinali sono circa un'ottantina; solo più tardi, nei primi stadi di vita larvale, quando già da qualche tempo esse hanno interamente raggiunto le creste genitali, cominciano a moltiplicarsi per mitosi, così che già allo stadio IV₅ delle Tavole di Cambar e Gipouloux il loro numero risulta raddoppiato e continua ad aumentare rapidamente negli stadi successivi.

Gli esemplari da me irradiati allo stadio III₈ e poi allevati in acqua di rubinetto alimentandoli con ortica tritata e *Spirogyra*, vennero fissati in piccoli gruppi in liquido di Bouin, a diversa distanza dall'irradiazione man mano che avevano raggiunto successivi stadi di sviluppo; essi furono inclusi in paraffina, tagliati in fette trasversali di 10 μ e colorati con emallume eosina. Per ciascun animale ho contato il numero dei gonociti (Tabella I e fig. 1) ed eseguito una ricostruzione grafica degli abbozzi genitali (fig. 2).

Gli esemplari fissati 1 e 2 giorni dopo l'irradiazione, quando si trovavano agli ultimi stadi della vita embrionale (III₉ e III₁₀), esaminati istologicamente mostrano abbozzi genitali di aspetto normale; anche le cellule germinali in questi contenute, tuttora ricche di globuli di tuorlo, non mostrano alcun segno di sofferenza e il loro numero totale è assai vicino a quello consueto di circa un'ottantina o di poco inferiore. Soltanto ai livelli più caudali della regione genitale, un certo numero di gonociti è talora rimasto collocato nel mesenterio, fuori delle creste genitali, forse attardato nella sua migrazione verso le creste genitali in conseguenza dell'irradiazione con raggi X subita dall'embrione. A ciò possiamo, probabilmente, almeno in parte attribuire il fatto che, in alcuni degli esemplari esaminati, il numero dei gonociti presenti negli abbozzi genitali risulti un po' più basso della norma. In questi stadi di sviluppo, le cellule degli organi di origine entodermica sono tuttora ricche di globuli di tuorlo. Gli abbozzi dei mesonefri, in corso di differenziamento, non sembrano avere sofferto dell'irradiazione; alcune delle loro cellule si trovano in mitosi.

Gli animali fissati 5, 8 o 12 giorni dopo l'irradiazione, rispettivamente agli stadi IV₂, IV₃, IV₄ della vita larvale, hanno gli organi di origine ento-

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

(4) A. W. BLACKLER, *The integrity of the reproductive cell line in the Amphibia*, « Current Topics in Developmental Biology », 5, 71-87 (1970). J. D. GIPOULOUX, *Recherches expérimentales sur les rôle joué par les organes mésodermiques dorsaux sur la migration des cellules germinales primordiales (Amphibiens Anoures)*, « C.R. 91° Congr. Nat. Soc. Sav., Sect. Sci. », Rennes, III, 361-374 (1967).

dermica già privi di tuorlo, mesonefri ormai bene sviluppati e funzionanti, ed abbozzi genitali di aspetto normale. Le cellule germinali contenute in questi ultimi hanno in parte già consumato il proprio tuorlo e spesso il loro citoplasma è ricco di pigmento; di norma non mostrano segni di sofferenza, ma il loro numero non appare aumentato, anzi di norma lievemente diminuito rispetto agli stadi precedenti. Come appare dalla ricostruzione grafica (fig. 2, A) la ripartizione dei gonociti lungo gli abbozzi genitali corrisponde a quella consueta per le larve di *Bufo bufo* in questi stadi di sviluppo: maggiore addensamento nel tratto cefalico, destinato a svilupparsi in organo di Bidder, e progressiva rarefazione nel tratto più caudale, destinato a dare origine alla gonade propriamente detta. Diverso dagli altri è soltanto un esemplare fissato 5 giorni dopo l'irradiazione, i cui abbozzi genitali sono quasi sterili, contenendo in tutto solo cinque gonociti (Tabella I); in esso l'abbozzo genitale nei livelli sterili è costituito da cellule somatiche molto pigmentate, più numerose nei tratti cefalici corrispondenti al territorio presuntivo dell'organo di Bidder.

TABELLA I.

Numero delle cellule germinali presenti negli abbozzi genitali di esemplari uccisi a diversa distanza dalla panirradiazione con raggi X.

Giorni trascorsi	Stadio raggiunto	Numero dei gonociti		Giorni trascorsi	Stadio raggiunto	Numero dei gonociti	
		a sinistra	a destra			a sinistra	a destra
1	III ₉	47	42	12	IV ₄	38	26
		41	31			29	21
		30	28			25	23
		18	25			21	14
2	III ₁₀	40	38	16	IV ₄₋₅	17	23
		33	23			14	5
		32	20			5	7
5	IV ₂	33	38	22	IV ₅	9	3
		37	31			—	1
		28	21			1	—
		3	2			—	—
8	IV ₃	33	38	28	IV ₂	—	—
		37	31			—	—
		28	21			—	—
		3	2			—	—
8	IV ₃	41	37	37	IV ₄₋₅	—	—
		39	32			—	—
		29	32			—	—
		18	16			1	1
					IV ₈₋₉	—	—

La situazione cambia piuttosto bruscamente a partire dagli esemplari che vennero fissati 16 giorni dopo l'irradiazione, quando avevano raggiunto lo stadio larvale IV₄₋₅. Come appare dal diagramma della fig. 1, il numero dei gonociti subisce infatti un rapido decremento, che si accentua nei periodi

successivi (dopo 22, 28 o 37 giorni dall'irradiazione quando gli animali si trovavano agli stadi dal IV₅ al IV₈₋₉), conducendo ad una condizione di assoluta o quasi assoluta sterilità (fig. 2, B, C, D). Del tutto sterili sono anche le gonadi di un paio di esemplari che, benchè fissati 28 giorni dopo l'irradiazione, avevano arrestato il loro sviluppo allo stadio larvale precoce IV₂ (Tabella I).

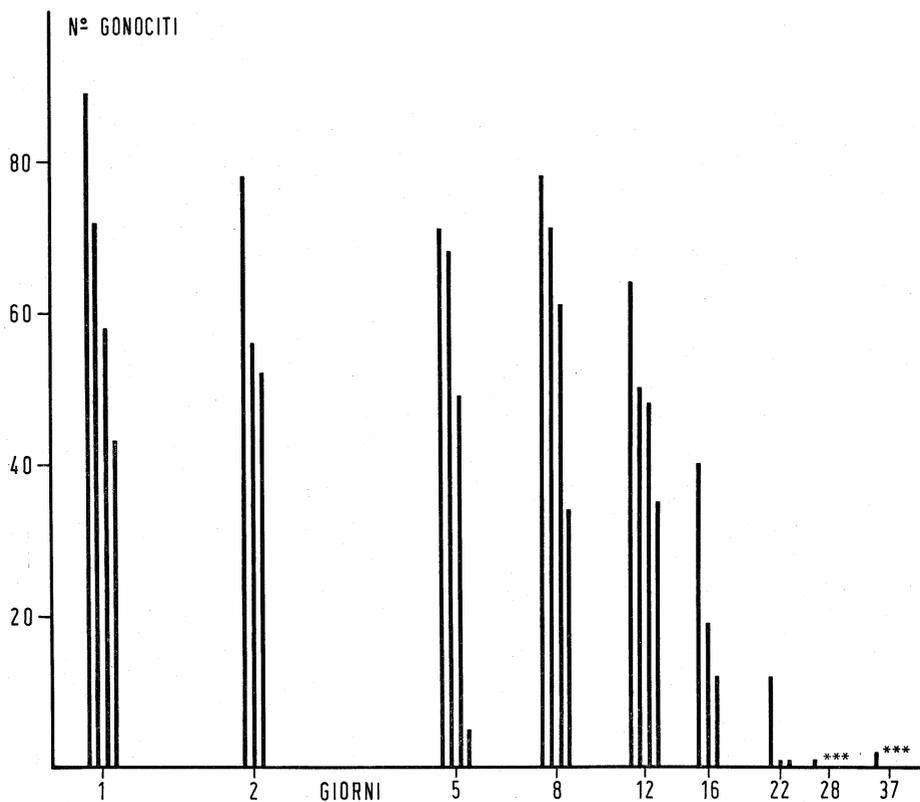


Fig. 1. - Diagramma ricavato dai conteggi delle cellule germinali a diversa distanza dalla panirradiazione con raggi X. In ordinate il numero dei gonociti; in ascisse il tempo in giorni in scala logaritmica. L'altezza delle colonne corrisponde al numero dei gonociti nei due abbozzi genitali di ciascun esemplare; gli asterischi ai giorni 28 e 37 indicano abbozzi genitali completamente sterili.

Questi reperti si prestano a venire interpretati ammettendo che le cellule germinali, normalmente insediatesi nelle creste genitali negli ultimi stadi di vita embrionale (fra lo stadio III₈ e il III₁₀), manifestino gli effetti nocivi della panirradiazione soltanto all'epoca in cui si accingono ad entrare in mitosi. È importante notare, a questo proposito, che nel ceppo di *Bufo bufo* da me utilizzato le cellule germinali, giunte nelle creste genitali, di norma rimangono quiescenti sino allo stadio IV₂ della vita larvale e soltanto a partire dallo stadio IV₃ cominciano a moltiplicarsi per mitosi. In condizioni normali di sviluppo, dapprima i processi mitotici interessano prevalentemente i gonociti

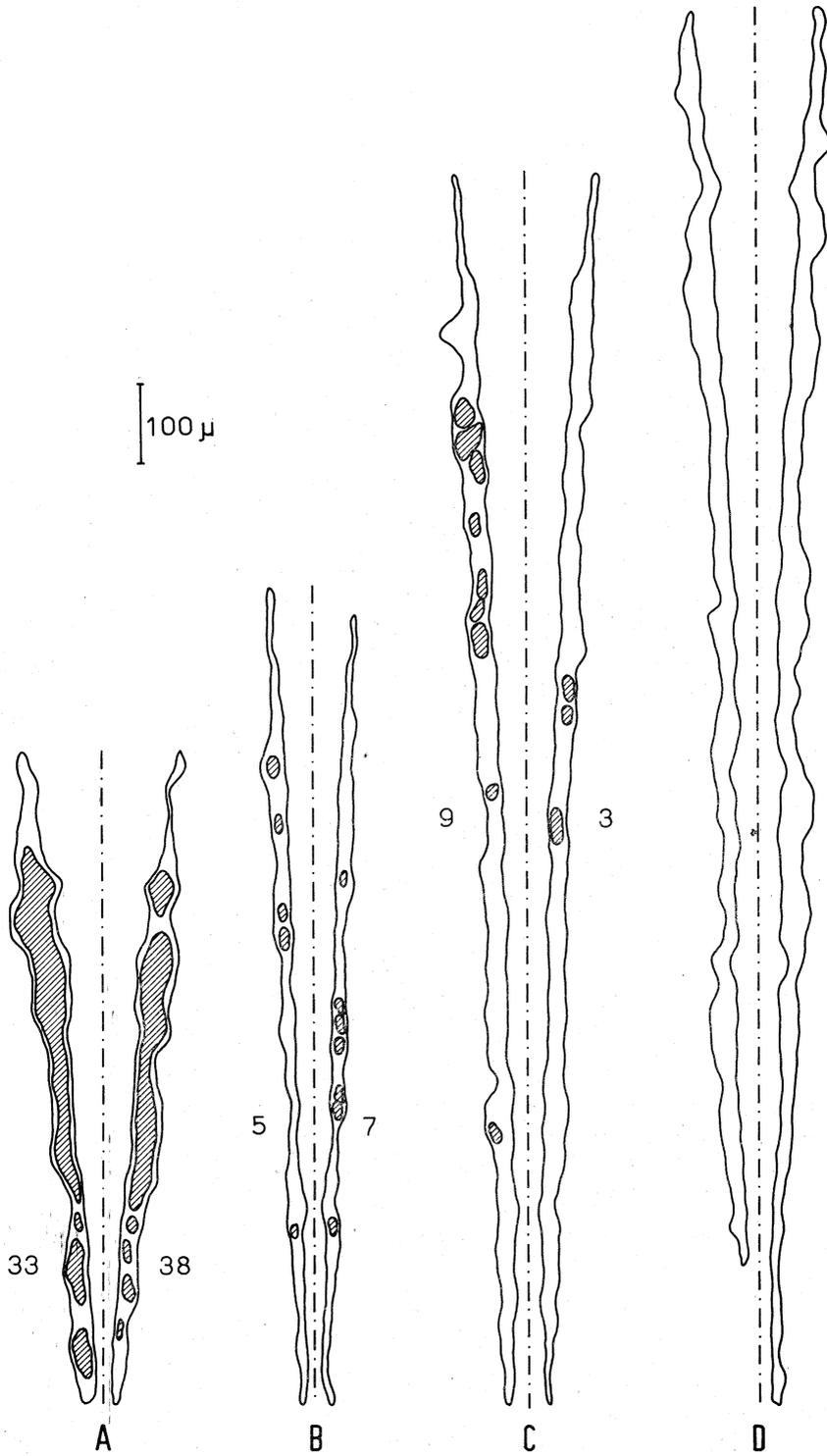


Fig. 2. — Profili degli abbozzi genitali in esemplari uccisi a diversa distanza dall'irradiazione: dopo 5 giorni allo stadio IV_2 (A), dopo 16 giorni allo stadio IV_{4-5} (B), dopo 22 giorni allo stadio IV_5 (C) e dopo 37 giorni allo stadio IV_{8-9} (D). A tratteggio le zone occupate da gonociti, il cui numero è indicato ai lati dei relativi disegni.

collocati nel tratto più cefalico degli abbozzi genitali, corrispondente al futuro organo di Bidder, per cui già allo stadio IV_4 a tali livelli il numero delle cellule germinali appare significativamente aumentato; poco più tardi le mitosi si estendono in direzione caudale, nei livelli della futura gonade propriamente detta.

Se ammettiamo che le cellule germinali degli esemplari precocemente sottoposti a panirradiazione con raggi X siano destinate a degenerare solo nel momento in cui dovrebbero moltiplicarsi per mitosi, riusciamo a comprendere la ragione per la quale il loro numero negli abbozzi genitali risulta normale o di poco subnormale negli ultimi stadi di vita embrionale (III_9 e III_{10}) e nei primissimi della vita larvale (sino a circa il IV_2), diminuisce lentamente negli stadi immediatamente successivi (nei quali invece in condizioni normali di sviluppo dovrebbe cominciare ad aumentare) e quindi scende a valori estremamente bassi, sino alla loro completa scomparsa in molti casi (fig. 1).

Questa graduale sterilizzazione degli abbozzi genitali mi induce a ritenere che entro i primi venti giorni di vita larvale tutte le cellule germinali primordiali siano destinate ad entrare in mitosi, sia pure in tempi diversi, e pertanto a regredire se previamente avevano subito gli effetti dell'irradiazione.

Nel materiale che ho studiato non ho mai visto normali mitosi di cellule germinali, ma talvolta ho riscontrato nel tessuto somatico degli abbozzi genitali alcune cavità tuttora piene di detriti cellulari, residuati dalla degenerazione recente di qualche gonocita.

Il confronto delle ricostruzioni grafiche a diversi stadi di sviluppo (fig. 2, A, B, C, D) conferma, d'altra parte, che inizialmente il maggior numero di entrate in mitosi (e pertanto di degenerazioni di gonociti negli animali sottoposti ad irradiazione) si manifesta ai livelli cefalici degli abbozzi genitali. Difatti prima della degenerazione in questo tratto, presuntivamente bidderiano, si trova accumulato il maggior numero di cellule germinali (fig. 2, A), mentre più tardi, a degenerazione avvenuta (fig. 2, B, C), i pochi gonociti residui risultano circa equamente ripartiti fra territorio bidderiano e tratto più caudale dell'abbozzo genitale (corrispondente alla gonade propriamente detta). Negli animali fissati nei giorni successivi, con l'estendersi delle mitosi anche ai tratti più caudali si arriva infine a corpi genitali completamente sterili (fig. 2, D).

Il fatto, già notato in una delle mie Note precedenti ⁽¹⁾, che quando permangono solo pochi gonociti essi sono frequentemente collocati in sedi cefaliche degli abbozzi genitali, può venire interpretato come conseguenza del fatto che in tali sedi esisteva inizialmente il più gran numero di elementi germinali.

Come appare dalla Tabella I, in seguito all'irradiazione eseguita allo stadio III_8 , il grado di sterilità raggiunto dipende più dal tempo trascorso dall'irradiazione e, quindi, dall'età dell'esemplare, che dallo stadio di sviluppo cui esso è pervenuto. Così, per esempio, due esemplari fissati dopo 28 giorni dall'irradiazione erano del tutto privi di gonociti, benché dal punto di vista dell'aspetto esterno fossero rimasti allo stadio IV_2 ; degli altri animali fissati

allo stadio IV₂, dopo solo 5 giorni dall'irradiazione, tre avevano abbozzi genitali tuttora ricchi di cellule germinali, ed uno solo eccezionale, come ho già notato, era quasi sterile. Possiamo pure rilevare che, fra gli esemplari fissati allo stadio IV₄₋₅, dei tre uccisi 16 giorni dopo l'irradiazione uno solo era quasi sterile, mentre sterili del tutto erano quelli fissati 28 o 37 giorni dopo l'irradiazione. Il punto critico per la degenerazione di quasi tutti i gonociti non è dunque il passaggio allo stadio IV₅ od a stadi successivi, ma l'aver superato una certa età, corrispondente ad oltre 16 giorni dal momento dell'irradiazione.

Diversamente dai gonociti, il tessuto somatico degli abbozzi genitali è poco sensibile all'azione dei raggi X, alle dosi adoperate. Esso infatti rimane conservato, un po' più abbondante ai livelli cefalici, presuntivamente bidderiani, rispetto a quelli caudali, presuntivamente gonadici e gli abbozzi genitali, anche se divenuti sterili, continuano lentamente ad accrescersi in lunghezza con il procedere dell'età degli esemplari. Come ho già dimostrato in una Nota precedente ⁽²⁾, anche in assenza delle cellule germinali distrutte dall'irradiazione, i tessuti somatici degli abbozzi genitali conservano la capacità di un differenziamento sessuale di tipo maschile o femminile a seconda del genotipo dei singoli esemplari.