
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

MARIA VALLISNERI, FRANCESCO ZACCANTI

**Diagnosi del genotipo sessuale in embrioni di pollo
(Gallus domesticus) I. Embrioni sessualmente
differenziati**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 77 (1984), n.5, p. 189–195.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1984_8_77_5_189_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. — *Diagnosi del genotipo sessuale in embrioni di pollo* (*Gallus domesticus*). I. *Embrioni sessualmente differenziati* (*). Nota di MARIA VALLISNERI e FRANCESCO ZACCANTI (**), presentata (***) dal Corrisp. E. VANNINI.

SUMMARY. — Interphase nuclei of skin cells have been studied in chick embryos from 12 to 14 incubation days, when the anatomical phenotype of the female gonads is distinguished from that of the male gonads. Out of thousand male cells and thousand female cells, these results were obtained:

a) the total number of the heterochromatic bodies for nucleus is greater for the male than for the female embryos (σ : 9.21 ± 0.18 ; φ : 6.89 ± 0.10);

b) the total area of the heterochromatic bodies for nucleus is greater for the male than for the female embryos (σ : $56.9 \pm 1.6 \mu^2$; φ : $45.9 \pm 1.0 \mu^2$);

c) 41% female nuclei have an heterochromatic body considerably greater than the others.

These data may be utilized in order to diagnose the sexual genotype of young embryos, in which morphological differences between ovary and testis structures are not recognizable.

INTRODUZIONE

La diagnosi del genotipo sessuale negli embrioni dei Vertebrati può essere condotta sulla base delle differenze kariologiche e citologiche esistenti tra i due sessi o mediante il riconoscimento delle caratteristiche istologiche ed anatomiche dei corpi genitali in corso di differenziamento.

In particolare negli Uccelli e segnatamente nel pollo differenze anatomiche tra i due fenotipi sessuali gonadici sono rilevabili a partire dal nono giorno di incubazione, quando nelle femmine si instaura una marcata asimmetria tra gonade sinistra a sviluppo ovarico e gonade destra rudimentale; nelle femmine infatti il corpo genitale di sinistra appare sensibilmente più grande di quello controlaterale, mentre nei maschi i corpi genitali dei due lati mantengono dimensioni pressoché simili.

Le differenze anatomiche tra gli abbozzi gonadici dei due sessi sono precedute da differenze istologiche. Durante il settimo-ottavo giorno di incubazione nei maschi si differenziano i cordoni sessuali primari che vengono colonizzati da cellule germinali. Successivamente a otto-nove giorni di incubazione inizia

(*) Lavoro eseguito con un finanziamento del Ministero della Pubblica Istruzione.

(**) Istituto di Zoologia della Università di Bologna, via S. Giacomo, 9 - 40126 Bologna.

(***) Nella seduta del 24 novembre 1984.

la formazione di cordoni sessuali secondari che nelle femmine inglobano la maggior parte delle cellule germinali e che nei maschi si abbozzano senza procedere oltre nello sviluppo.

Differenze citologiche nelle cellule somatiche maschili e femminili sono state segnalate nel pollo (Kosin e Ishizaki, 1959; Ishizaki e Kosin, 1960; Ohno, Kaplan e Kinoshita, 1960; Moore e Hay, 1961), in anatra e colomba (Culzoni e Gabbi, 1973). Kosin e Ishizaki riconoscono una cromatina sessuale femminile nei nuclei interfascici di muscoli intestinali, fegato, derma ed epidermide alla base degli abbozzi delle penne con un'incidenza positiva oscillante tra il 15-56%. La presenza di cromatina sessuale nei nuclei interfascici femminili di Uccelli non ha trovato conferma da parte di Ashley e Theiss (1959) che hanno studiato diversi tessuti nel pollo, anatra, pappagallo, parrocchetto e da parte di Miles e Storey (1962) nel pollo.

Ohno, Kaplan e Kinoshita nel 1960 attribuivano la « sex chromatin » dei nuclei somatici femminili di pollo alla eterocromatizzazione dell'unico cromosoma Z presente nel cariotipo, ritenendosi allora che la formula cromosomica sessuale del pollo fosse del tipo ZZ/ZO, con 78 cromosomi nel maschio e 77 nelle femmine (Oguma, 1938; Stenius, Christian e Ohno, 1963). In seguito, identificato il cromosoma W nel pollo (Frederic, 1961; Schmid, 1962) e in altre specie di Uccelli (Rothfels, Aspden e Mollison, 1963; Ohno, Stenius, Christian, Becak W. e Becak M.L., 1964; Krishan, Halden e Shoffner, 1966) è stata generalizzata per l'intera classe la condizione di eterogametia femminile di tipo ZZ/ZW (Takagi e Sasaki, 1974). Nel pollo Owen (1965) stabilisce un numero diploide di 78 cromosomi e colloca la coppia ZZ del maschio al quinto posto dell'ordine delle dimensioni decrescenti. Lo stesso Autore descrive il cromosoma W della femmina come un submetacentrico di dimensioni simili a quelle del settimo e del nono paio di autosomi.

L'esistenza di un corpo eterocromatico nei nuclei interfascici femminili viene attribuita da Schmid (1962) all'eterocromatizzazione del cromosoma W sulla base di risultati di incorporazioni differenziali di timidina radioattiva: tali incorporazioni avvengono contemporaneamente negli autosomi e nel cromosoma Z e sono invece più tardive nel cromosoma W. I dati di Schmid non trovano conferma da parte di Bianchi e Molina (1967) che non rilevano ritardi significativi della duplicazione del cromosoma W rispetto a quella degli altri macrocromosomi del pollo. Tone *et al.* (1982) indicano come possibile causa della eterocromatizzazione del cromosoma W del pollo la presenza di sequenze ripetitive nel DNA. Stefos e Arrighi (1971), nel confermare la condizione eterocromatica del cromosoma W nel pollo e in altri Uccelli, suggeriscono la possibilità di una utilizzazione pratica di tale aspetto citologico nella diagnosi precoce del sesso.

Nell'ambito di un programma di ricerca sul differenziamento sessuale negli Uccelli, volto a precisare le eventuali differenze nel numero di cellule germinali esistenti nei due sessi in momenti iniziali del differenziamento gonadico, è emersa l'esigenza di un precoce riconoscimento del genotipo sessuale degli embrioni. Lo scopo della presente ricerca è quello di verificare la presenza differenziale di

corpi eterocromatici nei nuclei interfascici di embrioni di pollo dei due sessi e di controllare la possibilità di utilizzazione degli eventuali risultati positivi nella diagnosi del sesso genetico di embrioni in stadi di sviluppo precedenti il differenziamento sessuale gonadico.

MATERIALI E METODI

Embrioni di pollo di razza livornese bianca sono stati incubati in laboratorio e sacrificati dopo 12, 13, 14 giorni.

Tra gli embrioni uccisi dopo 12, 13 e 14 giorni di incubazione, quando avevano raggiunto stadi di sviluppo compresi tra i numeri 38, 39 e 40 delle tavole di Hamilton (1952), sono stati scelti 10 maschi e 10 femmine riconosciuti come tali in base all'osservazione del fenotipo anatomico delle gonadi. Dalla pelle degli embrioni sono stati ottenuti preparati citologici secondo la usuale metodica che comporta shock ipotonico con citrato di sodio 1%, fissazione in liquido di Carnoy, dissociazione con acido acetico, colorazione con liquido di Giemsa.

Mediante l'esame citologico di 100 nuclei interfascici scelti a caso per ognuno dei 10 embrioni di sesso maschile e dei 10 embrioni di sesso femminile sono stati contati i corpi eterocromatici distinguibili in ciascun nucleo e di ciascun corpo eterocromatico è stato misurato il diametro utilizzando un oculare graduato che consentiva approssimazioni di 0.65 micron. Con i dati ottenuti sono stati costruiti istogrammi di frequenza e sono state calcolate le aree eterocromatiche totali di ciascun nucleo.

RISULTATI

I dati ottenuti dal conteggio dei corpi eterocromatici di nuclei interfascici di embrioni di pollo sacrificati dopo 12-14 giorni di incubazione, sono riportati nell'istogramma della fig. 1. La distribuzione percentuale dei nuclei dal punto di vista del numero dei corpi eterocromatici presenti in ciascun di essi, mostra andamenti distinti per i maschi e per le femmine, il primo, relativo ai maschi, intorno ad una media di 9.21 ± 0.18 corpi eterocromatici per nucleo, il secondo, relativo alle femmine, intorno ad una media di 6.89 ± 0.10 corpi eterocromatici per nucleo. La differenza tra il numero medio di corpi eterocromatici nei nuclei maschili e femminili risulta statisticamente significativa ($t = 11.27$, $p < 0.001$).

Per ciascun nucleo esaminato è stata stimata l'area totale dei corpi eterocromatici: la forma di ciascun corpo eterocromatico è stata approssimata a quella di un cerchio e l'area totale (S) è stata calcolata con la formula

$$S = \sum_{i=1}^n \frac{(\pi \cdot d^2)}{4}$$

in cui «d» è il diametro degli «n» corpi eterocromatici. Negli istogrammi della fig. 2 sono riportate le distribuzioni percentuali dei nuclei interfascici maschili e

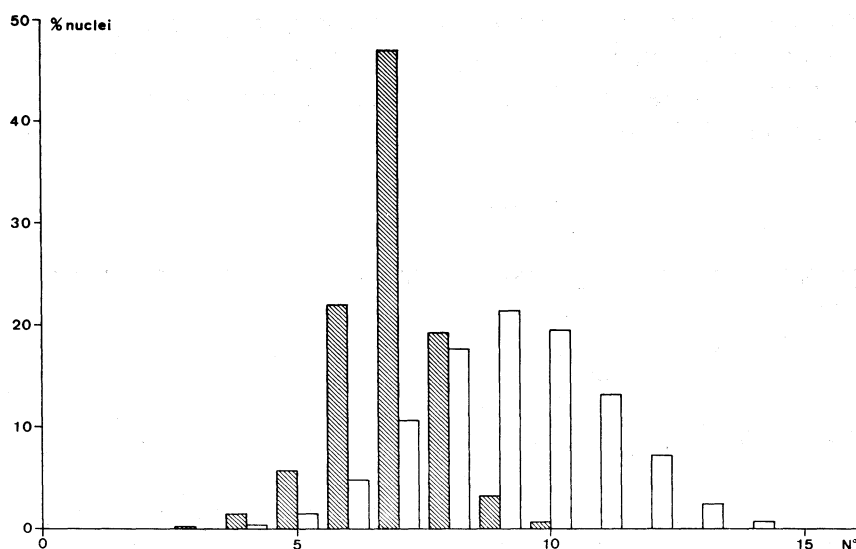


Fig. 1. - Distribuzione di nuclei interfase di cellule di pelle in embrioni di pollo a tredici giorni di incubazione in funzione del numero di corpi eterocromatici. Istogrammi tratteggiati: femmine; istogrammi bianchi: maschi.

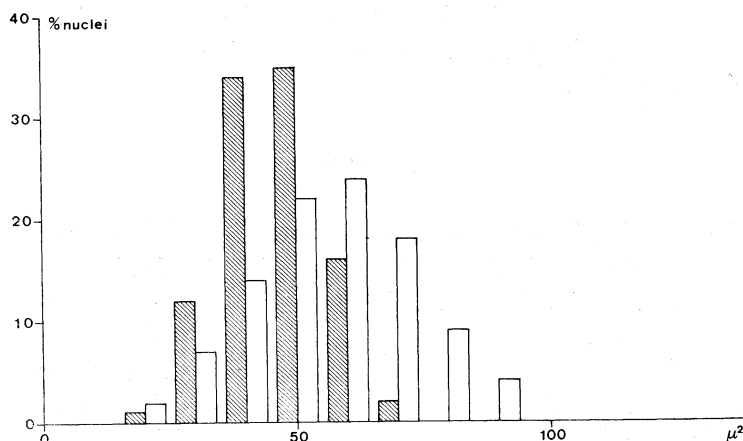


Fig. 2. Distribuzione di nuclei interfase di cellule di pelle in embrioni di pollo a tredici giorni di incubazione in funzione dell'area totale dei corpi eterocromatici. Istogrammi tratteggiati: femmine; istogrammi bianchi: maschi.

femminili in funzione dell'area totale dei corpi eterocromatici. Ancora una volta sono state ottenute due distribuzioni approssimativamente normali, di cui quella di sinistra intorno a valori medi di superficie dei corpi eterocromatici di $45.9 \pm \pm 1.0$ micron quadrati è relativa ai nuclei femminili, quella di destra intorno a valori medi di superficie dei corpi eterocromatici di 56.9 ± 1.6 micron quadrati è relativa ai nuclei maschili. La differenza tra i valori medi è risultata statisticamente significativa ($t = 5.83$ $p < 0.001$).

Infine per ciascun nucleo esaminato è stato preso in considerazione il corpo eterocromatico di diametro maggiore (fig. 3). I nuclei maschili si distribuiscono in funzione del corpo eterocromatico maggiore intorno al valore medio di 3.55 ± 0.05 micron: una parte dei nuclei femminili si dispone intorno a valori medi di 3.51 ± 0.04 micron, e presenta una distribuzione sovrapponibile con quella dei maschi; la rimanente parte presenta corpi eterocromatici maggiori il cui diametro varia intorno al valore medio di 5.54 ± 0.10 micron. Questa seconda distribuzione appare statisticamente diversa da quella dei nuclei dei maschi ($t = 17.80$ $p < 0.001$) e delle restanti femmine ($t = 18.85$ $p < 0.001$).

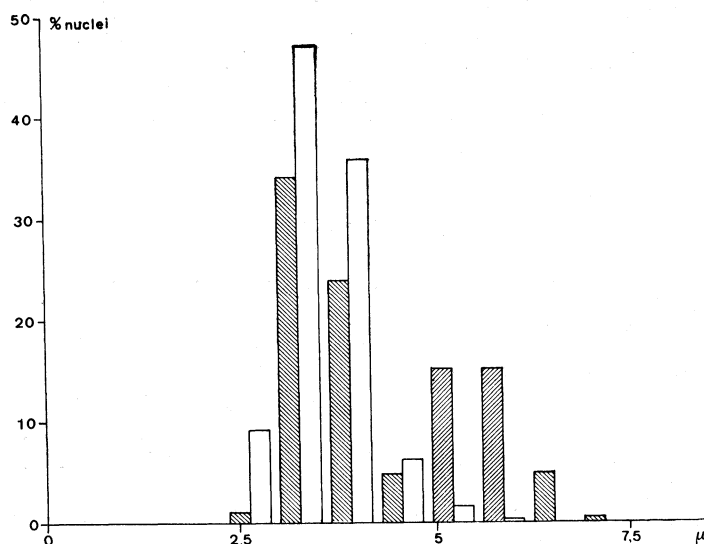


Fig. 3. Distribuzione di nuclei interfaseici di cellule di pelle in embrioni di pollo a tredici giorni di incubazione in funzione del diametro del corpo eterocromatico maggiore. Istogrammi tratteggiati: femmine; istogrammi bianchi: maschi.

Un ulteriore esame dei preparati, volto a definire le frequenze dei nuclei interfaseici contenenti un corpo eterocromatico nettamente più grande degli altri, ha permesso di distinguere situazioni diverse nei maschi e nelle femmine: nei maschi infatti si è ottenuta una percentuale media di cellule con corpo eterocromatico maggiore (CEM) di $6.1\% \pm 0.6$, ammontando invece nelle femmine la percentuale di nuclei con corpo eterocromatico maggiore al $41.4\% \pm 1.4$.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

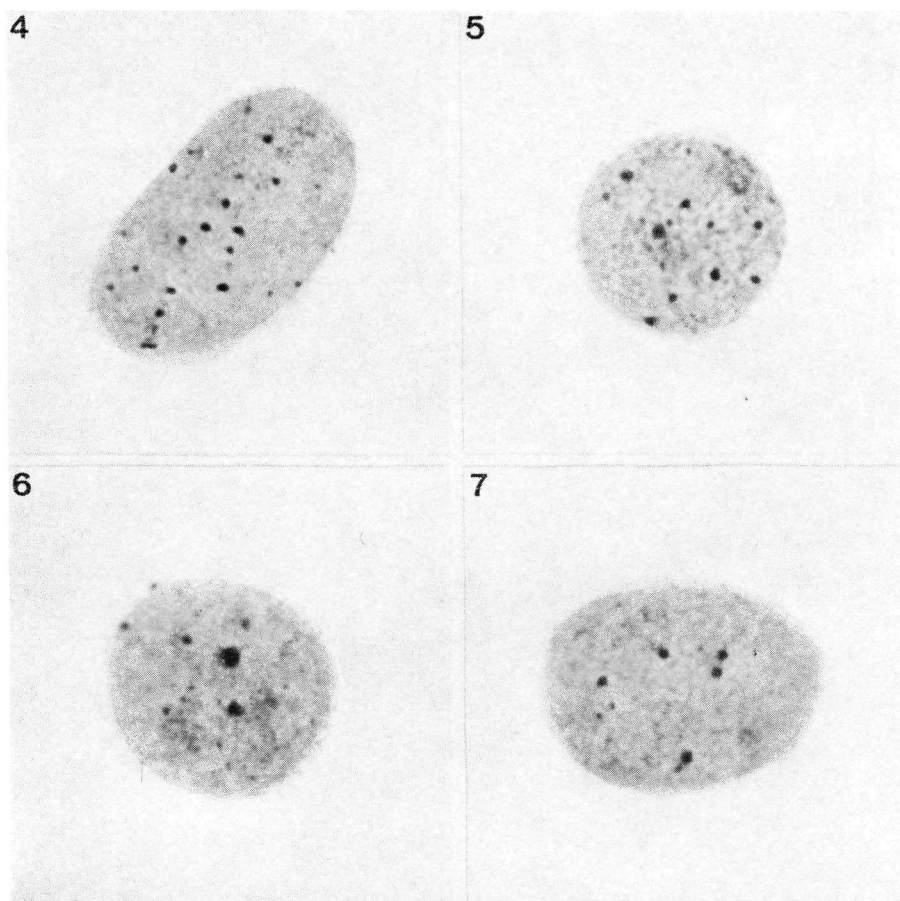
Le osservazioni citologiche condotte su nuclei interfaseici maschili e femminili di embrioni di pollo di 12, 13, 14 giorni, hanno permesso di verificare positivamente l'ipotesi di partenza. Gli animali il cui fenotipo sessuale è riconoscibile sulla base di differenze anatomiche a carico degli abbozzi gonadici, con-

sistenti in una asimmetria delle gonadi più marcata nelle femmine che nei maschi, hanno dimostrato differenze sessuali di tipo citologico; è stato cioè possibile contare un minor numero di corpi eterocromatici nei nuclei femminili rispetto a quelli maschili e stimare un'area totale dei corpi eterocromatici per nucleo minore nelle femmine rispetto ai maschi. È stata inoltre rilevata la presenza nel 41.4% dei nuclei somatici femminili di un corpo eterocromatico maggiore circa una volta e mezzo più grande del corpo eterocromatico maggiore dei nuclei maschili e della quota restante di nuclei interfascici femminili.

La diagnosi del genotipo sessuale negli embrioni di pollo, che può essere eseguita per via anatomica ed istologica, può essere quindi confermata, almeno nel materiale utilizzato nella presente occasione, anche per via citologica. A tal fine la presenza di un corpo eterocromatico grande in una rilevante percentuale dei nuclei interfascici femminili può costituire l'elemento discriminante per orientare un operatore dotato di un minimo di esperienza nella decisione diagnostica.

BIBLIOGRAFIA

- ASHLEY D.J.B. e THEISS E.A. (1959) - *Nuclear sex in species showing male homogamety* «Anat. Rec.», 135 (2), 115-119.
- BIANCHI N.O. e MOLINA O.J. (1967) - *Chronology and pattern of replication in the bone marrow chromosomes of Gallus domesticus*. «Chromosoma (Berl.)», 21, 387-397.
- CULZONI V. e GABBI C. (1973) - *Geschlechts-oder Barr-Chromatin bei der Ente (Anas platyrhynchos) und Taube (Columba livia)*. «Anat. Histol. Embryol.», 2, 54-60.
- FREDERIC J. (1961) - *Contribution à l'étude du caryotype chez le poulet*. «Arch. Biol.», 72, 185-209.
- HAMILTON H.L. (1952) - *Lillie's Development of the Chick. An introduction to Embryology*. Holt H. and Co., New York.
- ISHIZAKI H. e KOSIN I.L. (1960) - *Sex chromatin in early chick embryos*. «Exp. Cell Res.», 21, 197-200.
- KOSIN I.L. e ISHIZAKI H. (1959) *Incidence of sex chromatin in Gallus domesticus*. «Science», 130, 43-44.
- KRISHAN A., HALDEN G.J. e SHOFFNER R.N. (1966) - *Mitotic chromosomes and the W-sex chromosome of the great horned owl (Bubo virginianus)*. «Chromosoma (Berl.)», 17, 258-263.
- MILES C.P. e STOREY S.D. (1962) - *Nuclear chromocenters of cultured chicken cells*. «Exp. Cell Res.», 27, 377-381.
- MOORE K.L. e HAY J.C. (1961) - *Sexual dimorphism in intermitotic nuclei of Birds*. «Anat. Rec.», 139, 315.
- OGUMA K. (1938) - *Studies on Sauropsid chromosomes. V. The karyotypes of the quail and the duck, different from those reported by previous authors*. «Annot. Zool. Japon.», 17, 612-622.
- OHNO S., KAPLAN W.D. e KINOSITA R. (1960) - *On the sex chromatin of Gallus domesticus*. «Exp. Cell Res.», 19, 180-183.
- OHNO S., STENIUS C., CHRISTIAN L.C., BECAK W. e BECAK M.L. (1964) - *Chromosomal uniformity in the avian subclass Carinatae*. «Chromosoma (Berl.)», 15, 280-288.
- OWEN J.J.T. (1965) - *Karyotype studies on Gallus domesticus*. «Chromosoma (Berl.)», 16, 601-608.
- ROTHFELS K.H., ASPDEN M. e MOLLISON M. (1963) - *The W-chromosome of the budgerigar, Melopsittacus undulatus*. «Chromosoma», 14, 459-467.



- SCHMID W. (1962) – *DNA replication patterns of the heterochromosomes in Gallus domesticus*. «Cytogenetics», 1, 344-352.
- STEFOS K. e ARRIGHI F.E. (1971) – *Heterochromatic nature of W chromosome in birds*. «Exptl, Cell Res.», 68, 228-231.
- STENIUS C., CHRISTIAN L.C. e OHNO S. (1963) – *Comparative cytological study of Phasianus colchicus, Meleagris gallopavo and Gallus domesticus*. «Chromosoma (Berl.)», 13, 515-520.
- TAKAGI N. e SASAKI M. (1974) *A phylogenetic study of bird karyotypes*. «Chromosoma (Berl.)», 46, 91-120.
- TONE M., NAKANO N., TAKAO E., NARISAWA S. e MIZUNO S. (1982) – *Demonstration of W chromosome-specific repetitive DNA sequences in the domestic fowl, Gallus g. domesticus*. «Chromosoma (Berl.)», 86, 551-569.

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA I

- Figg. 4-5. – Nuclei interfaseici di cellule di pelle di embrioni di pollo maschi a tredici giorni di incubazione. Evidenti piccoli corpi eterocromatici (1570×).
- Fig. 6. – Nucleo interfaseico di cellule di pelle di embrioni di pollo femmine a tredici giorni di incubazione. I corpi eterocromatici sono in numero minore rispetto ai nuclei maschili; uno di essi ha dimensioni nettamente maggiori degli altri. Una situazione simile è stata osservata nel 41,4% dei nuclei femminili (1570×).
- Fig. 7. – Nucleo interfaseico di cellule di pelle di embrioni di pollo femmine a tredici giorni di incubazione. I corpi eterocromatici presenti sono di piccole dimensioni e in numero minore rispetto a quelli dei maschi. Una situazione del genere è stata riscontrata nel 58,6% dei nuclei femminili (1570×).

At. Vallisneri e F. Zaccanti (1984)