
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

FOSCARINA DI GRANDE

**Effetti dell'ablazione della regione caudale sulla
migrazione dei gonociti nelle creste genitali in
embrioni e larve di Bufo bufo**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 69 (1980), n.6, p. 431-437.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1980_8_69_6_431_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. — *Effetti dell'ablazione della regione caudale sulla migrazione dei gonociti nelle creste genitali in embrioni e larve di Bufo bufo* (*). Nota di FOSCARINA DI GRANDE, presentata (**) dal Corrisp. E. VANNINI.

SUMMARY. — In young embryos of *Bufo bufo* toad some germ cells are localized in the most dorso-caudal part of the endodermic mass. The ablation of this part produces a reduction of the number of germ cells migrating in the genital ridges, and a reduction of the length of genital bodies and mesonephros. By multiplication of residual germ cells, genital ridges subsequently differentiate, as in normal specimens, a Bidder organ in their cephalic tract and a reduced gonad in their caudal tract.

È noto da molto tempo che negli Anfibi Anuri, come in molti altri Vertebrati, le cellule germinali primordiali hanno origine diversa da quella della parte somatica degli abbozzi genitali. Esse originano, infatti, in seno all'ammasso delle cellule endodermiche (Bounoure, 1939; Monroy, 1939; Blackler, 1966; Gipouloux, 1971) [1], ricche di globuli di tuorlo, e sono in un primo tempo indistinguibili da esse con le normali colorazioni istologiche, ma ne differiscono perchè esse sole contengono il « citoplasma germinale »: una sostanza citoplasmatica che differisce nettamente dagli altri inclusi citoplasmatici per la sua colorabilità con tecnica adatta (Bounoure, 1934; Blackler, 1958) [2], costituita da « granuli germinali » densi agli elettroni, associati più o meno strettamente ai mitocondri e ai ribosomi (Czolowska, 1972) [3].

Negli Anfibi Anuri della famiglia dei Bufonidi le cellule germinali primordiali sono ben localizzabili verso la fine della vita embrionale, corrispondente agli stadi III₅-III₆ delle tavole di Cambar e Gipouloux [4], quando, richiamate dalla azione attrattiva del cordomesoblasto dorsale, migrano attivamente verso la regione più dorsale dell'ammasso endodermico (Gipouloux, 1970; Giorgi, 1974) [5]. Allo stadio III₅ costituiscono dapprima un cordone impari mediano che si rileva nella parte più dorsale dell'endoderma a livelli molto caudali, posteriori anche al livello in cui sboccano in cloaca i dotti di Wolff (fig. 2). Da questa sede i gonociti poi risalgono lungo il mesentere in corso di formazione e, cominciando dai livelli più cefalici, colonizzano le due pieghe genitali mesodermiche che si formano ai due lati del mesentere. Allo stadio III₁₀ di Cambar e Gipouloux, corrispondente al momento in cui le branchie della larva divengono interne da entrambi i lati, tale migrazione è

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

(**) Nella seduta del 6 dicembre 1980.

completa. In questo stadio è possibile effettuare un conteggio del numero totale di cellule germinali primordiali presenti negli abbozzi genitali. Numerosi conteggi hanno dato in *Bufo bufo* un numero totale di poco meno di una ottantina, ripartite tra le due creste, un po' più numerose in quella sinistra. Solo più tardi, a partire dalla stadio IV_2 , si possono rilevare alcuni gonociti in mitosi. Tali mitosi coincidono con la comparsa delle cellule del tessuto midollare che, infatti, in tale stadio comincia a penetrare nelle creste genitali, iniziando dai livelli più cefalici, corrispondenti nei Bufonidi a quelli in cui si formeranno gli organi di Bidder (ovari abortivi presenti in entrambi i sessi)

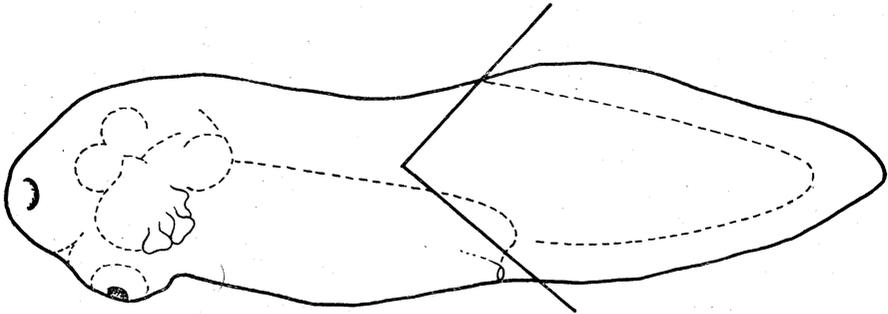


Fig. 1. - Vista laterale di un embrione di *Bufo bufo* allo stadio III_6 ; il taglio a V è praticato in modo da asportare gran parte della cresta mediana endodermica comprendente le cellule germinali primordiali, lasciando integra la cloaca.

(Vannini e Busetto, 1946; Gipouloux, 1976) [6], livelli in cui, già alla fine della loro migrazione, i gonociti sono disposti in maggior numero. Per effetto di tali mitosi il numero totale di gonociti aumenta rapidamente, fino a raddoppiare nel passaggio dallo stadio IV_2 allo stadio IV_4 . Negli stadi successivi IV_7 - IV_8 si possono contare oltre 200 gonociti per cresta genitale (Vannini e Gardenghi, 1964) [7], finché, allo stadio IV_9 , con l'inizio dell'ovogenesi abbreviata ai livelli bidderiani, un conteggio diviene molto difficile.

* * *

Nell'ambito di una serie di ricerche volte ad indagare sul diverso ruolo svolto dalle componenti somatica e germinale degli abbozzi genitali durante il differenziamento sessuale (Di Grande, 1967; 1968; 1971; 1977). [8] ho pensato che la precoce disposizione dei gonociti in regioni molto caudali dell'embrione avrebbe permesso l'asportazione di tali regioni, con conseguente sviluppo di animali con gonadi fortemente impoverite di gonociti, mentre la parte somatica, mesodermica, che si abbozza a livelli più cefalici, avrebbe dovuto rimanere indenne.

Una prima serie di esperimenti è stata condotta su embrioni di *Bufo bufo* provenienti dalla campagna bolognese.

Tre gruppi di 20 animali ciascuno, agli stadi di sviluppo III₆, III₇ e III₈, hanno subito, senza danno per la cloaca, un taglio a V a livello della coda (fig. 1 e 2) che consentisse di asportare la porzione endodermica caudale in cui dovevano presumibilmente essere collocati numerosi gonociti.

Una percentuale di animali compresa tra il 30 e il 50 per cento è sopravvissuta ed è stata fissata, dopo 12-14 giorni, mentre si trovava allo stadio di sviluppo IV₁₋₂, precedente perciò l'inizio della moltiplicazione mitotica dei gonociti. Un conteggio effettuato in questo momento può darci una valida indicazione sul numero di gonociti asportati con l'intervento, perchè localizzati nella regione più caudale dell'endoderma dorsale, subito prima della loro migrazione nelle due pieghe genitali.

Il conteggio ha dato risultati altamente positivi: tra gli esemplari operati allo stadio III₆, si sono ritrovate in media 8 cellule germinali per ciascuna cresta genitale, un esemplare era completamente sterile. Gli esemplari operati allo stadio III₇, hanno dato una media di 15 gonociti per cresta genitale, infine gli esemplari operati allo stadio III₈, quando cioè i gonociti cominciano a migrare nelle pieghe genitali ai due lati del mesentere, hanno dato una media di 25 gonociti per lato, contro i 35-40 degli esemplari di controllo.

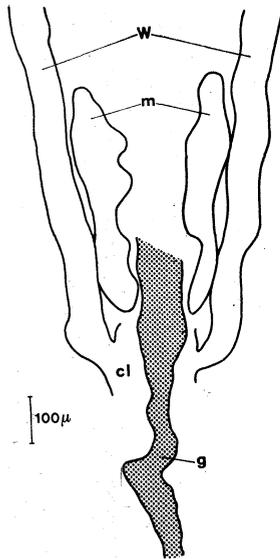


Fig. 2. - Proiezione frontale degli abbozzi urogenitali di embrione di *Bufo bufo* allo stadio III₆. Ai due lati i dotti di Wolff (W) che caudalmente sboccano nella cloaca (cl); m: mesonefri; g: la cresta mediana endodermica che comprende le cellule germinali primordiali, estesa caudalmente oltre lo sbocco in cloaca dei dotti di Wolff.

Una seconda serie di esperimenti è stata quindi effettuata su embrioni di *Bufo bufo* provenienti dalle campagne romane, aumentando il numero di esemplari operati, anticipando quanto più possibile il momento dell'intervento ed esaminando gli animali operati in stadi più progrediti, corrispondenti allo stadio IV₄ delle tavole di Cambar e Gipouloux od anche più avanzati e prossimi alla metamorfosi.

Descrivo in dettaglio i risultati di questa seconda serie di ricerche.

I più giovani animali sopravvissuti sono quelli operati allo stadio III₄, di poco successivo al bottone codale, con abbozzo iniziale di branchie esterne. In tale stadio i dotti di Wolff hanno completato il loro sviluppo e giungono a sboccare in cloaca. I gonociti sono ancora difficilmente distinguibili dalle altre cellule endodermiche.

Dei 70 esemplari operati, 10 sono stati allevati fino allo stadio IV_2 , che avevano raggiunto dopo una dozzina di giorni; altri 6 furono fissati allo stadio IV_4 . Successivamente si verificava un'elevata mortalità per cui fu possibile fissare un unico animale che aveva raggiunto lo stadio IV_6 . I conteggi effettuati sui primi 10 animali, fissati allo stadio IV_2 , hanno

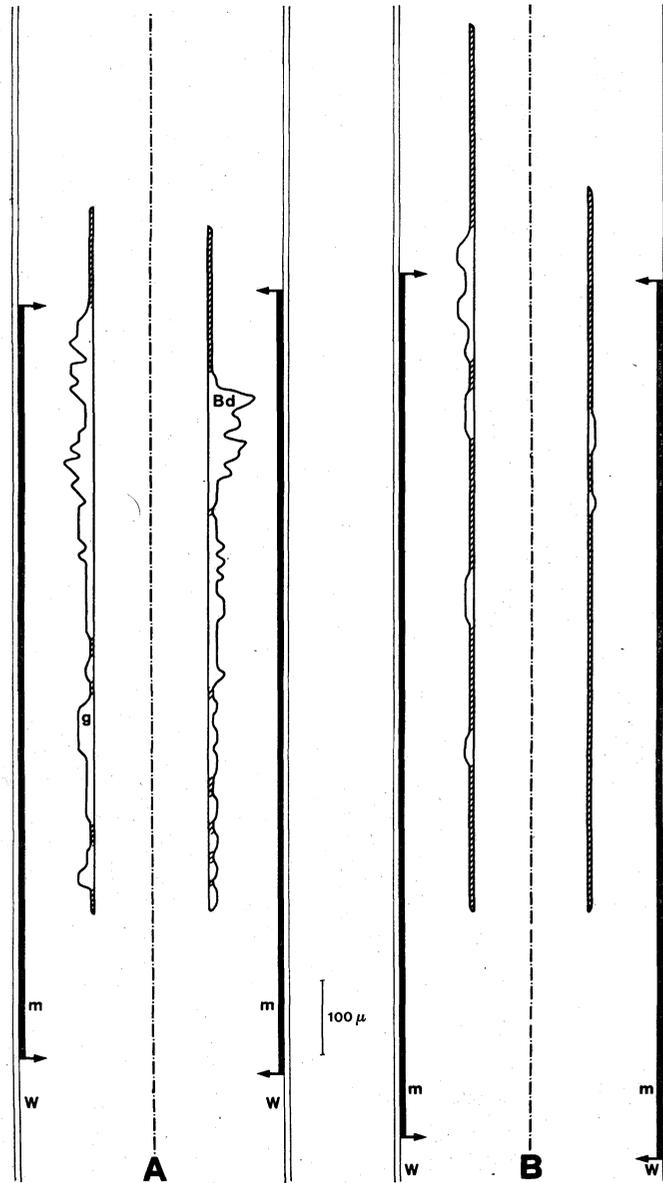


Fig. 3. - Ricostruzione diagrammatica dell'apparato urogenitale di *Bufo bufo*. Sia per questa che per la fig. 4, ai lati W: dotti di Wolff; m: mesoneftri; al centro le creste genitali, Bd: livelli bidderiani; g: livelli gonadici; a tratteggio obliquo i tratti somatici sterili delle creste genitali. La larghezza dei tratti bianchi delle creste genitali è proporzionale al numero delle cellule germinali ivi presenti. A: esemplare di controllo fissato allo stadio IV_2 . B: esemplare operato allo stadio III_4 , fissato allo stadio IV_2 .

dato risultati significativi in quanto mostravano una media di 25 gonociti per cresta genitale rispetto a quella di una quarantina circa per gonade degli animali di controllo (fig. 3, A), o accanto ad animali quasi sterili, con gonociti distribuiti lungo una cresta genitale di estensione quasi normale (fig. 3, B), si trovano animali in cui essa è invece estremamente raccorciata, pur avendo un numero relativamente elevato di gonociti, distribuiti secondo un normale gradiente numerico cefalo-caudale per cui il primordio dell'organo di Bidder è presente e ricco di gonociti, alcuni dei quali in mitosi (fig. 4, C e Tav. I fig. 6). La presenza di gonociti in mitosi indica che probabilmente lo stadio esterno IV_2 , pur rilevato con ogni cura anche su caratteri che non riguardavano lo sviluppo delle zampe, prossime alla zona dell'intervento,

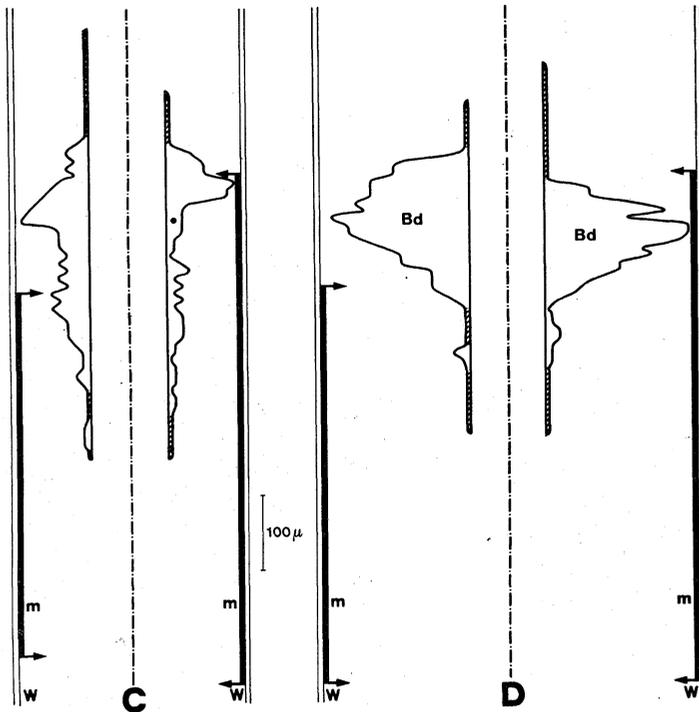


Fig. 4. - Ricostruzione diagrammatica dell'apparato urogenitale di: C: un esemplare operato allo stadio III_4 , fissato allo stadio IV_2 , il punto indica un gonocita in mitosi. D: un esemplare operato allo stadio III_8 , fissato allo stadio IV_4 .

è più arretrato rispetto allo stadio di sviluppo degli abbozzi genitali. In animali di controllo infatti, fissati in base alle caratteristiche esterne dello stadio IV_2 , su più di 700 gonociti contati nel complesso di numerosi esemplari ne è stato ritrovato uno solo in mitosi, mentre dei 500 gonociti contati nel complesso degli esemplari operati sei erano in mitosi. Il fatto che spesso già gli esemplari quasi sterili presentino creste genitali con normale gradiente cefalo-caudale, con cellule somatiche più numerose ai livelli cefalici, così che il profilo della gonade è più grosso ai livelli bidderiani e più sottile ai livelli gonadici (Tav. I, fig. 3 e 4) era stato da me rilevato anche negli esemplari resi sterili per mezzo di irradiazione con raggi X (Di Grande, 1968) [8].

Anche gli esemplari fissati allo stadio IV_4 presentano un numero ridotto di gonociti: dovrebbe essere raddoppiato rispetto allo stadio IV_2 , cioè essere di 140-150 circa, mentre in tre esemplari è ridotto ad un terzo, 50 a sinistra, 44 a destra, o menò (rispettivamente 24 e 23; 19 e 17). Anche in questo gruppo di animali due esemplari su cinque hanno cresta geni-

tale molto raccorciata, con riduzione anche dei mesoneftri (fig. 4, C); gonociti in mitosi si possono rilevare anche a livelli gonadici. Questo spiega forse la distribuzione un po' anomala dei gonociti in alcuni esemplari, nei quali non si può rilevare un loro netto gradiente numerico decrescente in senso cefalo caudale, per cui a livelli sicuramente gonadici si trovano fino a 6 o 7 gonociti per sezione trasversale, come nei livelli bidderiani.

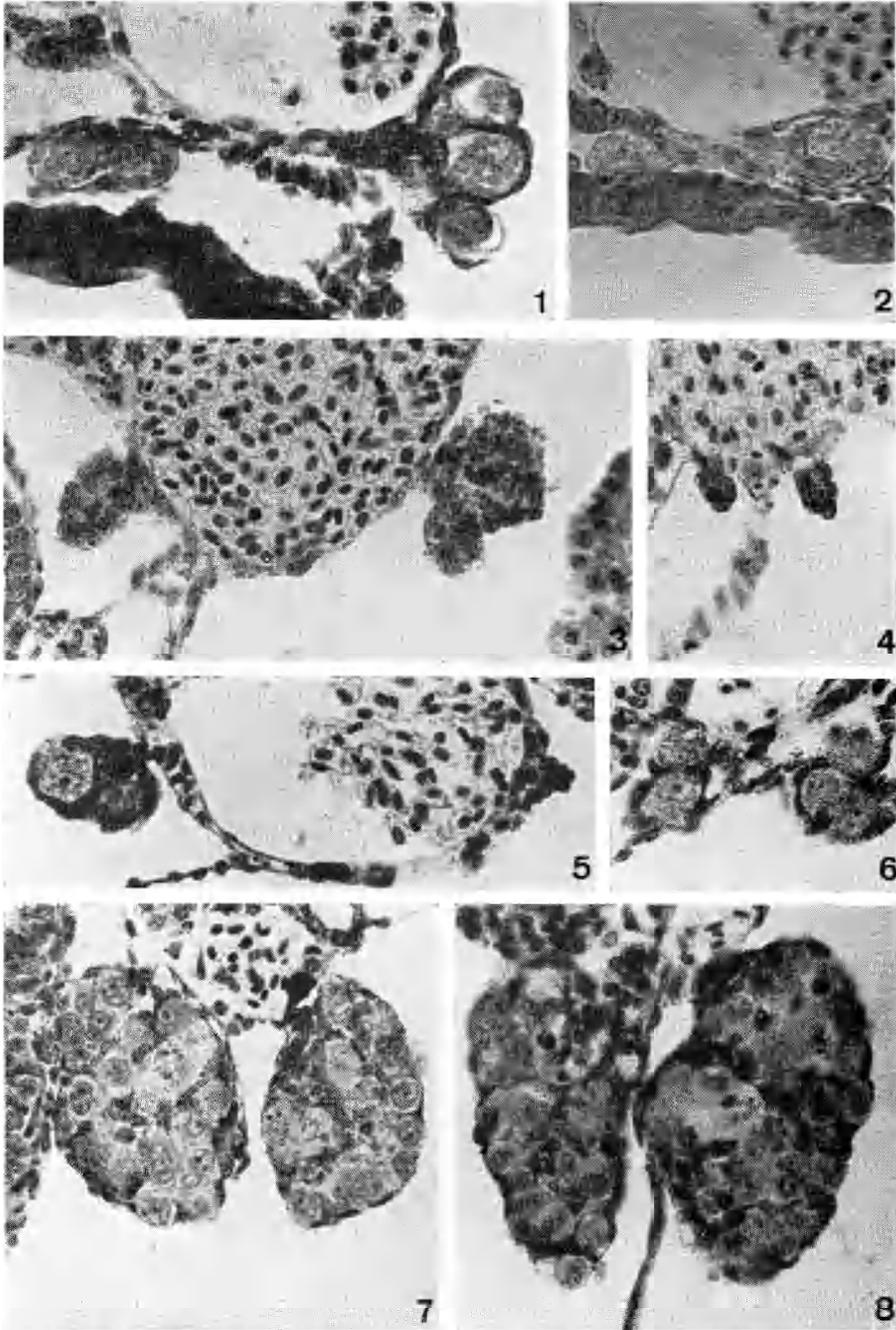
I gruppi operati mentre si trovavano agli stadi III₅, III₆ e III₇, delle tavole di Cambar e Gipouloux non hanno dato i risultati sperati, la media del numero di gonociti rimasti è di poco inferiore a quella dei controlli. Anche in questo caso alcuni esemplari hanno tuttavia creste genitali e mesoneftri molto raccorciati. La presenza di numerosi gonociti in mitosi può spiegare il loro numero più elevato di quanto ci aspettassimo. Tra gli esemplari operati allo stadio III₇, è presente un individuo completamente sterile (Tav. I, fig. 3, 4).

Risultati positivi hanno dato gli esemplari operati mentre si trovavano allo stadio III₈. La media dei gonociti presenti nei nove esemplari fissati allo stadio IV₂, è di 26 per cresta genitale, inoltre sei di essi presentavano gonadi e mesoneftri raccorciati fino a due terzi o un terzo rispetto alla norma. Degli esemplari fissati allo stadio IV₄, tre su sei presentavano tale anomalia. È da notare anche che negli organi di Bidder, a conferma di quanto avevo detto in precedenza, alcuni gonociti dei livelli bidderiani hanno cominciato quell'ovogenesi abbreviata che solitamente si trova in stadi di sviluppo successivi.

Posso pertanto concludere che negli embrioni di *Bufo bufo* l'ablazione della regione endodermica dorso-caudale agisce sul numero dei gonociti al termine della loro migrazione dall'endoderma alle pieghe genitali mesodermiche. Solo in rari casi tuttavia tale riduzione è assoluta e dà luogo ad individui completamente sterili. Negli altri casi i gonociti rimasti ripristinano rapidamente il loro numero con mitosi forse più frequenti che nei controlli. L'intervento, inoltre, non è senza effetto sulla parte somatica delle gonadi e dei mesoneftri in quanto in molti casi determina un loro forte raccorciamento. È interessante notare che il corpo genitale degli esemplari operati presenta il normale differenziamento in organo di Bidder cefalico e gonade caudale.

BIBLIOGRAFIA

- [1] L. BOUNOURE (1939) - *L'origine des cellules reproductrices et le problème de la lignée germinale*, Gauthier-Villars, Paris.
- A. MONROY (1939) - *Sulla localizzazione delle cellule genitali primordiali in fasi precoci di sviluppo. Ricerche sperimentali in Anfibi Anuri*, « Arch. Ital. Anat. Embr. », 41, 368-389.
- A. W. BLACKLER (1966) - *Embryonic sex cells of Amphibia*, « Adv. Reprod. Physiol. », 1, 9-28.
- J. D. GIPOULOUX (1971) - *Effets de l'extrusion totale ou partielle du cytoplasme germinal au cours des premiers stades de la segmentation sur la fertilité des larves d'Amphibiens Anoures*, « C. R. Acad. Sc. Paris », 273, 2627-2629.
- [2] L. BOUNOURE (1934) - *Recherches sur la lignée germinale chez la grenouille rousse aux premiers stades du développement*, « Ann. Sc. Nat. Zool. », 17, 67-248.
- A. W. BLACKLER (1958) - *Contribution to the study of germ cells in the Anura*, « J. Embryol. exp. Morph. », 6, 491-503.
- [3] R. CZOŁOWSKA (1972) - *The fine structure of the germinal plasm in Xenopus laevis*. « Wilhelm Roux' Archiv », 169, 335-344.
- [4] R. CAMBAR e J. D. GIPOULOUX (1956) - *Table chronologique du développement embryonnaire et larvaire du Crapaud commun (Bufo bufo L.)*, « Bull. Biol. Fr. Belg. », 90, 198-217.



- [5] J. D. GIPOULOUX (1970) - *Recherches expérimentales sur l'origine, la migration des cellules germinales et l'édification des crêtes génitales chez les Amphibiens Anoures*, « Bull. Biol. France Belg. », 104, 21-93.
P. GIORGI (1974) - *Germ cell migration in toad (Bufo bufo): effect of ventral grafting of embryonic dorsal regions*. « J. Embryol. exp. Morph. », 31, 75-87.
- [6] E. VANNINI e I. Busetto (1946) - *Origine interrenale del tessuto midollare della gonade e sviluppo dell'organo di Bidder nel Bufo bufo (L.) e nel Bufo viridis Laur.*, « Atti Ist. Ven. Sc. Lett. Arti », 104, 631-680.
J. D. GIPOULOUX (1976) - *La détermination des cellules germinales primordiales chez les Amphibiens Anoures*, « Bull. Soc. Zool. France », 101, Suppl. 4, 2-6.
- [7] E. VANNINI e G. GARDENGHI (1964) - *Esperimenti di asportazione quasi totale dell'abbozzo genitale presuntivo in embrioni di Bufo bufo*, « Boll. Zool. », 31, 41-53.
- [8] F. DI GRANDE (1967) - *Effetti della panirradiazione con raggi X sulle gonadi e gli organi di Bidder di embrioni e larve di Bufo bufo*, « R. C. Accad. Naz. Lincei », 43, 393-400.
F. DI GRANDE (1968) - *Sviluppo postmetamorfico delle gonadi e degli organi di Bidder in esemplari di Bufo bufo precocemente panirradiati con raggi X*, « R. C. Accad. Naz. Lincei », 45, 437-442.
F. DI GRANDE (1971) - *Modalità della sterilizzazione degli abbozzi genitali in girini di Bufo bufo panirradiati con raggi X in stadi embrionali*, « R. C. Accad. Naz. Lincei », 50, 593-599.
F. DI GRANDE (1977) - *Comportamento dei somatociti nel differenziamento di gonadi larvali di Rana dalmatina private di gonociti*, « Rend. Accad. Sc. Ist. Bologna », 4, 195-204.

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA I

- Fig. 1. - Sezione trasversale a livello dell'organo di Bidder dell'esemplare della fig. 1 A del testo. I gonociti sono ancora ricchi di globuli di tuorlo.
- Fig. 2. - Sezione trasversale a livello della gonade dello stesso esemplare della fig. 1.
- Fig. 3. - Sezione trasversale a livello dell'organo di Bidder in un esemplare operato allo stadio III₇ fissato allo stadio IV₂, sterile.
- Fig. 4. - Sezione trasversale a livello della gonade sterile dello stesso esemplare della fig. precedente.
- Fig. 5. - Sezione trasversale a livello della gonade dell'esemplare della fig. 3 B del testo, operato allo stadio III₄, fissato allo stadio IV₂.
- Fig. 6. - Sezione trasversale, a livello dell'organo di Bidder, dell'esemplare della fig. 4 C del testo, operato allo stadio III₄, fissato allo stadio IV₂. Un gonocita è in profase mitotica.
- Fig. 7. - Sezione trasversale a livello dell'organo di Bidder dell'esemplare della fig. 4 D del testo, operato allo stadio III₈, fissato allo stadio IV₄. Alcuni ovociti hanno iniziato il processo di ovogenesi abbreviata.
- Fig. 8. - Sezione trasversale di un altro esemplare operato allo stadio III₈, fissato allo stadio IV₄. Gli ovociti sono molto più numerosi che nei controlli, in cui, a questi livelli si trovano al massimo 6 o 7 gonociti per sezione.

Per tutte le figure l'ingrandimento è di 340×.