
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

FOSCARINA DI GRANDE

**Effetti della panirradiazione con raggi X sulle gonadi
e gli organi di Bidder di embrioni e larve di Bufo bufo**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 43 (1967), n.5, p. 393–400.*
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1967_8_43_5_393_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/>

Zoologia. — *Effetti della panirradiazione con raggi X sulle gonadi e gli organi di Bidder di embrioni e larve di Bufo bufo* (*). Nota di FOSCARINA DI GRANDE, presentata (**) dal Corrisp. P. PASQUINI.

SUMMARY. — By means of X-ray irradiation of *Bufo bufo* whole embryos, a complete or almost complete germ-cell destruction has been obtained. Nevertheless in the genital ridges many somatic cells have been preserved. The latter particularly abound in cephalic tract of genital ridges and in this place they keep their normal power to induce the scattered residual germ-cells to differentiate into Bidder-organ oocytes.

Ricerche eseguite in questo Istituto con la collaborazione del prof. Elvezio Ghirardelli (1), direttore dell'Istituto di Zoologia della Università di Trieste, che ringrazio vivamente, dimostrano che la panirradiazione di embrioni tardivi o di giovani larve di *Bufo bufo* (L.) con dosi appropriate di raggi X danneggia selettivamente le cellule germinali. Si possono così ottenere esemplari sterili o poverissimi di gonociti. Ciò permette di studiare il comportamento dei tessuti somatici degli abbozzi genitali in assenza delle cellule germinali o, quando queste esistano in numero ridotto, di esaminare il loro destino nei due tratti, cefalico e caudale, degli abbozzi genitali: di cui il primo corrisponde al territorio dell'organo di Bidder (ovario non funzionante, con precoce differenziamento di ovociti), il secondo a quello della gonade propriamente detta (ovario provvisto solo di ovogoni durante gli stadi larvali; ovario o testicolo, a seconda del sesso genetico dei singoli esemplari, dopo la fine della metamorfosi).

L'indagine, della quale qui espongo alcuni primi risultati, può pertanto inquadrarsi in un più vasto piano di ricerche che da alcuni anni vengono condotte, con altri metodi, negli Istituti di Zoologia delle Università di Bologna e di Trieste e che hanno, appunto, l'intento di chiarire i fattori causali della differenziazione regionale degli abbozzi genitali degli embrioni e girini di *Bufo* nei due suddetti territori cefalico e caudale (2).

(*) Indagini eseguite nell'Istituto di Zoologia dell'Università di Bologna, diretto dal Prof. Enrico Vannini, con una sovvenzione del C.N.R. (Gruppo di ricerca sulla determinazione e il differenziamento del sesso).

(**) Nella seduta del 14 novembre 1967.

(1) E. GHIRARDELLI e A. SANDRELLI, *Effetti di radiazioni localizzate con raggi X nella regione genitale di girini di Bufo bufo*. « Rend. Accad. Sci. Ist. Bologna » (in corso di stampa).

(2) E. VANNINI e E. GHIRARDELLI, *Sui fenomeni regolativi dell'abbozzo genitale in Bufo bufo, dopo asportazione del territorio presuntivo dell'organo di Bidder*. « Rend. Accad. Naz. Lincei », ser. VIII, vol. 30, pp. 107-111 (1961).

E. VANNINI, *Esperimenti sul differenziamento regionale della gonade in embrioni e larve di Bufo*. « Rend. Accad. Sci. Ist. Bologna », ser. XI, vol. 9, fasc. 1, pp. 30-36 (1962).

E. GHIRARDELLI, *Nuovi dati sui fattori della morfogenesi dell'organo di Bidder in Bufo bufo*. « Boll. Zool. », vol. 31, pp. 389-408 (1964).

Gli esperimenti di cui qui riferisco sono stati effettuati su embrioni già prossimi al passaggio alla fase di vita larvale, che si trovavano allo stadio III₈ delle tavole di Cambar e Gipouloux (3). In questo stadio le cellule germinali primordiali sono già migrate dall'entoderma nel mesoderma (4) e costituiscono un cordone impari mediano alla radice del mesenterio dorsale; solo nel tratto più cefalico sono già disposte ai due lati del mesenterio, negli abbozzi delle creste genitali.

L'irradiazione è stata effettuata con l'apparecchio a radiazioni molli « Zephyr Minor » della Picker X-Ray Corporation, il cui uso medico è specializzato per la terapia cutanea superficiale. Gli embrioni sono stati irradiati senza filtro, in un gruppo di venti entro una capsula di vetro con poca acqua, a 4 mA e 70 kV, alla distanza fuoco-pelle di 10 cm. In tali condizioni l'intensità di irradiazione era di 360 r per minuto primo; il trattamento è durato poco più di due minuti, fino a quando la dose totale di irradiazione ebbe raggiunto il valore di 798 r.

Gli esemplari irradiati hanno proseguito lo sviluppo; dopo raggiunta la fase larvale, vennero nutriti in un primo tempo con polvere d'ortica, successivamente con lattuga scottata e *Spirogyra*. Man mano che raggiungevano lo stadio desiderato venivano fissati in liquido in Bouin, inclusi in paraffina e sezionati in serie di fette trasversali dello spessore di 10 μ , che sono state colorate con emallume-eosina.

Dei 20 esemplari irradiati, soltanto 12 sono sopravvissuti fino all'epoca della fissazione, che è stata effettuata fra 28 e 56 giorni dopo l'epoca della panirradiazione; due di essi sono giunti abbastanza rapidamente a stadi prossimi alla fine della metamorfosi (che nelle tavole di Cambar e Gipouloux corrisponde allo stadio IV₁₇), altri invece hanno impiegato un tempo assai più lungo per raggiungere stadi di sviluppo meno progrediti. Come appare dall'acclusa Tabella, l'esame istologico ha messo in evidenza che tutti gli esemplari erano provvisti di abbozzi genitali ben evidenti; questi però in 6 esemplari erano completamente privi di cellule germinali e negli altri 6 ne presentavano un numero estremamente ridotto. L'animale che ne possedeva di più aveva infatti soltanto 4 gonociti nell'abbozzo genitale di un lato e 2 nell'altro.

Per l'analisi dei risultati conseguiti, con l'aiuto di un microscopio dotato di visore (Visopan della Ditta Reichert) degli abbozzi genitali di ciascun esemplare è stata effettuata la ricostruzione in proiezione frontale e per quelli degli esemplari con cellule germinali si è pure precisato il numero, il volume e la sede dei gonociti in essi riscontrati, indicando se questi si trovavano nel territorio dell'organo di Bidder o della gonade propriamente detta. In questa Nota mi limito a riportare la documentazione più saliente.

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

(4) A. W. BLACKLER, *Embryonic sex cells of Amphibia*. « Adv. Reprod. Physiol. », vol. 1, pp. 9-28 (1966).

*Tabella sui risultati dell'esame istologico degli abbozzi genitali
in 12 girini irradiati allo stadio embrionale III₈.*

Giorni trascorsi	Stadio raggiunto	Numero delle cellule germinali			
		a sinistra		a destra	
		Bidder	gonade	Bidder	gonade
28	IV ₂	—	—	—	—
34	IV ₂	—	—	—	—
38	IV ₁₆₋₁₇	4	—	1	1
42	IV ₆₋₇	—	—	—	—
45	IV ₁₆	1	—	1	1
46	IV ₃	—	—	1	—
50	IV ₇	—	—	—	—
50	IV ₈	—	—	—	—
50	IV ₁₁	—	—	—	1
53	IV ₁₂	—	—	—	—
56	IV ₁₀	—	—	3	1
56	IV ₁₃	1	—	2	—

Nei riguardi degli esemplari che la panirradiazione con raggi X ha reso completamente privi di cellule germinali, le immagini delle ricostruzioni grafiche (fig. 1, *A, B, C*) dimostrano che i costituenti somatici degli abbozzi genitali sono ben rappresentati a tutti i livelli cefalocaudali, e pertanto sia nel tratto cefalico, in cui normalmente si sarebbero dovuti sviluppare gli organi di Bidder, sia in quello caudale, in cui invece si sarebbero dovute sviluppare le gonadi propriamente dette. Specialmente negli esemplari più adulti, con abbozzi genitali più lunghi, si nota anzi che il volume dell'abbozzo, e quindi il numero delle cellule somatiche che lo costituiscono, decresce gradatamente procedendo dai livelli bidderiani a quelli gonadici. Il profilo complessivo dell'abbozzo genitale sterile perciò somiglia, a parte le minori dimensioni, al profilo di un abbozzo genitale normale: benché ovviamente nei girini non irradiati il maggior volume del tratto bidderiano rispetto a quello delle gonadi propriamente dette dipenda essenzialmente dal maggior numero di cellule germinali che sono contenute ai livelli cefalici.

La maggiore abbondanza di cellule somatiche a livello del territorio presuntivo dell'organo di Bidder, rispetto a quello della gonade propriamente detta, è anche documentata dalle rispettive microfotografie (Tav. I, fig. 1 per il livello bidderiano, fig. 2 per il livello gonadico). Dobbiamo ritenere che la maggior parte di dette cellule somatiche corrispondano a quelle del «tessuto midollare», potenzialmente maschile, dell'abbozzo della gonade; la impossibilità di distinguere cellule somatiche follicolari, che di norma dovrebbero

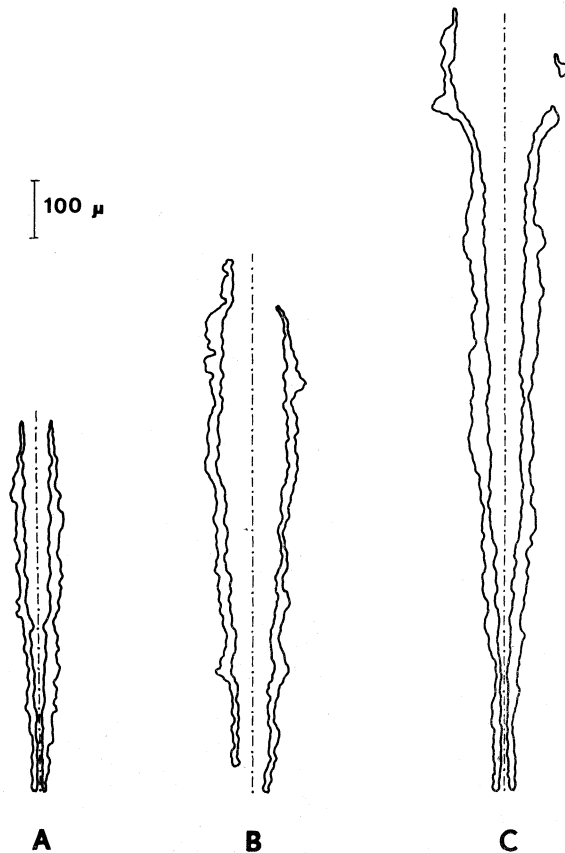


Fig. 1. - Profili degli abbozzi genitali sterili in tre esemplari, uccisi 34 giorni (A), 42 giorni (B) e 53 giorni (C) dopo l'irradiazione.

circondare gli ovogoni, riduce la *cortex*, potenzialmente femminile, a un esile strato di cellule peritoneali, che rivestono l'abbozzo genitale reso sterile dall'azione dei raggi X.

Occorre aggiungere che, come di norma, il tratto potenzialmente bidderiano degli abbozzi genitali è preceduto da un tratto più sottile (talvolta provvisto di restringimenti o addirittura interruzioni, come nella fig. 1, C dal lato destro), che rappresenta l'abbozzo dei futuri «corpi grassi». Anche negli esemplari non irradiati, un tale territorio è del tutto privo di cellule germinali

e le sue cellule somatiche, identiche per origine e struttura a quelle del « tessuto midollare » delle altre parti dell'abbozzo genitale, normalmente verso la fine della metamorfosi sono destinate a trasformarsi in cellule adipose. L'irradiazione non ha sensibilmente alterato né struttura, né capacità di sviluppo di tale territorio.

Per quanto si riferisce agli esemplari che, nonostante l'azione dei raggi X, hanno conservato un numero sia pure esiguo di cellule germinali, dobbiamo anzitutto rilevare che i gonociti residui sono talvolta contenuti nel territorio bidderiano degli abbozzi genitali, altre volte in quello gonadico. Come appare dalla annessa Tabella, i primi sono significativamente più numerosi che i secondi; verosimilmente ciò dipende dal fatto che anche di norma negli abbozzi genitali dei girini di *Bufo*, sino dall'inizio dello sviluppo, i gonociti sono più abbondanti nel tratto destinato a divenire l'organo di Bidder, rispetto a quello destinato a differenziarsi in gonade propriamente detta, e pertanto è più probabile che alcuni di essi resistano ai danni dell'irradiazione.

Come risulta dalle ricostruzioni grafiche (fig. 2, *D, E*; fig. 3, *F, G, H*) e dalle microfotografie di alcuni dei livelli di abbozzi genitali occupati da cellule germinali (Tav. I, fig. 3, 4, 5), quando queste ultime sono contenute in quel tratto di abbozzo genitale che corrisponde al territorio gonadico, presentano sempre quel medesimo aspetto di protogonio od ovogonio che avrebbero mostrato nelle gonadi di girini non irradiati di età corrispondente. Ma quando invece le cellule germinali residue sono situate nel territorio bidderiano, esse conservano il suddetto aspetto di protogonio od ovogonio solo nel caso che l'animale sia stato fissato in uno stadio di sviluppo non molto progredito; non appena l'esemplare, indipendentemente dalla sua età in giorni, abbia raggiunto uno stadio di sviluppo più tardivo (e cioè circa a partire dallo stadio IV₁₀), gran parte di tali elementi germinali si trasformano rapidamente in ovociti assai voluminosi, identici a quelli degli organi di Bidder di animali non irradiati di età corrispondente. Il fenomeno si verifica anche se la cellula germinale situata nel territorio dell'organo di Bidder è in numero di una soltanto.

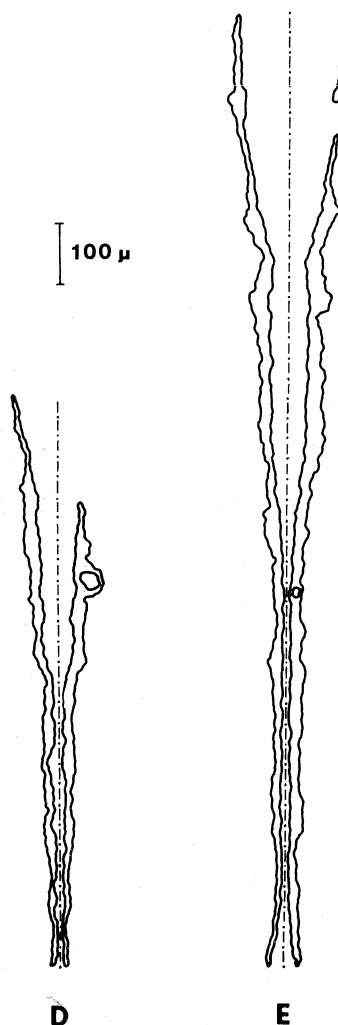


Fig. 2. — Profili degli abbozzi genitali quasi sterili in due esemplari, uccisi 46 giorni (*D*) e 50 giorni (*E*) dopo l'irradiazione. Nell'abbozzo genitale di destra, nel tratto bidderiano per l'esemplare *D* e in quello gonadico per l'esemplare *E*, esistono rispettivamente un protogonio e un ovogonio, indicati con un cerchietto che ne esprime le dimensioni.

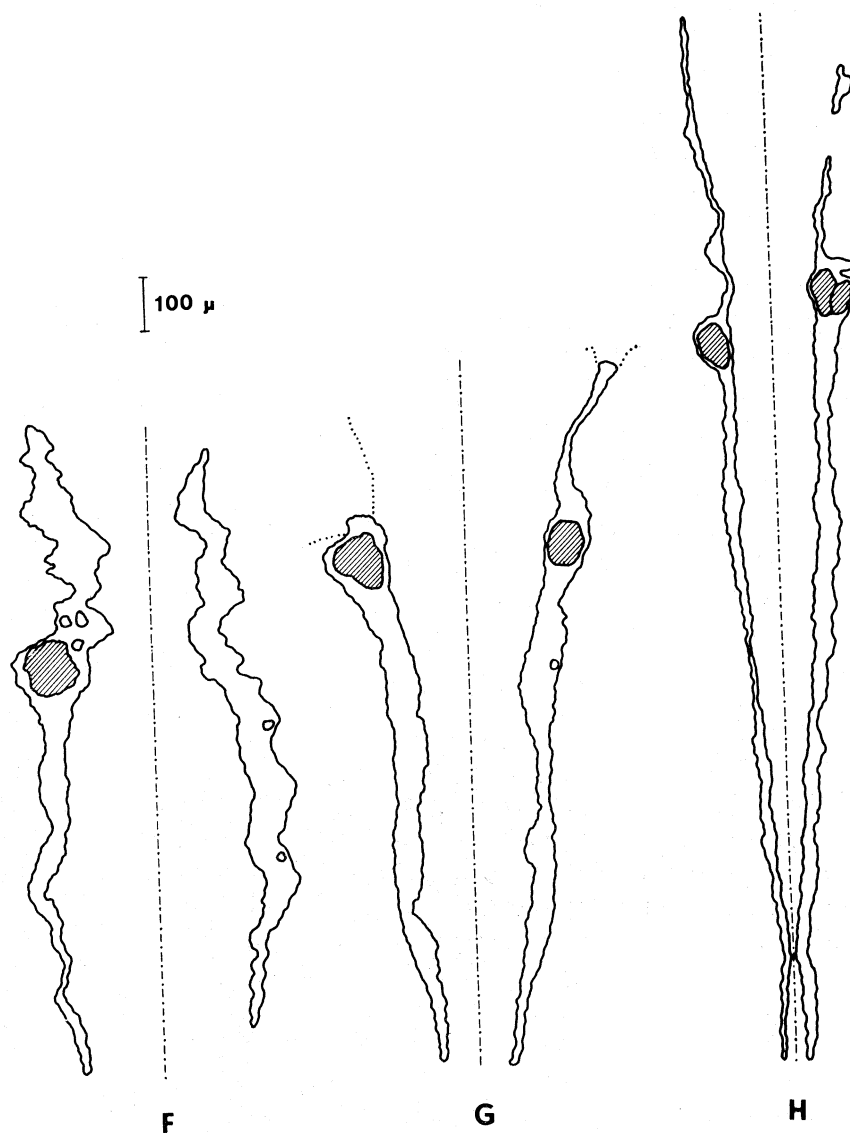


Fig. 3. - Profili degli abbozzi genitali quasi sterili in tre esemplari, uccisi 38 giorni (*F*), 45 giorni (*G*) e 56 giorni (*H*) dopo l'irradiazione.

I cerchietti vuoti indicano i protogoni e gli ovogoni, quelli tratteggiati indicano gli ovociti in accrescimento; questi ultimi si trovano solo in sede bidderiana. Nell'esemplare *G*, cefalicamente agli organi di Bidder si sono differenziati voluminosi corpi grassi, indicati con linee punteggiate.

È quasi superfluo rilevare che anche nel caso di abbozzi genitali che hanno conservato un esiguo numero di cellule germinali, i tratti sterili dell'abbozzo sono provvisti di cellule somatiche, in quantità maggiore ai livelli dell'organo di Bidder presuntivo rispetto a quelli della gonade propriamente detta (Tav. I, fig. 6 per il territorio bidderiano, fig. 7 per quello gonadico).

* * *

In conclusione, ritengo che alcuni dati principali emergano dalle osservazioni riferite. Anzitutto, risulta dimostrato che nei girini di *Bufo*, dopo distruzione completa o quasi completa degli elementi germinali, *i costituenti somatici degli abbozzi genitali sono più abbondanti nel tratto cefalico*, potenzialmente destinato a trasformarsi nell'organo di Bidder, *rispetto al tratto caudale*, che è invece destinato a divenire la gonade propriamente detta. Ciò costituisce una conferma del fatto, inizialmente negato dal Witschi ⁽⁵⁾, ma in seguito ammesso concordemente dalla generalità degli studiosi ⁽⁶⁾, che anche l'organo di Bidder è provvisto, prima della metamorfosi dei girini, di un « tessuto midollare » simile a quello della gonade propriamente detta, ma poi destinato a scomparire. In secondo luogo, viene messo in evidenza che *le cellule germinali risparmiatae dai danni dell'irradiazione, se anche sono contenute in numero di una sola fra le cellule somatiche del tratto bidderiano, vengono indotte da queste a trasformarsi in ovociti*, in un'epoca corrispondente allo stadio di sviluppo durante il quale nei girini normali l'organo di Bidder inizia il proprio processo di ovogenesi precoce. Pure ciò costituisce una conferma di quanto, con altri metodi sperimentali, è stato dimostrato dagli autori citati all'inizio della presente Nota (Vannini, Ghirardelli) ⁽²⁾: che cioè, *le cellule somatiche del territorio bidderiano posseggono una forte attività femminizzante* che induce le cellule germinali a trasformarsi precocemente e rapidamente in ovociti, e che *questo potere induttore è assai stabilizzato*. Il Ghirardelli, nei suoi esperimenti citati, aveva rilevato che detto potere femminizzante permane anche se il territorio bidderiano venga trasportato dalla sua sede normale in una più caudale; le osservazioni attuali mettono in evidenza che esso persiste dopo panirradiazione con raggi X. *La completa scomparsa del « tessuto midollare » nell'organo di Bidder ormai differenziato sembra dipendere dal fatto che i grossi ovociti, che qui si sviluppano assai rapidamente, lo utilizzano interamente per formare i propri follicoli di cellule somatiche avvolgenti.*

(5) E. WITSCHI, *Studies on sex differentiation and sex determination in Amphibians*. VI. *The nature of Bidder's organ in the toad*. « Amer. Journ. Anat. », vol. 52, pp. 461-515 (1933).

(6) E. VANNINI e I. Busetto, *Origine interrenale del tessuto midollare della gonade e sviluppo dell'organo di Bidder nel Bufo bufo (L.) e nel Bufo viridis*. « Atti Ist. Veneto Sci. Lett. Arti », vol. 104, pp. 631-680 (1946).

PONSE K., *La différenciation du sexe et l'intersexualité chez les Vertébrés*. Rouge, Lausanne (1949).

VANNINI E., *Impostazione di nuove ricerche sullo sviluppo degli organi di Bidder e delle gonadi in girini di Bufo bufo*. « Boll. Zool. », vol. 23, pp. 525-532 (1956).

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA I.

- Fig. 1. - Sezione trasversale degli abbozzi sterili degli organi di Bidder, in un esemplare ucciso 53 giorni dopo l'irradiazione.
- Fig. 2. - Sezione trasversale degli abbozzi sterili delle gonadi propriamente dette, nel medesimo esemplare della figura precedente.
- Fig. 3. - Sezione trasversale a livello gonadico dell'abbozzo genitale quasi sterile, in un esemplare ucciso 38 giorni dopo l'irradiazione: a sinistra in basso, fra le cellule somatiche, si vede un ovogonio.
- Fig. 4. - Sezione trasversale a livello bidderiano dell'abbozzo genitale quasi sterile, nel medesimo esemplare della figura precedente. È evidente un voluminoso ovocita, circondato da un follicolo di cellule somatiche avvolgenti.
- Fig. 5. - Immagine simile a quella precedente, in un esemplare ucciso 45 giorni dopo l'irradiazione.
- Fig. 6. - Sezione trasversale a un livello privo di gonociti, nel tratto bidderiano dell'abbozzo genitale quasi sterile del medesimo esemplare della figura precedente.
- Fig. 7. - Sezione trasversale a un livello privo di gonociti nel tratto gonadico dell'abbozzo genitale quasi sterile del medesimo esemplare della figura precedente.

N.B.: L'ingrandimento è $520 \times$ in tutte le fotografie.

