
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

GIUSEPPE GARDENGHI, FRANCESCO ZACCANTI

**Alcuni risultati di culture organotipiche di gonadi
larvali di *Bufo bufo***

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 44 (1968), n.4, p. 589–592.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1968_8_44_4_589_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. — *Alcuni risultati di culture organotipiche di gonadi larvali di Bufo bufo* (*). Nota di GIUSEPPE GARDENGI e FRANCESCO ZACCANTI, presentata (**) dal Corrisp. P. PASQUINI.

SUMMARY. — Genital ridges of *Bufo bufo* tadpoles at different stages of development were cultured *in vitro* for 15–20 days. The results were: 1) the *in vitro* preservation of germ cells is good for protogonia and oogonia, less good for diplotenic oocytes and even less for synaptic oocytes; 2) larval oogenesis in Bidder's organ does not start *in vitro*, but it prosecutes if already begun at the explantation moment, as shown by meiotic changes of cultured oogonia; 3) gonadic tracts of cultured genital ridges are able to begin sex differentiation *in vitro*.

Nei Bufonidi, durante la vita larvale, la porzione anteriore delle due creste genitali subisce in tutti gli esemplari, indipendentemente dal loro sesso genetico e dal conseguente più tardivo differenziamento maschile o femminile della gonade retrostante, un particolare sviluppo in senso ovarico, dando origine ad una formazione caratteristica: l'organo di Bidder. In tale ovario abortivo, già durante il periodo di vita larvale, avvengono due successive ondate ovogenetiche. La prima (ovogenesi abbreviata) è caratterizzata dalla comparsa precoce di ovociti derivati direttamente da protogoni o da ovogoni che hanno subito un numero limitato di moltiplicazioni mitotiche; questi ovociti raggiungono rapidamente il secondo periodo di accrescimento (fase diplotene) senza avere prima attraversato stadi sinaptici (dal leptotene al pachitene) chiaramente riconoscibili con l'esame morfologico. La seconda (ovogenesi normale) è caratterizzata invece da ovociti che percorrono come di norma gli stadi sinaptici suddetti e solo dopo la metamorfosi sono destinati a raggiungere la fase di diplotene ed un forte accrescimento (1).

Tale sviluppo aberrante della porzione cefalica della cresta genitale dei Bufonidi rimane tuttora problematico, benché sia stato oggetto di numerose ricerche. Pertanto ci è sembrato interessante tentare lo studio di questo materiale con le tecniche di cultura *in vitro*.

(*) 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 20 aprile 1968.

(1) N. BECCARI, *Ovogenesi larvale, organo di Bidder e differenziamento dei sessi nel Bufo viridis*, « Arch. It. Anat. Embriol. », 22, 483–549 (1925); I. IZADI, *Développement de l'organe de Bidder du Crapaud*, « Rev. Suisse de Zool. », 50, 395–447 (1943); 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 (LAUR.)*, « Atti R. Ist. Ven. Sci. Lett. Arti », 104, 631–680 (1945); E. PADOA e L. PICCHI, *Nuove osservazioni sullo sviluppo dell'organo di Bidder nei Rospi normali e in quelli trattati con ormone follicolare*, « Mon. Zool. It. », 55, 57–59 (1946); F. RANZOLI, *L'ovogenesi bidderiana nelle larve di Bufo bufo (L.)*, « Boll. Zool. », 23, 549–555 (1956).

Culture organotipiche di gonadi larvali e adulte di Anfibi sono state eseguite da Foote e Foote su *Rana*, *Xenopus*, *Pleurodeles* e *Triturus*, da Basu, Nandi e Nandi su *Rana*, e da Salvatorelli e Gardenghi su *Bufo bufo* ⁽²⁾.

Sulla base di questi ultimi risultati, abbiamo intrapreso una serie di esperimenti di culture *in vitro* di gonadi larvali di *Bufo bufo*, delle quali diamo in questa Nota alcune notizie preliminari.

In primo luogo, nell'intento di approntare una tecnica di cultura adatta al nostro materiale, abbiamo saggiato, oltre al classico terreno culturale di Wolff e Haffen a base di estratto embrionale di pollo gelificato, un terreno liquido contenente estratto di girino di *Bufo bufo* allo stadio III₅ delle tavole di sviluppo normale di Cambar e Gipouloux ⁽³⁾, un terreno liquido con estratto embrionale di pollo e il terreno sintetico di Hanks mantenuto liquido o gelificato. Abbiamo inoltre cercato di ridurre la carica microbica degli animali da esperimento allevandoli con particolari precauzioni riguardanti la sterilità dei contenitori, dell'acqua e dell'alimento.

Gli espianti venivano ottenuti isolando la regione del tronco corrispondente alle gonadi e comprendevano, oltre alle creste genitali, i mesoreni e le sovrastanti strutture (corda, muscolatura, sistema nervoso, ecc.).

Allo scopo di indagare se anche *in vitro* avesse luogo la precoce entrata in ovogenesi degli elementi germinali situati a livelli bidderiani, abbiamo eseguito espianti della cresta genitale allo stadio di sviluppo IV₇ che *in vivo* precede di pochi giorni la comparsa della prima ondata ovogenetica bidderiana (stadio IV₉). Gli espianti, mantenuti in cultura per oltre 15 giorni, presentavano una discreta conservazione dei protogoni; ma, in generale, non abbiamo potuto osservare l'entrata in ovogenesi di quelli situati a livelli bidderiani: su 25 espianti, solo in un caso abbiamo riscontrato qualche ovocita in secondo periodo di accrescimento.

Abbiamo eseguito una successiva serie di espianti della gonade prelevandola da girini allo stadio IV₁₂, quando nel tratto bidderiano della cresta genitale sono già presenti gli ovociti della prima ondata ovogenetica e non è ancora cominciata la seconda. Questi espianti, coltivati per circa 15 giorni, dimostrano ai livelli gonadici una discreta conservazione dei goni, con accenno

(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 culture*, « 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); S. L. BASU, J. NANDI e S. NANDI, *Effects of hormones on adult Frog (Rana pipiens) testes in organ culture*, « J. Exp. Zool. » 162, 245-255 (1966); G. SALVATORELLI e G. GARDENGHI, *Primi risultati di culture organotipiche di gonadi indifferenziate e differenziate di Bufo bufo*, « Rend. Accad. Naz. Lincei », Serie VIII, 41, 130-133 (1966).

(3) 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).

all'inizio del differenziamento sessuale; a livelli bidderiani abbiamo riscontrato quadri sinaptici, indici dell'inizio della seconda ondata ovogenetica (Tav. I, figg. 1, 2).

Nella terza serie di esperimenti abbiamo prelevato il corpo genitale da girini allo stadio IV₁₅ nel quale è già in atto anche la seconda ondata ovogenetica bidderiana sotto forma di numerosi ovociti in diversi momenti della profase meiotica e nel quale a livelli gonadici non è ancora iniziato il differenziamento sessuale. Dopo 15 giorni di cultura abbiamo potuto osservare a livelli bidderiani gli ovociti delle due ondate ovogenetiche (Tav. I, fig. 3) e a livelli gonadici nei maschi genetici l'inizio del differenziamento sessuale (Tav. II, fig. 4).

Ci è stato possibile inoltre osservare il comportamento in cultura dei diversi tipi di elementi germinali. Nella totalità degli espianti sofferenti, le cellule sessuali che meglio si conservano sono i goni, meno resistenti sono gli ovociti in secondo periodo di accrescimento e meno ancora gli ovociti sinaptici (Tav. II, figg. 5, 6). Di conseguenza ci sembra lecito ritenere che quei quadri sinaptici riscontrati dopo 10, 15 e anche 20 giorni di cultura in mezzo ad altri ovociti già distrutti, abbiano avuto origine da ovogoni che, conservatisi in cultura, abbiano iniziato i processi meiotici *in vitro*.

I risultati ottenuti dai presenti esperimenti, che per altro ci hanno fornito indicazioni utili per ulteriori miglioramenti delle tecniche culturali, possono essere riassunti come segue. Quando la cresta genitale è posta in cultura prima che nella porzione cefalica, destinata a dare l'organo di Bidder, abbia avuto inizio la prima ondata ovogenetica, tale ovogenesi non ha generalmente luogo *in vitro*. Ponendo in cultura i corpi genitali ad uno stadio successivo all'inizio della prima ondata ovogenetica e precedente la seconda ondata, questa si effettua a carico di ovogoni che *in vitro* entrano in meiosi e raggiungono la fase di ovociti in secondo periodo di accrescimento. Infine espianti della gonade effettuati a stadi precedenti l'inizio del differenziamento sessuale, presentano dopo 10-12 giorni di cultura accenni di tale incipiente differenziamento.

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-II

TAVOLA I.

- Fig. 1. — Particolare di sezione di organo di Bidder espiantato allo stadio IV₁₂ dopo 10 giorni di cultura. Si notano ovociti in II periodo di accrescimento, alcuni quadri sinaptici (*s*) e alcuni ovogoni (*o*).
- Fig. 2. — Come sopra, dopo 15 giorni di cultura. Nell'espianto, che mostra chiari segni di sofferenza, si nota un ovocita sinaptico (*s*) ben conservato.
- Fig. 3. — Sezione di organo di Bidder, espiantato allo stadio IV₁₅, dopo 10 giorni di cultura. Si possono notare ovociti della I e della II ondata ovogenetica e ovogoni (*o*).

TAVOLA II.

- Fig. 4. - Sezione a livello gonadico di corpo genitale espiantato allo stadio IV_{15} e coltivato per 10 giorni. L'aspetto della gonade è di tipo testicolare.
- Fig. 5. - Sezione a livello bidderiano di corpo genitale prelevato allo stadio IV_{15} e coltivato per 15 giorni. L'espianto è sofferente; tuttavia fra gli ovociti degenerati sono visibili alcuni ovogoni (*o*) ed una cellula in sinapsi (*s*).
- Fig. 6. - Come sopra. Gli ovociti sono in gran parte distrutti mentre gli ovogoni, meglio conservati, possono entrare in mitosi (*m*).



