

47. Maria DURANTE. — **Combinazioni xenoplastiche di foglietti embrionali di Anfibi.** (\*)

**Riassunto.** — Nel presente lavoro sono stati effettuati quattro tipi di combinazioni xenoplastiche di foglietti branchiali di Anfibi (Anuri x Urodeli).

E' stato rilevato che:

1) negli Anuri, per quanto riguarda la branchia esterna, ha importanza branchio-formativa l'ectoderma, per quanto riguarda la branchia interna l'entoderma; negli Urodeli è stato confermato che ha importanza branchio-formativa l'entoderma;

2) negli Anuri i due tipi di branchie « esterne » ed « interne » hanno una successione puramente cronologica e non causale, rappresentando probabilmente due condizioni di adattamento a diverse situazioni della vita embrionale e larvale.

**Résumé.** — Ce travail comprend quatre types de combinaisons xénoplastiques de feuillettes de branchies d'amphibiens (Anoures x Urodèles).

On a remarqué que:

1) chez les Anoures, pour ce qui concerne la branchie externe, l'ectoderme a une importance branchio-formative et que au contraire, pour ce qui concerne la branchie interne c'est l'entoderme qui a une plus grande importance; chez les Urodèles le fait que c'est l'entoderme qui a une importance branchio-formative a été confirmé;

2) chez les Anoures, les deux types de branchies « externes » et « internes » ont une succession purement chronologique et non causale. Elles représentent probablement deux conditions d'adaptation à de différentes situations de la vie embryonnaire et larvale.

**Summary.** — Four types of xenoplastic combinations between the gill layers of Anourans and Urodeles have been made. The following conclusions have been reached:

1) In the Anourans, the formation of the external gills is determined by the ectoderm; that of the internal gills, by the entoderm. In

---

(\*) Ringrazio il Prof. G. REVERBERI, per aver consigliato e guidato il presente lavoro e per la concessione di una borsa di studio

the Urodeles, the role of the entoderm in the formation of the gills has been confirmed.

2) In the Anourans, the two types of gills, external and internal, follow each other with no causal connection. Such types are likely to be two adaptations to the different conditions of the embryonic and the larval life.

**Zusammenfassung.** — In dieser Arbeit sind Versuche mit vier Typen von xenoplastischen Branchialblättchen der verschiedenen Kombinationen von Amphibien (Anuren und Urodelen) ausgeführt worden. Es wurde dabei festgestellt:

1) Bei den Anuren hat zur Bildung der äusseren Kiemen das Ectoderm eine kiemenbildende Tätigkeit, für die inneren Kiemen das Entoderm. Bei den Urodelen hat eine kiemenbildende Eigenschaft nur das Entoderm.

2) Bei den Anuren haben der äussere und der innere Kiemen nur eine chronologische und keine kausale Folge, da sie wohl nur eine Adaptationserscheinung zu verschiedenen embryonalen und larvalen Lebenszuständen darstellen.

---

Negli Anfibi, i due Ordini, quello degli Urodeli e quello degli Anuri, presentano notevoli differenze per ciò che concerne l'apparato branchiale. Come è noto, questo apparato, nei due Ordini detti, è tipico della vita larvale, ed è sostituito, alla metamorfosi, dall'apparato polmonare: però, mentre negli Urodeli vi è un unico, costante apparato branchiale, negli Anuri se ne succedono due: l'uno, di breve vita, di poca apparenza ed « esterno », l'altro più duraturo, bene sviluppato, e « interno ».

Negli Anuri a ragione si è parlato di due generazioni branchiali. La seconda generazione di branchie, suole ritenersi più complicata, più « evoluta » della prima: e la si considera un'acquisizione; gli Urodeli, mancandone, sarebbero forme più primitive degli Anuri. La prima generazione branchiale compare assai precocemente, e prende sviluppo, a modo di escrescenze ectodermiche, dalla porzione dorsale del 2°, 3° e 4° corpo branchiale: queste escrescenze si accrescono, si ramificano e formano dei filamenti più o meno numerosi, più o meno allungati secondo le specie; in essi circola attivamente il sangue: essi vengono ricoperti da una formazione che prende origine dal 1° corpo branchiale, e che si chiama « opercolo ». Man mano che l'opercolo si sviluppa, la

prima generazione branchiale entra in involuzione e scompare: nel contempo fa la sua apparizione, dalla porzione laterale e ventrale degli stessi corpi branchiali e dal 5°, la seconda generazione. Questa rimane inclusa nello spazio peribranchiale che si è venuto, intanto, costituendo per la concorrenza dell'opercolo di destra con quello di sinistra: è perciò denominata « interna ».

Negli Urodeli si sviluppano, parimenti, in epoche molto precoci, egualmente dalla porzione dorsale del 2°-3° e 4° corpo branchiale, dei filamenti; ma questi non vengono mai ricoperti dalla piega opercolare, nè entrano mai in involuzione: al contrario, gemmano, si complicano e formano pinnule numerose e rilevanti; questa sorta di branchia rimane durevolmente « esterna » fino a metamorfosi: una condizione topografica omologa alla branchia interna degli Anuri, qui manca.

E' opportuno aggiungere che la situazione della doppia generazione di branchie negli Anuri non è così elementare: per esempio, in *Bombinator*, secondo EKMAN, 1913 <sup>(1)</sup> la prima generazione, quella delle branchie « caduche », mancherebbe; e in *Hyla* la distinzione tra branchie « esterne » e branchie « interne » sarebbe incospicua.

Qual'è il significato delle branchie « interne » degli Anuri? Rappresentano un'« invenzione » utilitaria dell'Ordine? Sono, o no, « omologhe » alle branchie « esterne »? A sua volta, qual'è il significato delle effimere branchie « esterne »?

Questi problemi, sono stati posti più di una volta, ma il metodo morfologico non ha potuto dare ad essi risposta soddisfacente.

Un metodo sperimentale utile potrebbe essere quello dei trapianti xenoplastici: ed è questa la via seguita nel presente lavoro.

Il metodo dei trapianti eteroplastici ha dato risultati molto buoni per la soluzione di altri problemi: HARRISON e SPEMANN, per le branchie, lo usarono per primi.

Nei paragrafi seguenti accennerò a questi problemi e ai risultati raggiunti, con lo scopo di inquadrare i miei risultati e di confrontare le mie conclusioni.

### *Il problema delle omologie*

In passato è stato molto discusso il problema della omologia delle branchie degli Anamni: naturalmente in rapporto ai problemi ontogenetici.

Per ciò che concerne l'omologia tra le prime e le seconde branchie degli Anuri, e le branchie degli Urodeli, i cenni bibliografici non sono molto abbondanti e i pareri sono per nulla uniformi.



Secondo MAURER (1902) <sup>(2)</sup>, le branchie « esterne » degli Anuri sarebbero omologhe a quelle degli Urodeli: e anche le branchie « interne », che rappresenterebbero un sistema più complicato e più evoluto dovrebbero riportarsi a tale omologia.

Gli argomenti portati da MAURER per sostenere questa ipotesi sono naturalmente di indole morfologica: essi sono dedotti dal modo di originarsi delle branchie dai corpi branchiali, dalla disposizione in esse dei vasi sanguigni e dalla loro origine ectodermica. Per ciò che concerne quest'ultimo fatto e per le branchie « interne » l'ipotesi è insostenibile.

Secondo EKMAN (1913) <sup>(1)</sup>, le branchie « esterne » sono certo di natura ectodermica, ma nelle « interne » interviene una componente entodermica.

Anche per ciò che concerne l'origine, le branchie « esterne » e le branchie « interne » non hanno precisamente la stessa derivazione: « Während die äussere Kiemen von den dorsalen Enden der Kiemenbogen ausgingen, sitzen die inneren der ganzen Länge der 4 Kiemenbogen anderen lateral- und ventralwärts gerichteter Konvexität an » (MAURER) <sup>2</sup>.

### *Il problema della determinazione.*

Questo problema fa capo, come poteva aspettarsi, a SPEMANN <sup>(3)</sup> (1921), che usò allo scopo il metodo dei trapianti eteroplastici: epidermide presuntiva branchiale di *Triton cristatus* fu rimpiazzata con materiale neurale presuntivo di *Triton taeniatus*: le operazioni furono eseguite allo stadio di gastrula giovane. Il materiale che avrebbero dato origine a cervello, o midollo spinale, nello sviluppo normale fu convertito in epidermide branchiale. Con questi stessi esperimenti SPEMANN mostrò, non solamente che l'ectoderma della gastrula iniziale è indeterminato e può essere indotto ad assumere un destino inconsueto, ma che la branchia di *Triton taeniatus* che si sviluppa su *Triton cristatus* presenta il suo tipico « tempo di sviluppo » e la sua forma caratteristica: in altre parole, lo stimolo induttivo mentre piega a nuovo destino il sistema con cui arriva a contatto, non ne modifica però le caratteristiche innate.

Questi risultati aprirono la strada agli esperimenti di SPEMANN e SCHOTTE (1932) <sup>(4)</sup>: dal trapianto di ectoderma ventrale di *Bombinator* al posto dell'ectoderma della bocca di *Triton*, i due AA. citati ottennero induzioni di organi adesivi e dentelli cornei tipici di Anuro; con una similitudine può dirsi che l'ectoderma ventrale, o le cellule di cui è costituito, « understand the field language » of the distant order or family, and they reply to it in their own « terms » (WEISS 1939) <sup>(5)</sup>.



Sulla stessa strada si mosse successivamente il ROTMANN (1935) <sup>(6)</sup>, che trapiantò epidermide presuntiva ventrale di *Axolotl* al posto della presuntiva epidermide branchiale di *Triton taeniatum* (stadi di gastrula precoce): l'impianto, com'era da attendersi, venne indotto a dare epidermide branchiale, e a sviluppo ulteriore, partecipò alla costituzione della branchia chimerica. Questa risultò più grande della normale di *Triton taeniatum* e vicina per grandezza a quella di *Axolotl*. In altre parole l'epidermide di *Axolotl* portata sul meso-entoderma branchiale di *Triton* impone le proprie caratteristiche (tempo di sviluppo, grandezza, forma, grandezza dei vasi), alla branchia chimerica.

L'importanza dell'ectoderma nella costruzione della branchia era stata però, già, molto bene, messa in luce da EKMAN (1913), negli Anuri: a) egli trapiantò ectoderma branchiale puro nella regione ventrale di un embrione, e ne ottenne piccole branchie « esterne », che entrarono, poi, in involuzione e non furono seguite dalla comparsa di branchie « interne »; b) asportò meso- ed entoderma branchiale e lasciò in situ l'ectoderma soprastante: anche in questo caso ottenne branchie esterne; c) rimpiazzò l'ectoderma branchiale con ectoderma del tronco (stadio neurula e bottone codale) e in questo caso non ottenne branchie; la capacità di dare branchie da parte dell'ectoderma è posseduta, oltre che dall'epidermide branchiale, solo dall'epidermide peri-branchiale (ectoderma « renale »; ectoderma « cardiaco »); d) ruotò l'ectoderma branchiale sui sottostanti foglietti: ottenne sempre branchie rovesciate.

Le esperienze condotte sugli Urodeli [HARRISON 1921 <sup>(7)</sup>; SEVERINGHAUS 1930 <sup>(8)</sup>; ICHIKAWA 1933 <sup>(9)</sup>, 1934 <sup>(10)</sup>] confermarono solo in parte questi risultati di EKMAN. Secondo i detti AA. « the ectoderm is a most important factor in the problem of the localization and formation of the gills » [SEVERINGHAUS <sup>(8)</sup>].

ROTMANN (1931) <sup>(11)</sup>, si esprimeva nel seguente modo: « Tutti questi esperimenti mostrano chiaramente che, l'ectoderma branchiale, tanto negli Anuri che negli Urodeli, possiede capacità responsabili della forma. Negli Urodeli queste capacità... sembrano essere assai più limitate, dato che la rotazione dell'ectoderma branchiale non causò, a diversità degli esperimenti di EKMAN negli Anuri, alcuna inversione. Questa minore capacità dell'epidermide rende probabile che i foglietti sottostanti posseggano un rilevante significato per la formazione delle branchie. Ciò è dimostrato da un'altra esperienza: se l'ectoderma branchiale è rimpiazzato da banale ectoderma, però proveniente solo da certe determinate regioni, questo è indotto a partecipare alla formazione di branchie normali. Ciò vale tanto per gli Anuri che per gli Urodeli ».

*Il problema delle branchie « esterne » ed « interne ».*

Della connessione — temporale o causale — tra le branchie « esterne » e branchie « interne » negli Anuri, gli Autori si sono occupati relativamente poco: anche perchè essi lavorarono piuttosto sugli Urodeli.

Fu detto precedentemente, riferendo i risultati di EKMAN, che dalle branchie « esterne », formatesi per differenziamento del solo ectoderma branchiale non si hanno, in seguito, branchie « interne »: le branchie « esterne », pochi giorni dopo la comparsa, si riassorbono e non ne resta traccia. EKMAN pose la questione se ciò debba ascriversi alla mancanza dell'entoderma o a difetto della circolazione sanguigna: ma il problema rimase largamente aperto: l'« atrofia da funzione » è un motivo che occupò assai la mente di EKMAN. D'altra parte egli ottenne branchie « esterne » normalmente irrorate di sangue, cui non fecero seguito branchie « interne ».

RAUNICH (1942) <sup>(12)</sup> sull'argomento ha lasciato la seguente notazione: « ... sembra che le branchie interne si possano abbozzare indipendentemente da quelle esterne in quanto, in qualche caso, dal trapianto si formano solo i tubercoli delle branchie interne ». La soluzione di questo problema può dare qualche luce sul significato delle « branchie esterne ».

*Il problema delle fessure branchiali e dell'opercolo.*

L'opercolo nasce come una piega ectodermica del 1° corpo branchiale (= ioideo). Questa piega si estende gradualmente sulle branchie « esterne » e le ricopre, mentre queste vanno atrofizzandosi; quella di destra si riunisce ventralmente con quella di sinistra, e per successive trasformazioni si forma lo spazio peribranchiale, che racchiude le branchie « interne » e che comunica all'esterno mediante lo « spiracolo », che è doppio (destro e sinistro) in *Xenopus*, medio in *Bombinator* e *Alytes*, sinistro in *Rana*.

Ciò negli Anuri. Negli Urodeli la piega opercolare ha uno sviluppo assai più limitato e non si forma mai uno « spazio peribranchiale ».

Mentre s'accenna la piega opercolare e si sviluppano le branchie esterne compaiono le fessure branchiali. Queste derivano dalla soluzione di continuità, in punti ben determinati (tra i corpi branchiali) dell'ectoderma che si introflette verso l'entoderma che, a sua volta, si estroflette verso l'ectoderma. L'apertura delle fessure branchiali importa una correlazione armonica molto precisa tra ectoderma ed entoderma, che deve svolgersi sulla base di un meccanismo causale molto preciso. Con la

metamorfosi le fessure branchiali si chiudono, e i polmoni, che erano già in precedenza abbozzati, entrano in funzione.

Un principio di analisi del meccanismo di azione coordinata tra la formazione dell'opercolo, l'atrofia delle branchie esterne, e la costituzione delle « fessure branchiali » è stato compiuto da SCHMIDT (1937) con scambi di tessuti branchiali tra *Bombinator* e *Triton*. Questo studio rappresenta l'unico tentativo di risolvere i problemi della meccanica dello sviluppo delle branchie con il metodo dei trapianti xenoplastici (Anuri × Urodeli).

SCHMIDT (1937) <sup>(13)</sup>, trapiantando ectoderma ventrale presuntivo di gastrula di *Bombinator* su meso-entoderma branchiale di neurula di *Triton* osservò la formazione di filamenti branchiali e di una sorta di opercolo (« eine Anschwellung »). I filamenti branchiali ebbero una vita effimera: la loro degenerazione andò di pari passo con lo sviluppo dello opercolo. Si formarono « tasche faringee », per numero e forma tipiche di *Triton*: ad esse solo parzialmente rispose l'ectoderma di *Bombinator*. Per questa indipendenza dell'ectoderma SCHMIDT fu portato ad attribuire all'ectoderma degli Anuri delle tendenze formative maggiori che quelle possedute dall'entoderma. Anche una componente entodermica sarebbe però responsabile dello sviluppo della branchia. Dall'equilibrio delle azioni dell'ectoderma e dell'entoderma risulterebbe una branchia normale.

#### *Le mie ricerche precedenti.*

In ricerche precedenti, [DURANTE 1952-53 <sup>(14-15)</sup>], mi sono occupata di trapianti xenoplastici di abbozzi branchiali completi. Ho riferito che:

1) se si opera il trapianto dell'abbozzo branchiale completo di determinati Anuri su un Urodelo, si ottiene formazione e sviluppo di una branchia completa di ogni sua parte: nelle combinazioni *Discoglossus* su *Triton*, *Discoglossus* su *Axolotl*, *Rana* su *Axolotl*, infatti, ebbi l'evoluzione completa della branchia trapiantata con formazione prima di branchie esterne, poi di opercolo e branchie interne. Successivamente (circa 40-50 giorni dopo l'operazione), si ebbe il riassorbimento. Il differenziamento istologico fu abbastanza normale.

2) Se si opera il trapianto dell'abbozzo branchiale completo di un Urodelo su un Anuro (*Axolotl* su *Discoglossus*, *Triton* su *Discoglossus*) si ottiene formazione e sviluppo di una branchia piuttosto esigua, morfologicamente incompleta, istologicamente abbastanza normale. Il riassorbimento si ebbe all'epoca della metamorfosi dell'ospite.



In una nota successiva, [DURANTE 1953 (<sup>16</sup>)] mi sono occupata di branchie chimeriche xenoplastiche. Cioè in un abbozzo branchiale, mediante sostituzione di alcuni foglietti embrionali con altri omologhi prelevati da un Anfibio di ordine diverso, ho ottenuto che:

1) ectoderma branchiale di *Discoglossus pictus* trapiantato su meso-entoderma branchiale di *Triton cristatus* inibisce lo sviluppo di branchie normali dell'Urodelo: tali branchie sono ridotte per grandezza e per numero di filamenti. Probabilmente l'ectoderma eterogeneo inibisce le potenze formative inerenti nel meso-entoderma dell'ospite;

2) ecto-mesoderma branchiale di *Discoglossus pictus* trapiantato su entoderma branchiale di *Triton cristatus* dà origine ad una formazione branchiale incompleta a carattere di Anuro: si sviluppa la branchia esterna e l'opercolo, mai la branchia interna.

#### METODICA

Allo scopo di risolvere alcuni problemi propostimi utilizzai *Discoglossus pictus* come Anuro, e *Triton cristatus* come Urodelo: questa combinazione xenoplastica, come già dimostrato dai numerosi lavori usciti da questo Istituto, è relativamente componibile.

Il donatore era prelevato allo stadio di primo bottone codale; l'ospite allo stadio di neurula.

Nel seguente prospetto sono indicate le combinazioni eseguite e il numero di operazioni per ciascuna di esse.

a) ectoderma branchiale di *Discoglossus* su meso-entoderma branchiale di *Triton* (operazioni = 30).

b) ecto- mesoderma branchiale di *Discoglossus* su entoderma branchiale di *Triton* (operazioni = 25).

c) ectoderma branchiale di *Triton* su meso-entoderma branchiale di *Discoglossus* (operazioni = 28).

d) ectoderma e mesoderma branchiale di *Triton* su entoderma branchiale di *Discoglossus* (operazioni = 18).

#### ESPERIENZE

a) *Ectoderma branchiale di Discoglossus pictus su meso- ed entoderma branchiale di Triton cristatus.*

I risultati ottenuti precedentemente in questo Istituto, suggerendo una certa compatibilità tra i tessuti di *Discoglossus* e quelli di *Triton*,

mi facevano ritenere che era da aspettarsi un differenziamento dall'ectoderma branchiale di *Discoglossus* su *Triton*. Ciò, di fatto, fu verificato: l'epidermide branchiale di *Discoglossus* si adatta bene sul sottostante meso-entoderma di *Triton* e attecchisce: ben presto si sviluppa una branchia: questa ha tutti i caratteri della forma delle branchie di *Discoglossus*. Non fu notata circolazione sanguigna; entrò in riassorbi-

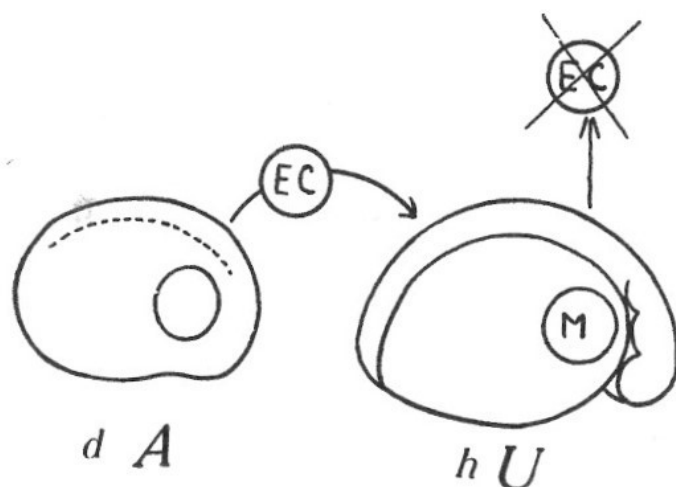


Fig. 1. - Schema di operazione del primo gruppo di esperienze: in un embrione di *Triton cristatus*, viene asportato l'ectoderma branchiale e al suo posto viene trapiantato ectoderma branchiale prelevato da un *Discoglossus pictus* allo stadio di bottone codale precoce.

mento dopo 15-18 giorni circa. Si ebbe sviluppo anche di una formazione a turgore caratteristico, facilmente individuabile come « opercolo ». Dell'intero trapianto xenoplastico non v'era più traccia nell'ospite dopo due settimane. In quest'epoca, cominciò, in molti casi, (18) a svilupparsi la branchia di *Triton*; non una branchia normale ma una o due digitazioni, quasi sempre sprovviste di pinnule e di circolazione sanguigna (cfr. DURANTE, 1953): anch'esse, certo per « atrofia funzionale », finirono per riassorbirsi.

#### Descrizione di alcuni casi.

Prot. n. 2.

2/3 - Operazione sul lato sinistro.

10/3 - Il trapianto si è espanso e sviluppato in una assai rudimentale branchia esterna di Anuro con digitazioni (fig. 2a).

13/3 - I filamenti branchiali si sono atrofizzati (fig. 2b); si è invece sviluppata la turgescenza opercolare. Molti cromatofori di *Triton* sono slittati su di esso.

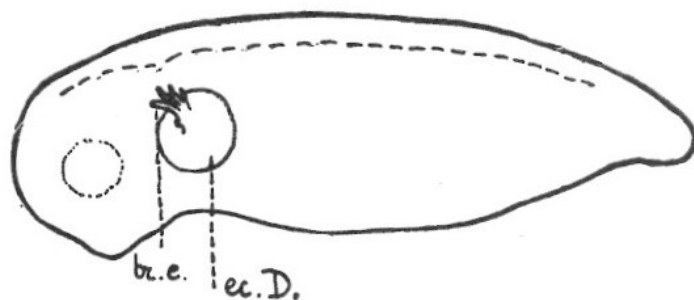


Fig. 2a. - Ectoderma branchiale di *Discoglossus* con meso-entoderma di *Triton*; Protoc. n. 2; dall'ectoderma trapiantato si sviluppa una esigua branchia «esterna» di *Discoglossus pitcus* = br.e.

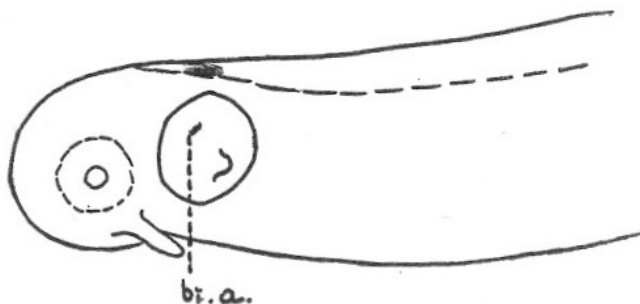


Fig. 2b. - L'ectoderma branchiale si è ingrossato ed ha assunto la turgescenza caratteristica della regione opercolare: la branchia esterna si è atrofizzata = br.a.

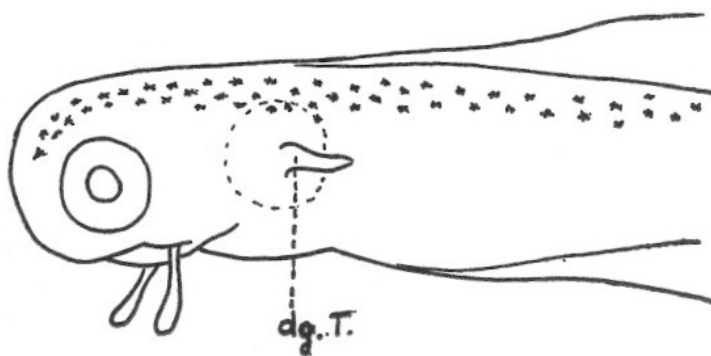


Fig. 2c. - L'ectoderma di *Discoglossus* è in involuzione; nel contempo si è sviluppata una digitazione branchiale di *Triton* molto ridotta = dg. T.

18/3 - Dalla regione centrale del trapianto si è sviluppata una digitazione branchiale a carattere di Urodelo: però anormale, priva di circolazione, priva di pinnule (fig. 2c): lo slittamento dei cromatofori



di *Triton* si è accentuato, mentre la turgescenza opercolare va scomparendo con il graduale riassorbimento del trapianto.

20/3 - La digitazione branchiale di *Triton* è in atrofia.

Prot. n. 6.

2/3 - Operazione sul lato sinistro.

10/3 - Dal trapianto si sono sviluppati filamenti tipici di branchia esterna di *Discoglossus*, però ridotti e privi di circolazione.

13/3 - I filamenti branchiali sono in via di riassorbimento: si è sviluppata la tipica turgescenza opercolare.

20/3 - I filamenti branchiali sono scomparsi: perdura la turgescenza opercolare che si va gradualmente riducendo con il contemporaneo riassorbirsi del trapianto.

22/3 - Il trapianto si è quasi completamente riassorbito: in suo luogo spuntano due tozze digitazioni branchiali di *Triton* nel cui interno sono dei grumi sanguigni (Fig. 3).

26/3 - Le digitazioni di *Triton* sono in involuzione.

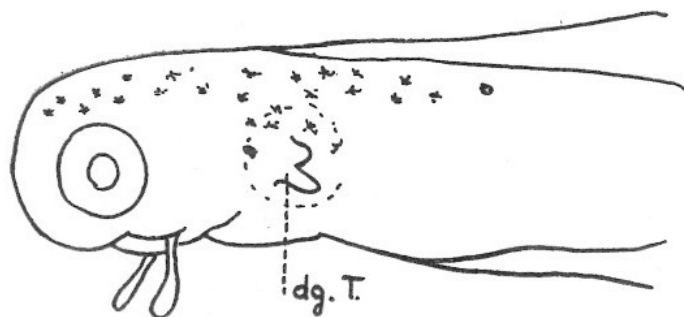


Fig. 3. - Ectoderma di *Discoglossus* su meso-entoderma di *Triton*; Protoc. n. 6; l'ectoderma trapiantato è in involuzione; si sono sviluppate molto stentatamente due tozze digitazioni di *Triton* = dg. T.

b) *Ectoderma e mesoderma branchiale di Discoglossus pictus su entoderma branchiale di Triton cristatus.*

In questo tipo di esperimento l'aspettativa di avere un buon sviluppo della branchia di *Discoglossus*, era giustificata dai risultati riferiti nel paragrafo precedente; era altresì aperta la speranza di ottenere, dopo il riassorbimento delle « branchie esterne », le « branchie interne ». Di fatto si ebbe sviluppo della branchia: questa risultò tipica di *Disco-*

*glossus*: solo per la grandezza risultò più piccola del normale: ciò, presumibilmente, perchè priva di circolazione sanguigna. Si sviluppò anche l'opercolo, e questo normale, a forma di piega, che, a suo tempo, ricoprì la branchia che, intanto, entrò in involuzione. L'involuzione della branchia « esterna » non fu mai seguita dallo sviluppo di una branchia « interna ».

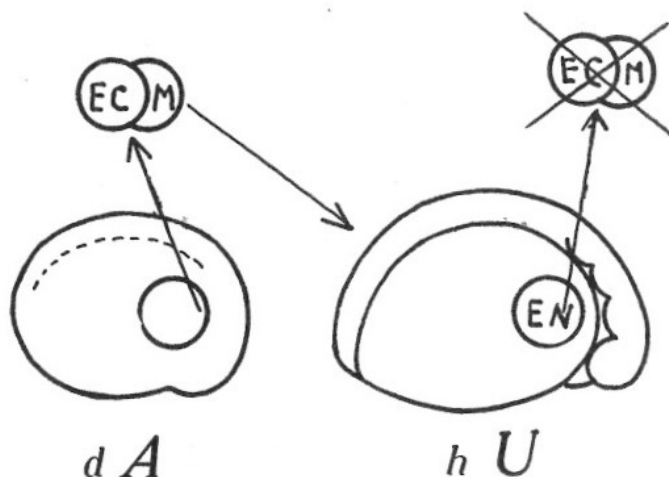


Fig. 4. - Schema di operazione del secondo gruppo di esperienze: in un embrione di *Triton cristatus*, viene asportato l'ecto-mesoderma branchiale e successivamente trapiantato ecto-mesoderma branchiale prelevato da un embrione di *Discoglossus pictus*.

Il trapianto, per i noti fenomeni di incompatibilità entrò in involuzione totale dopo 25-28 giorni. Il riassorbimento non fu mai seguito da formazione di branchie di *Triton*.

Descrizione di alcuni casi:

Prot. n. 3.

15/4 - Operazione sul lato sinistro.

20/4 - Dal trapianto si è sviluppata una branchia esterna, tipica di *Discoglossus*, e completa in ogni sua parte, sebbene più ridotta e più pigmentata che la normale; non possiede circolazione sanguigna.

23/4 - Il trapianto è turgido e trasparente; i filamenti branchiali esterni sono in via di atrofia.

25/4 - L'opercolo si è sollevato e si estende sulle digitazioni branchiali ora quasi del tutto atrofiche. Notevole è lo slittamento dei cromatofori di *Triton* sul trapianto. Le due fasi: branchie esterne,

opercolo, si sono susseguite nello stesso modo che nel caso di trapianto dell'abbozzo branchiale completo [vedi DURANTE 1953 <sup>(15)</sup>].

27/4 - La piega opercolare si è quasi completamente saldata con la

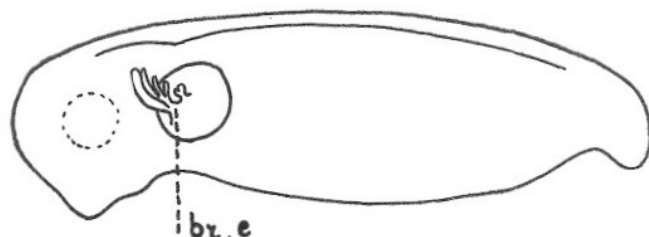


Fig. 5a. - Ecto- mesoderma branchiale di *Discoglossus* su entoderma di *Triton cristatus*; prot. n. 3; si è sviluppata una branchia esterna assai ben conformata = br. e.

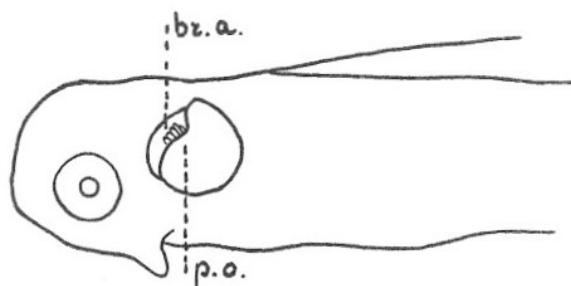


Fig. 5b. - Fase successiva alla Fig. 5a: la branchia esterna di *Discoglossus* in atrofia (br. a.) sta per essere ricoperta dalla piega opercolare: = p. o.

rimanente parte del trapianto determinando uno spiracolo. Le branchie interne non si sono sviluppate.

c) *Ectoderma branchiale di Triton cristatus su meso- ed entoderma branchiale di Discoglossus pictus.*

La combinazione xenoplastica *Triton* - *Discoglossus* ha, per la branchia, un grado minore di « possibilità ».

Riferendomi alle mie ricerche precedenti, l'abbozzo branchiale completo di *Triton*, portato su *Discoglossus*, raggiunge un differenziamento meno perfetto che l'abbozzo branchiale di *Discoglossus* trapiantato su *Triton* [DURANTE, 1953 <sup>(15)</sup>].

L'ectoderma branchiale di *Triton* trapiantato sul mesoderma ed entoderma branchiale di *Discoglossus* (Fig. 6) attecchisce e vi permane

per qualche tempo (anche 15 giorni); ma si comporta in modo completamente indifferente e non dà origine ad alcuna benchè minima differenziazione branchiale. In seguito entra in involuzione ed è sostituito dall'epidermide di *Discoglossus*. Questo risultato si ebbe in tutti i 23 casi operati. A spese dei tessuti di *Discoglossus* si abbozzò, spesso, un opercolo; e, pur se con notevole ritardo, s'ebbero branchie « interne ».

Questi risultati sono abbastanza comprensibili sulla base dei risultati ottenuti dagli altri Autori, come nei paragrafi precedenti ho descritto.

Tutti gli Autori hanno, infatti, sottolineato l'importanza del mesoderma e dell'entoderma nella formazione delle branchie negli Urodeli:

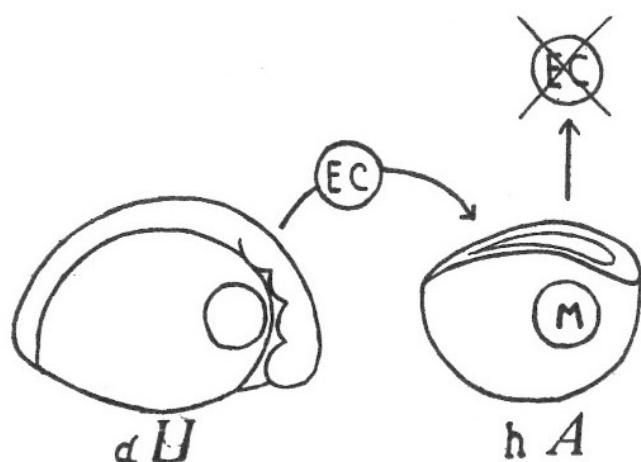


Fig. 6. - Schema di operazione del terzo gruppo di esperienze: in una neurula di *Discoglossus pictus* viene asportato l'ectoderma branchiale, e al suo posto viene trapiantato ectoderma branchiale, prelevato da un *Triton cristatus* allo stadio di bottone codale precoce.

l'ectoderma non possederebbe mai il ruolo formativo e direttivo che è tipico dell'ectoderma degli Anuri. L'ectoderma branchiale degli Urodeli, separato dai sottostanti foglietti e trapiantato, o lasciato in situ senza mesoderma e entoderma, in nessun caso dà origine a filamenti branchiali [HARRISON, 1921 (7) - ICHIKAWA, 1933 (9)].

La formazione su *Discoglossus* ospite, di branchie « interne », non precedute dalla comparsa di branchie « esterne », dimostra, ancora una volta, la indipendenza causale delle due generazioni di branchie.

Descrizione di alcuni casi.

Prot. n. 5.

7/4 - Operazione sul lato destro.



9/4 - Il trapianto ha attecchito.

18/4 - L'epidermide di *Triton* trapiantata, si è conservata inerte sul meso-entoderma dell'ospite: si è allargata molto poco e non ha dato origine a differenziamento di alcun genere. Moltissimi cromatofori dell'ospite sono slittati su di essa. (Fig. 7).

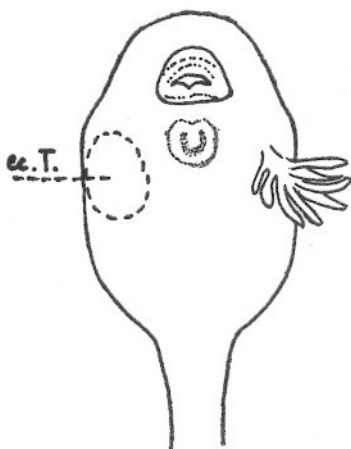


Fig. 7. - Ectoderma branchiale di *Triton* su meso-entoderma di *Discoglossus* prot. n. 5; l'epidermide di *Triton* rimane indifferenziata = ec. T.

20/4 - L'epidermide di *Triton* è stata quasi completamente fagocitata dalle cellule dell'ospite. Intanto si è già sollevato l'opercolo e questo ha ricoperto il territorio dove è stato effettuato il trapianto. Le branchie interne ancora non si sono formate.

30/4 - Ho dissezionato l'embrione dal lato dove fu effettuato il trapianto: le branchie interne sono presenti, sebbene in uno stato ritardato rispetto a quelle normali.

Prot. n. 15.

7/4 - Operazione sul lato sinistro.

18/4 - Anche in questo caso, così come negli altri, l'epidermide di *Triton* si è mantenuta indifferente e indifferenziata. L'opercolo si è sollevato solo a metà, perchè disturbato dal trapianto.

21/4 - Il trapianto si sta riassorbendo.

30/4 - Ho fissato l'embrione. In sezione appare evidente che le bran-

chie interne si sono sviluppate, sebbene con un certo ritardo rispetto a quelle normali del lato destro (Fig. 8).

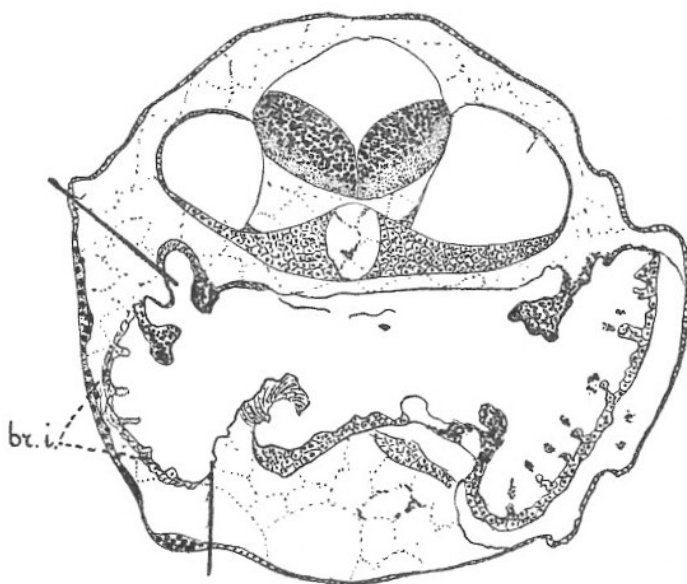


Fig. 8. - Sezione trasversale di un embrione di *Discoglossus* il cui ectoderma branchiale è stato sostituito con ectoderma branchiale di *Triton*; le branchie interne = br. i., formatesi con notevole ritardo, appaiono allo stadio di rudimenti; con la linea intera è indicata la regione del trapianto.

d) *Ectoderma e mesoderma branchiale di Triton su entoderma branchiale di Discoglossus.*

Le ricerche di SEVERINGHAUS (1930) <sup>(8)</sup> e quelle successive di ICHIKAWA (1933-1934) <sup>(9, 10)</sup> negli Urodeli non hanno fatto altro che sottolineare la grande importanza formativa dell'entoderma per la costruzione della branchia: « the entoderm is a most important factor in the problem of the localization and formation of the gills » [SEVERINGHAUS 1930 <sup>(8)</sup>].

E prima ancora, HARRISON (1921) <sup>(7)</sup> aveva mostrato che, negli Urodeli ectoderma + mesoderma branchiale trapiantati sul tronco, non danno origine a filamenti branchiali, ma solo a rudimenti.

In questo tipo di esperienze io ho ottenuto il seguente risultato.

Dal trapianto si svilupparono tre protuberanze branchiali tozze, di tipo *Triton* e assolutamente prive di circolazione (Fig. 10). Il loro sviluppo non procedette ulteriormente: dopo 20-25 giorni si riassorbono

completamente. Come si vede, i risultati collimano con quelli ottenuti da HARRISON in *Amblystoma*.

Dopo il riassorbimento non si ebbe, sul lato operato di *Discoglossus*, formazioni di branchie.

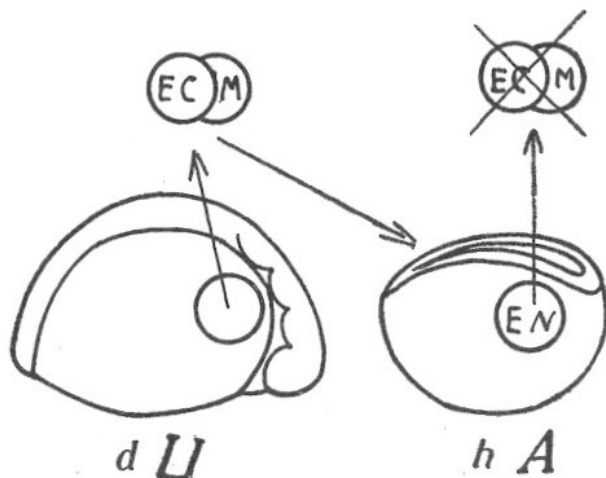


Fig. 9. - Schema di operazione del quarto gruppo di esperienze: in una neurula di *Discoglossus* l'ecto-mesoderma branchiale viene sostituito con ecto-mesoderma branchiale prelevato da un *Triton* allo stadio di bottone codale precoce.

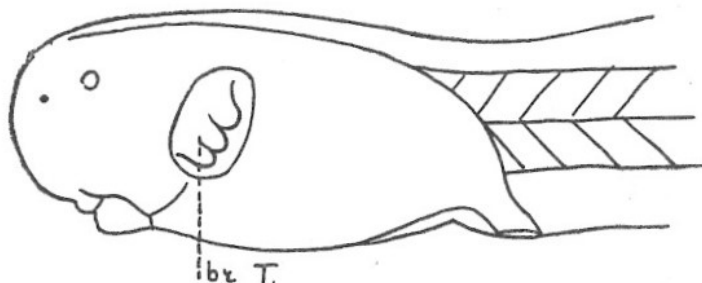


Fig. 10. - Prot. n. 20; dal meso-ectoderma di *Triton* trapiantato su entoderma di *Discoglossus* si formano tre tozze protuberanze: sono appena l'inizio di una formazione branchiale di *Triton* al massimo del loro sviluppo = br. T.

Prot. n. 20.

15/4 - Operazione sul lato sinistro.

25/4 - Si nota la formazione di tre protuberanze molto corte e grosse: appena l'inizio di una formazione branchiale di *Triton* (Fig 10). Alcuni melanofori di *Discoglossus* sono slittati sul trapianto; alcuni guanofori di *Triton* sono slittati sull'ospite.

5/5 - Lo sviluppo delle corte digitazioni branchiali di *Triton* non è andato oltre; niente circolazione sanguigna, solo un piccolissimo grumo di sangue.

11/5 - Il trapianto è in via di riassorbimento.

23/5 - Il trapianto si è riassorbito completamente già da molti giorni. Al suo posto non si è avuta nessuna formazione branchiale di *Discoglossus*.

#### DISCUSSIONE

I) Il primo tipo di esperimento da me compiuto, il trapianto dell'ectoderma branchiale di *Discoglossus* sul meso- ed entoderma branchiale di *Triton*, porta come risultato al differenziamento di una branchia « esterna » e di un « opercolo » caratteristici di *Discoglossus*. La persistenza della branchia è effimera: e ad essa non fa mai seguito una branchia « interna ».

Non è da ritenersi che la formazione della branchia « esterna » e dell'« opercolo » di *Discoglossus* sia avvenuto sotto gli impulsi formativi del meso- ed entoderma di *Triton*: da lungo tempo, e dai più diversi Autori si è ormai riconosciuto all'ectoderma branchiale degli Anuri, la capacità di autodifferenziarsi in branchia, e di imprimere entro certi termini alcune caratteristiche a tutto l'abbozzo branchiale [EKMAN 1931 <sup>(1)</sup>; SPEMANN 1924 <sup>(3)</sup>; ROTMANN (1931) <sup>(5)</sup>; SEVERINGHAUS 1930 <sup>(8)</sup>]. Esperienze controllo, trapiantando l'ectoderma branchiale di *Discoglossus* sul fianco di *Triton*, sono state da me effettuate, durante il corso dei presenti esperimenti: anche in questo caso si è avuto differenziamento di una branchia « esterna » e di un « opercolo » a carattere di Anuro.

Il secondo tipo di esperimenti (trapianto di ectoderma e mesoderma branchiale di *Discoglossus* su entoderma branchiale di *Triton*) porta come risultato a uno sviluppo più affermato e più vicino al normale della branchia « esterna » e dell'« opercolo » di *Discoglossus*. L'opercolo ha talvolta l'aspetto di « piega ». Lo sviluppo di una piega opercolare tipica, che avanza a ricoprire la branchia, è forse da attribuire a condizioni meccaniche presenti nel territorio trapiantato, determinate dalla presenza del mesoderma sottostante. Il riassorbimento sotto l'opercolo della branchia « esterna » è da ritenersi « normale ». Ciò dice che i fattori responsabili del ciclo di evoluzione ed involuzione della branchia « esterna » sono inerenti alle cellule stesse dell'abbozzo, e non dipendono da condizioni umorali dell'organismo in sviluppo.



II) Nei due tipi di esperimenti ora discussi sono state messe in luce le capacità formative dell'ectoderma branchiale di *Discoglossus*, per quanto riguarda la prima generazione di branchie. Il solo ectoderma branchiale e, meglio, l'ectoderma e il mesoderma branchiale insieme, sono capaci di dare origine, su di un embrione di *Triton*, a una branchia « esterna » con opercolo: non sono però capaci di dare origine, a tempo opportuno, a una branchia « interna ». Per ottenere questa è necessaria la presenza dell'entoderma [DURANTE 1953 <sup>(15)</sup>]. S'apre con ciò il problema dell'« omologia » delle branchie degli Anuri e quelle degli Urodeli. Secondo ROTMANN (1935) <sup>(11)</sup> le branchie degli Urodeli non sarebbero mai di pura origine ectodermica, essendo l'epidermide branchiale costituita di due strati, uno più esterno, ectodermico, il « Deckschicht », e l'altro, interno, entodermico, il « Sinnesschicht »: quest'ultimo avrebbe origine da migrazione di cellule che derivano dall'entoderma delle « tasche faringee » (« Schlundtaschen »). Negli Anuri l'epidermide branchiale è anch'essa costituita di due strati; ma essi sono ambedue di origine ectodermica, e lungo lo sviluppo della branchia esterna il « Sinnesschicht » va in degenerazione rimanendo solo il « Deckschicht » a formarne l'epitelio. Le prime branchie degli Anuri sono di pura origine ectodermica; alle seconde branchie partecipa invece, e soprattutto, l'entoderma. L'« omologia », dunque, con le branchie degli Urodeli può porsi solamente, se mai, per le branchie « interne » degli Anuri. I risultati dei miei esperimenti sono in favore di questo modo di vedere. Infatti è stato rilevato che tra la formazione delle branchie « esterne » e delle branchie « interne » non c'è alcun nesso causale: inoltre mentre le branchie esterne possono sorgere per differenziamento del solo ectoderma, per il differenziamento delle branchie interne è necessario l'entoderma.

Non è quindi necessario considerare le branchie « esterne » come dei reliquati filogenetici. Le branchie esterne sono probabilmente una formazione « a sè », pienamente adattata alla prima vita dell'embrione: di un embrione cioè che non si nutre ancora a spese dell'ambiente esterno, e che ha solo necessità di respirare, e che perciò vive attaccato con gli organi adesivi alle piante acquatiche che possono fornirgli un ambiente ricco di ossigeno.

Le branchie « interne » corrispondono, invece, a un altro stato ecologico della larva: uno stato in cui gli organi adesivi sono scomparsi, e l'animale vive sul fondo, sul quale cerca, ormai, il suo nutrimento (foglie in decomposizione; batteri; protozoi; piccoli anellidi ecc.); in queste condizioni le branchie « devono » essere protette: così si comprende la formazione dell'opercolo e della cavità peribranchiale.

III) L'ectoderma branchiale di *Triton* sul mesoderma ed entoderma branchiale di *Discoglossus* non si differenzia in branchia. Ciò concorda con l'annotazione di tutti gli altri AA. precedenti a riguardo della minor autonomia differenziativa dell'ectoderma branchiale degli Urodeli; e con la scarsa capacità induttiva del mesoderma e dell'entoderma degli Anuri.

Avrebbe potuto attendersi dal trapianto la formazione di una branchia chimerica; i deficienti rapporti tra sistema di induzione, (mesoderma ed entoderma di Anuro) e sistema di reazione (ectoderma di Urodelo) lo hanno invece impedito.

Anche dall'ectoderma e mesoderma branchiale di *Triton* trapiantati sull'entoderma di *Discoglossus* non si ottengono mai vere e proprie branchie, ma solo rudimenti. Ciò dimostra l'importanza branchio-formativa dell'entoderma branchiale degli Urodeli, e la scarsa capacità induttiva dell'entoderma degli Anuri.

IV) Il problema dei rapporti tra branchie « esterne » e fessure branchiali acquista un particolare interesse, quando siano messi in presenza sistemi così disparati come l'ectoderma di un Anuro e l'entoderma di un Urodelo. E' noto infatti che le fessure branchiali si aprono tra le protuberanze branchiali da cui avranno origine i filamenti, e per la concordata confluenza, in opposta direzione, dell'ectoderma e dell'entoderma.

Secondo SCHMIDT (1937) <sup>(13)</sup> la collaborazione tra l'ectoderma branchiale di *Bombinator* e il sottostante entoderma di *Triton* è solo parziale: si delineano molto chiaramente le tasche faringee di *Triton*, l'ectoderma di *Bombinator* talvolta, si dirige all'interno verso l'entoderma di *Triton*, ma non si ha apertura di « fessure » branchiali.

V) Per ciò che concerne la formazione dell'opercolo i miei risultati suggeriscono che il territorio epidermico da cui esso deriva è provvisto delle stesse caratteristiche di autonomia differenziativa, tipica di tutto l'ectoderma branchiale; la presenza del mesoderma sottostante permette, però, un migliore differenziamento morfologico: in virtù di esso il territorio in accrescimento si *ripiega* e forma un opercolo tipico. Anche SCHMIDT nei suoi esperimenti di trapianto di ectoderma di *Bombinator* su mesoderma ed entoderma branchiale di *Triton*, ottenne differenziamento dell'opercolo: come nei miei casi questo, però, non presentava l'aspetto di piega, ma solo di territorio rigonfiato. Evidentemente il mesoderma degli Urodeli non è capace di fornire al territorio opercolare degli Anuri le condizioni per formare la « piega » caratteristica.

### CONCLUSIONI

a) Furono effettuate diverse composizioni xenoplastiche (Anuri × Urodeli) tra i foglietti costitutivi dell'abbozzo branchiale.

b) I risultati ottenuti permettono: 1) di precisare, negli Anuri, l'importanza branchio-formativa dell'ectoderma, per quanto riguarda la branchia « esterna »; e dell'entoderma per quanto riguarda la branchia « interna » 2) di rafforzare negli Urodeli l'importanza branchio-formativa dell'entoderma.

c) Le branchie « esterne » e le branchie « interne » negli Anuri rappresentano molto probabilmente due condizioni di adattamento a diverse situazioni della vita embrionale e larvale. Le branchie esterne comunque non sono omologhe alle branchie degli Urodeli: forse le branchie « interne » degli Anuri sono omologhe alle branchie degli Urodeli.

d) La successione tra le branchie interne e le branchie esterne negli Anuri è puramente cronologica, non causale.

e) Il territorio formativo dell'opercolo gode della stessa autonomia formativa caratteristica di tutto l'ectoderma branchiale. La costituzione della « piega » è però condizionata alla presenza del mesoderma rispettivo.

Palermo — Istituto di Zoologia dell'Università e Roma — Istituto Superiore di Sanità.

### BIBLIOGRAFIA

- (1) EKMAN G. - *Morph. Jahrb.*, 47: 449 (1913).
- (2) MAURER F. - *Hand. vergl. u. exp. Entw. der Wirbeltiere*, 2: 109 (1902).
- (3) SPEMANN H. - *Roux' Arch.*, 48: 1 (1924).
- (4) SPEMANN H. e SCHOTTÉ O. - *Naturw.*, 20: 463 (1932).
- (5) WEISS P. - *Principles of Development*. New York, 1939.
- (6) ROTMANN E. - *Roux' Arch.*, 133: 225 (1935).
- (7) HARRISON R. G. - *Biol. Bull.*, 41: 456 (1924).
- (8) SEVERINGHAUS A. E. - *J. Exp. Zool.*, 56: 1 (1930).
- (9) ICHIKAWA M. - *Mem. Coll., Sci. Kyoto Imp. Un., I. B.*, 9: (1933).
- (10) ICHIKAWA M. - *Proc., Imp. Ac. Japan.*, 10: (1934).
- (11) ROTMANN E. - *Roux' Arch.*, 124: 747 (1931).
- (12) RAUNICH L. - *Arch. Ital. Anat. Embr.*, 47: 738 (1942).
- (13) SCHMIDT G. A. - *Zool. Anz.*, 117: 59 (1937).
- (14) DURANTE M. - *Ric. Scient.*, 22: 984 (1952).
- (15) DURANTE M. - *Riv. Biologia*, 45: 279 (1953).
- (16) DURANTE M. - *Ric. Scient.*, 23: 1794 (1953).