

dans le blastocèle. Les embryons présentent quelquefois une saillie ventrale, non pigmentée, correspondant au greffon. Souvent ce dernier ne se signale même pas à l'examen de l'embryon *in toto*. Sur coupes, on constate que la situation du greffon au sein de l'hôte est variable. Dans 6 cas, le greffon s'est logé soit dans la cavité pharyngienne, soit dans l'entoblaste vitellin, ne conservant aucun contact avec l'épiblaste. L'absence d'induction dans ces cas est en rapport avec la situation particulière du greffon et ne nous retiendra pas ici. Dans 21 cas cependant, le greffon a conservé des rapports de contiguïté normaux avec l'épiblaste; malgré cela, nous n'observons que deux cas présentant une réaction neurale nette de l'épiblaste sous la forme d'une vésicule d'ailleurs atypique, où l'on trouve côté à côté des éléments neuraux parfaitement caractéristiques, et des éléments beaucoup moins différenciés neuroïdaux (petites cellules à noyaux irréguliers, disposées sans ordre). Les 19 cas où le greffon est en contact avec l'épiblaste, montrent une série continue allant de l'épiblaste non modifié à une réaction dont la plus haute expression est un épaississement atypique, constitué de petites cellules polyédriques, tassées, à noyaux arrondis ou légèrement lobés. En considérant l'ensemble des cas où le greffon se trouvait en contact intime avec l'épiblaste, on constate donc que dans 2 cas seulement sur les 21 étudiés, l'induction neurale s'est réalisée, d'une manière d'ailleurs atypique, comme l'atteste le mélange de cellules neurales et neuroïdales.

Une série de contrôle a été effectuée en greffant de jeunes lèvres dorsales préalablement traitées par l'alcool absolu pendant une heure. Pour cette série, l'induction a été la règle constante, donnant naissance à des vésicules neurales importantes, fréquemment accompagnées d'annexes sensorielles: vésicule optique ou auditive.

De l'ensemble de ces faits se dégage la conclusion que l'organisateur fixé dans un liquide formolé, voit se restreindre fortement et même disparaître complètement dans certains cas, sa capacité inductive.

Il nous reste maintenant à tenter une interprétation de ces faits. Un grand nombre de travaux récents, ont été consacrés à l'étude de l'action du formol sur les protéines¹. Des indications recueillies, il ressort que le formol se combine facilement et d'une manière réversible aux groupes NH₂. Cette réaction dépend de divers facteurs dont les plus importants sont, outre la concentration respective des groupes NH₂ et du formol, le PH, la température et le temps. Dans les conditions utilisées dans ces expériences nous devons nous attendre à une réduction du nombre de groupes NH₂. La probabilité d'hydrolyse et de libération de groupes NH₂ bloqués, lors du lavage est relativement faible en raison des conditions mêmes de ce lavage: temps réduit et PH alcalin. Un essai direct de coloration à la ninhydrine des organisateurs traités au formol et lavés, nous a montré une réduction nette de la réaction par rapport aux témoins non formolés. Toutefois les groupes NH₂ n'étant pas les seuls à réagir avec le formol, il appartient aux recherches futures de décider entre les réactions possibles et déterminantes du phénomène décrit ici.

Un autre point qui retiendra notre attention réside dans les expériences d'inactivation de virus par le formol². Cette réaction entraîne une réduction des groupes

NH₂, et provoque une chute du pouvoir infectant. Comme dans le cas des protéines, la réaction est réversible par dialyse en milieu acide. Ce point offre un intérêt particulier lorsqu'on le situe dans l'ensemble du problème actuel de l'induction: en effet, BRACHET¹ a émis l'hypothèse de l'intervention de particules ribonucléoprotéiques dans l'induction. Ces particules, de constitution analogue à celles de virus, seraient douées d'autoréduplication et constituerait un rouage important dans la synthèse des protéines. Il serait intéressant de voir si un parallélisme peut être établi entre l'inactivation des virus par le formol et les résultats obtenus dans nos expériences.

R. LALLIER

Laboratoire de morphologie animale, Université de Bruxelles, le 18 octobre 1949.

Summary

A series of grafts of blastopore lips, previously fixed in formol saline and washed, has been carried out. The graft lodged in the blastocel gave only two inductions, which were moreover atypical, out of 21 cases studied. Each of these two cases shows an atypical neural vesicle composed of patches of neural cells among little-differentiated "neuroidal" cells.

The other 19 cases show the disappearance or reduction of the inducing ability of the organizer; this provokes at the most an epiblastic thickening consisting of closely packed, small polyhedral cells.

An interpretation of the facts is proposed in accordance with the biochemical data. A series of experiments is in progress at present, whose aim is to ascertain the conditions of the reactions set going during the action of the formol on the organizer material.

¹ J. BRACHET, Cold Spring Harbor symposia, XII (1947).

Experimentelles zur Befruchtungsphysiologie des Tritoneies¹

Für die Tritonarten ist physiologische Polyspermie charakteristisch; es dringen meist mehrere Spermien in das Ei ein. An den Eintrittsstellen der Spermien entstehen kurz nach der Besamung kleine, durch stärkere Pigmentierung ausgezeichnete Krater in der Eirinde. Da sich diese «Spermaeinschläge» leicht zählen lassen, kann der Grad der Polyspermie mit hinreichender Genauigkeit bestimmt werden. Für zahlreiche Experimente (Bastardierungen, Merogonieversuche, sterile Eientnahme, Polyploidisierung mittels Kälteschock usw.) wird künstliche Besamung notwendig. Die Eier werden den Eileitern entnommen und mit der Spermaflüssigkeit der Samenleiter betupft. Erst nach dieser «trockenen» Besamung wird Wasser zugegeben. Der Erfolg dieser Manipulation ist, wie jeder Experimentator erfahren kann, recht unsicher oder doch stark variabel. Trotz scheinbar gleichen Versuchsbedingungen können, neben normal besamten Eiern (mit 1–6 Spermaeinschlägen) auch stark besamte (7–12 Einschlägen) und überbesamte Eier (mit über 12 Einschlägen) vorkommen. Gleichzeitig bleiben häufig viele Eier unbefruchtet. Überbesamung führt in der Regel zu unregelmäßiger Furchung und damit zu einer abortiven Entwicklung (FANKHAUSER², HADORN³).

Die für einen normalen Befruchtungserfolg günstigen Versuchsbedingungen wurden bisher nie systematisch untersucht. Mit den nachfolgenden Versuchsserien möchten wir einige zunächst rein praktische Probleme angehen, die sich aus der Besamungstechnik ergeben. Wie

¹ Ausgeführt mit Unterstützung der «Stiftung für wissenschaftliche Forschung an der Universität Zürich».

² G. FANKHAUSER, Roux' Arch. 105, 501 (1925).

³ E. HADORN, Roux' Arch. 136, 400 (1937).

¹ D. FRENCH et J. T. EDSALL, Adv. in Protein Chemistry 11, 277 (1945). – H. S. OLcott et CONRAD H. FRAENKEL, Chem. Rev. 41, 151 (1947).

² A. T. ROSS et W. M. STANLEY, J. Gen. Physiol. 22, 165 (1938). – W. M. STANLEY, J. Exptl. Med. 81, 193 (1945). – M. A. LAUFLER et M. WHEATLEY, Arch. bioch. 23, 262 (1949).

schnell nach der Spermaabgabe soll Wasser zugegossen werden (Exp. 1)? Wie lange kann ein in feuchter Kammer liegendes Ei nach der Entnahme aus dem Eileiter auf die Besamung warten (Exp. 2)? Wie wirkt sich eine Verdünnung der Samenflüssigkeit aus (Exp. 3)? Welche Temperaturen sind optimal; bestehen diesbezüglich Unterschiede zwischen Ei und Spermien (Exp. 4)? Beeinflußt die den Eileiter umgebende Coelomflüssigkeit, falls die Eier damit in Berührung kommen, das Besamungsergebnis (Exp. 5)?

Alle Experimente wurden an *Triton alpestris* durchgeführt, und zwar von Mitte Mai bis Mitte Juni 1949. Die Tiere wurden 3 Tage vor Versuchsbeginn mit einem gonadotropen Schwangernharnpräparat, das uns die Herstellerfirma Ciba, Basel, zur Verfügung stellte, vorbehandelt (150 IE pro Weibchen, Präparat Nr. 406c). Damit erzielten wir eine ausgiebige Ovulation, so daß meist pro Weibchen 20–40 Eier in den Eileitern zur Verfügung standen.

Die Versuche wurden stets unmittelbar nach dem Dekapitieren der Elterntiere eingeleitet. Abgesehen von den in den einzelnen Versuchsanordnungen speziell variierten Faktoren wurden für alle Versuche folgende Bedingungen eingehalten: Zimmertemperatur $18 \pm 2^\circ\text{C}$; Besamung mit konzentriertem Sperma aus Samenleiter, dann $\frac{1}{2}$ –1 Minute später: Zugabe von Leitungswasser (abgekocht) von 18°C . Da erfahrungsgemäß der Besamungserfolg bei gleicher Technik, je nach der Individualität des verwendeten Keimzellspenders, sehr stark variieren kann, sind unsere Versuche ausnahmslos so angelegt, daß wir das Material der Elterntiere zu je gleichen Teilen auf je zwei oder mehr zu vergleichende Versuchsserien eines Experiments verteilen. So wurden z.B. die Keimzellen des linken Ei- und Samenleiters für Experiment 1a, die der rechten Gonoducte für 1b verwendet. Auf diese Weise wird ein durch individuelle Variation bedingter «Auslesefehler» vermieden. Andererseits sind aus diesen Gründen die Ergebnisse der verschiedenen Experimente (1–5) unter sich nicht direkt vergleichbar.

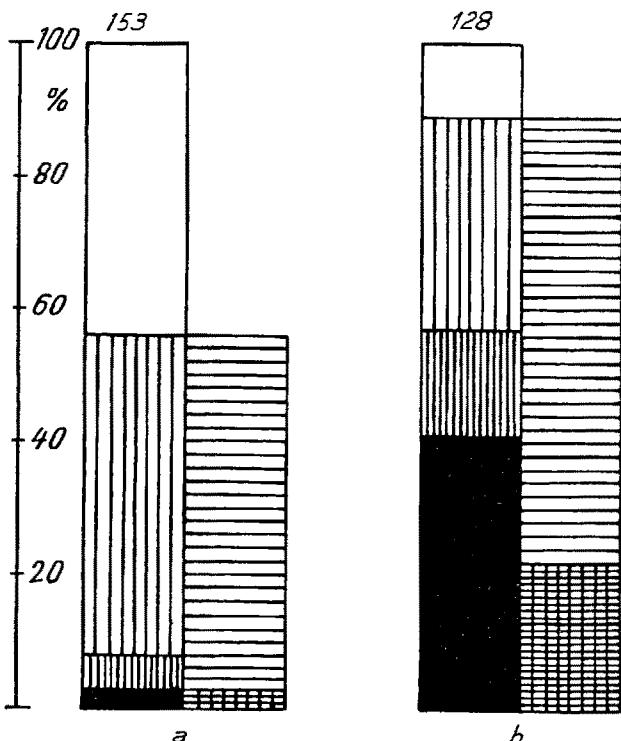


Abb. 1. Experiment 1a, b: Prozentuale Verteilung für unbesamte Eier (weiß), normal besamte (senkrecht weit schraffiert), stark besamte (senkrecht eng schraffiert) und überbesamte Eier (ausgefüllt schwarz). Vom Total der Besamten (je rechts): Eier mit normaler Furchung (waagrecht schraffiert) und mit abnormer Furchung (kreuzweise schraffiert). Über den Säulen: Zahl der Eier. Unten: Bezeichnung der Serie. Erklärungen im Text. Unten: Bezeichnung der Serie.

Exp. 1a, b; Abb. 1. *Der Einfluß sofortiger oder verzögter Wasserzugabe.* In Serie 1a wurde das Wasser unmittelbar nach dem Betupfen der Eier mit konzentriertem Sperma zugegeben; in Serie 1b erfolgte die Wasserzugabe erst, nachdem die besamten Eier während 10 Minuten in einer feuchten Kammer gelegen hatten. *Resultate:* Bei sofortiger Wasserzugabe bleiben viele Eier unbesamt;

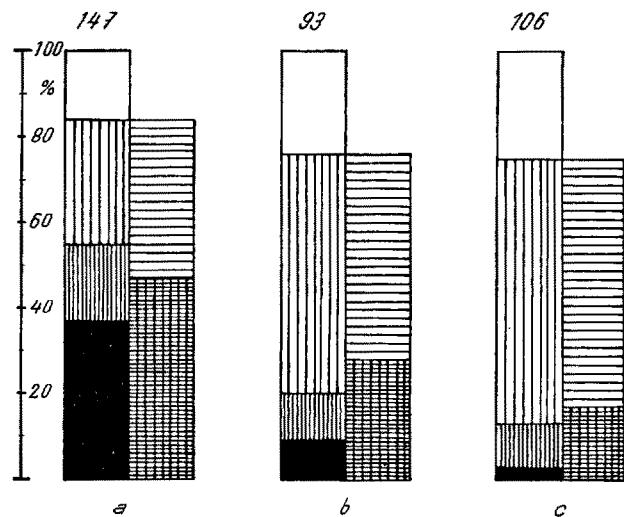


Abb. 2. Experiment 2a, b, c: Signaturen wie in Abb. 1.

unter den besamten finden sich hauptsächlich solche mit wenig Einschlägen. Von der Gesamtheit aller besamten Eier furchte sich ein sehr hoher Prozentsatz normal. Verzögerte Wasserzugabe führt zu einer höheren Besamungsrate, doch steigt der Anteil der überbesamten Eier sehr stark an, und als Folge davon furchte sich fast ein Drittel der befruchteten Eier abnorm. Solche Keime mit abnormer Furchung gehen größtenteils vor Beendigung der Gastrulation zugrunde. Erfahrungen aus weiteren Versuchsserien zeigen, daß die günstigsten «Wartezeiten» zwischen 0 und 10 Minuten liegen; optimale Ergebnisse sind bei 1–3 Minuten zu erwarten.

Exp. 2a, b, c; Abb. 2. *Einfluß sofortiger oder verzögter Spermazugabe.* Frei präparierte Uteruseier werden sofort (Serie a), nach 5 Minuten (Serie b), oder erst nach 10 Minuten (Serie c) mit konzentriertem Sperma betupft. Die Wartezeiten verbrachten die Eier in der feuchten Kammer. *Ergebnis:* Eine Wartezeit bis zu 10 Minuten (c) wirkt sich gegenüber sofortiger (a) oder kurzer Wartezeit (b) insofern günstig aus, als der Anteil der überbesamten Eier zugunsten der normal besamten Eier absinkt. Als Folge davon erhöht sich die Ausbeute an normal sich furchenden Keimen.

Exp. 3a, b, c; Abb. 3. *Einfluß der Spermaverdünnung.* Das dem Samenleiter entnommene Sperma wurde unverdünnt (a), schwach verdünnt (b) oder stark verdünnt (c) zur Besamung verwendet. Die Verdünnung erfolgte mit physiologischer NaCl-Lösung (0,7%), und zwar in Serie b im Mischungsverhältnis 5:1 (Sperma: NaCl-Lösung), bei Serie c im Verhältnis 1:1. *Ergebnis:* Der Prozentsatz der besamten Eier sinkt bei Besamung mit verdünntem Sperma nur wenig, dagegen beeinflußt die Verdünnung den relativen Anteil der verschiedenen Besamungsklassen in günstiger Weise. Die Zahl der Spermainschläge sinkt mit zunehmendem Verdünnungsgrad. Das Ansteigen abnorm gefurchter Eier in Serie c gegenüber Serie b ist zunächst nicht verständlich, da in

c prozentual weniger «stark besamte» und «überbesamte» Eier vorkommen als in b. Möglicherweise äußert sich hier eine schädigende Wirkung eines zu stark verdünnten Ejakulats auf das Eiplasma.

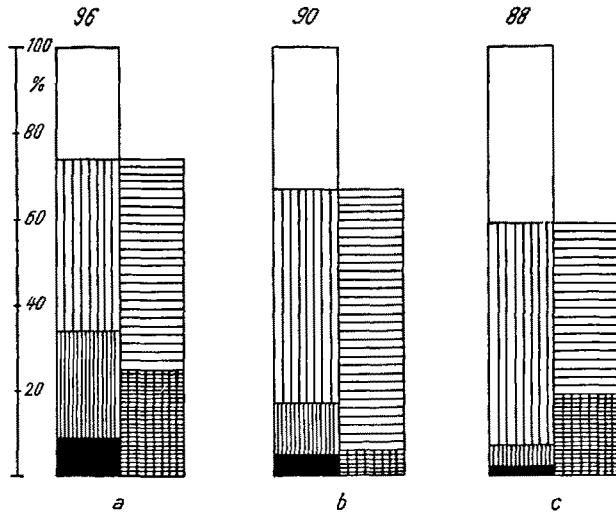


Abb. 3. Experiment 3 a, b, c: Signaturen wie in Abb. 1.

Exp. 4 a, b, c, d; Abb. 4. Der Temperatureinfluß. Bei diesen Versuchen wurden sowohl Eileiter wie Samenleiter herausgeschnitten und mit den eingeschlossenen Keimzellen für ca. 15 Minuten in einem Thermostaten auf die gewünschte Temperatur (18° bzw. 25°) gebracht. Danach erfolgte die künstliche Besamung mit unverdünntem Sperma. Ergebnis: Die Verteilung auf die verschiedenen Besamungsklassen wird deutlich nur durch die Eitemperatur beeinflußt. Verschiedene Sperratemperaturen erscheinen in dieser Beziehung im geprüften Be-

daß kein Kontakt mit der Coelomflüssigkeit möglich war. In den Serien b und c tauchten wir die Eier vor der Besamung je für 5 bzw. 10 Minuten in Coelomflüssigkeit ein. Ergebnis: Einwirkung von Coelomflüssigkeit setzt

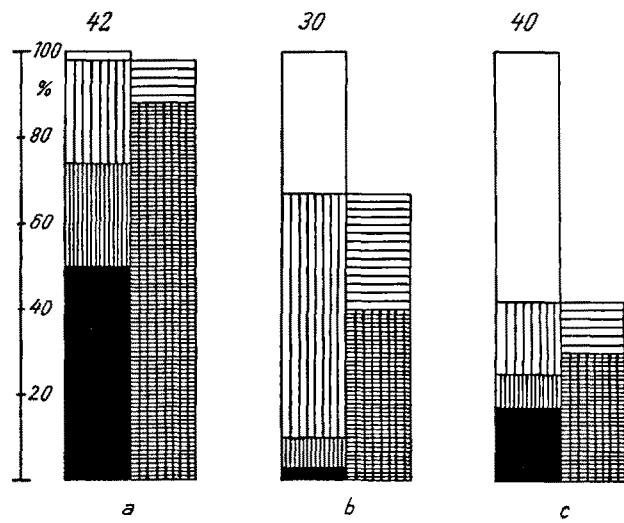


Abb. 5. Experiment 5 a, b, c: Signaturen wie in Abb. 1.

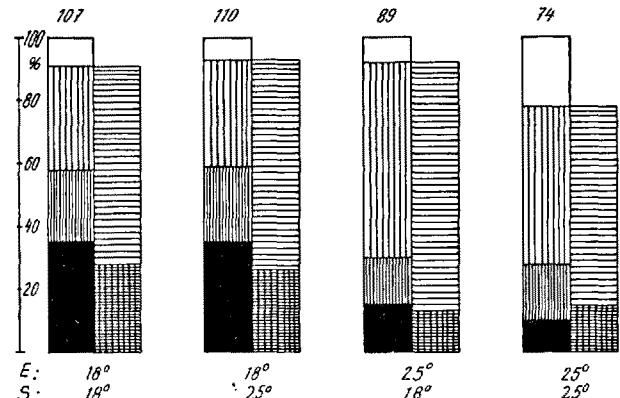


Abb. 4. Experiment 4 a, b, c, d: Signaturen wie in Abb. 1. Je oben Temperatur der Eier (E); je unten Temperatur der Spermien (S).

reich wirkungslos. Bei niedriger Eitemperatur (a, b) ist der Polyspermiegrad höher als bei hoher Temperatur (c, d). Dementsprechend finden sich in der ersten Gruppe relativ mehr abnorm gefurchte Eier als in der zweiten. Werden Ei und Spermium auf 25° erwärmt (Serie d) bleibt die relative Verteilung auf die 3 Besamungsklassen zwar gleich wie in Serie c («warme» Eier und «kalte» Spermien); es steigt aber der Prozentsatz unbefruchteter Eier an.

Exp. 5 a, b, c; Abb. 5. Einfluß der Coelomflüssigkeit. Für Serie a wurden die Eier so dem Eileiter entnommen,

den Besamungserfolg sehr deutlich herab; sie ist daher nach Möglichkeit zu vermeiden. Auffallend ist bei Serie 5a, daß der Prozentsatz der überbesamten und dadurch unregelmäßig sich furchenden Eier unverhältnismäßig viel höher ist als in anderen «gleichbehandelten» Normalserien (z. B. 2a, 3a). In solchen Unterschieden äußert sich die eingangs erwähnte individuelle Variabilität des Gametenmaterials, wenn dieses von verschiedenen Eltern stammt.

E. HADORN und W. FRITZ

Zoologisch-vergleichend anatomisches Institut der Universität Zürich, den 28. November 1949.

Summary

Different problems arising from the artificial insemination of amphibians have been investigated on *Triton alpestris*. The influence of the following factors was tested:

(1) The length of time between insemination and the addition of water. (2) The length of time between the withdrawal of the eggs from the oviduct and the insemination. (3) The degree of dilution of sperms. (4) The temperature of eggs and sperms respectively. (5) The coelomic fluid.

We determined for every experimental series the total rate of insemination, the degree of "polyspermy", and the course of the cleavages.

Hybrids between some Members of the Rassenkreis *Triturus cristatus*

The great crested newts *Triturus cristatus* are divided into a number of subspecies inhabiting different geographical areas. Of these we have experimented with three, namely *T. c. cristatus* (from Chessington, Surrey and the New Forest, Hampshire, England), *T. c. carnifex* (from Naples, Italy) and *T. c. karelinii* (from Baku, Azerbaijan). We have obtained *F*₁ from *karelinii*