



Fig. 2.—A low power electron micrograph of a field of cilia isolated by the alcohol-digitonin method.

Under these conditions, all parts of the cell are less susceptible to digitonin solubilization, but preparations have been obtained which contained many freed nuclei. With higher salt concentrations in the digitonin solution, 0.1 to 0.3 *M* with respect to KCl, all parts of the cell are resistant to digitonin solubilization. At 0.4 *M* KCl, most of the cilia and nuclei disappear, the cytoplasm becomes somewhat clearer, and what appear to be mitochondria located beneath the pellicle in the spaces between kineties,

are present. At 0.5 *M* KCl, the cilia, nucleus and most of the cytoplasm dissolve, leaving the refractive pellicle with only faint traces of what look like kinetosomes.

The preparation of mass isolations of the parts of the cell, which have been freed by this procedure of "selective solubilization", is subject only to the usual difficulties attending differential centrifugation. A field of isolated cilia, pictured by low-power electron microscopy, is shown in Figure 2. Kinetosome isolation has been found to be more difficult, largely because of the lack of any criteria for distinguishing them from other small round bodies. Methods are being developed, however, for isolating large quantities of kinetosomes of the oral membranelles since these can be initially isolated as part of the intact oral apparatus. The isolation of nuclei and pellicles, to mention only two of the many fibrous structures found in ciliates, should provide valuable material for biochemical analysis.

F. M. CHILD and D. MAZIA

*Department of Zoology, University of California, Berkeley, February 10, 1956.*

#### Zusammenfassung

Eine Methode für selektive Solubilisierung der Zellen und verschiedener Organellen von Ciliaten, welche auf einer speziellen Anwendung der Methode MAZIA und DAN zur Gewinnung isolierter Mitoscapparate von Seeigelleiern beruht, wird beschrieben. Die Ciliaten werden bei niedriger Temperatur in 40% Ethanol extrahiert und mit Digitonin behandelt. In salzfreier Digitoninlösung (1% aq) bleiben nur das Wimpernsystem und damit verbundene Strukturen erhalten und können in genügender Menge für chemische Analysen gewonnen werden. Durch Zugabe verschiedener Mengen von KCl ist es möglich, auch Zellkerne, Pellicula, usw. vor der Auflösung zu schützen und durch differentielle Zentrifugierung zu isolieren.

## Informations - Informationen - Informazioni - Notes

### STUDIORUM PROGRESSUS

#### La question des hétérochromosomes chez les Sauropsidés. Oiseaux.

Par J. M. VAN BRINK et G. A. UBBELS<sup>1</sup>, Utrecht

Si le type d'hérédité liée au sexe a été précisé chez les Oiseaux depuis plus de 40 années, la reconnaissance cytologique de la digamétie femelle qu'implique ce type demeure un problème toujours discuté, les travaux parus avant 1949 ayant fait l'objet d'une critique serrée de MATTHEY<sup>2</sup>. Le désaccord qui se manifeste chez les divers auteurs provient en premier lieu de difficultés techniques: les chromosomes sont toujours très nombreux et en majorité de très petite taille (inférieure à 0,5  $\mu$ ); un tel matériel exige une fixation impeccable en dépit de laquelle l'observation reste très difficile.

L'espèce la plus étudiée est le Poulet, et ce sont les cytologistes japonais (SUZUKI, OGUMA et surtout YAMASHINA<sup>3</sup>) qui ont fait les recherches les plus appro-

fondées sur ce matériel. Ces trois auteurs ont trouvé un nombre de 78 chromosomes chez le mâle, de 77 chez la femelle. La cinquième paire, formée de petits métacentriques, serait représentée par un seul élément dans le sexe femelle.

A en juger d'après les figures publiées, la technique de l'école japonaise (fixations aux liquides de Hermann et de Champy) est infiniment supérieure à toute autre. Malgré cela, les conclusions de YAMASHINA ne peuvent, selon MATTHEY, être acceptées sans réserves: pour cet auteur le décompte objectif de 78 éléments, dont un bon nombre est à la limite de la visibilité, est une chose impossible, ce qui élimine d'emblée tout argument d'ordre numérique en ce qui concerne la question des hétérochromosomes. D'autre part, l'analyse morphologique est très délicate et les possibilités d'erreur nombreuses: la différence entre acrocentriques et métacentriques de taille moyenne ou petite est, dans beaucoup de cas, difficile à apprécier, ce qui rend l'appariement, et par conséquent la découverte d'une paire d'hétérochromosomes très douteux.

NEWCOMER et BRANT<sup>4</sup> ont étudié la spermatogénèse sur des frottis fixés par un mélange complexe à base d'acide propionique et arrivent aux conclusions suivantes: le nombre de chromosomes n'est pas constant

<sup>1</sup> Institut de Génétique de l'Université, Utrecht.

<sup>2</sup> R. MATTHEY, *Les chromosomes des Vertébrés* (F. Rouge, Lausanne 1949).

<sup>3</sup> Y. YAMASHINA, *Cytologia* 13, 270 (1914).

<sup>4</sup> E. H. NEWCOMER et J. W. A. BRANT, *J. Heredity* 45, 79 (1954).

et beaucoup moins élevé que ne le croit YAMASHINA. La source des anomalies numériques serait le comportement aberrant des microchromosomes, qui se formeraient au cours de la prophase à partir des segments hétérochromatiques des macrochromosomes; ces microchromosomes auraient un centromère diffus et se multiplieraient par simple fragmentation. A la fin d'une division ils seraient de nouveau résorbés par les grands éléments. Les hétérochromosomes seraient représentés par la première paire, hypothèse fondée sur des raisons génétiques et cytologiquement d'autant moins admissible que la femelle n'a pas été étudiée.

Nous avons repris l'étude des chromosomes du Poulet<sup>5</sup> en utilisant la technique décrite par MAKINO et NISHIMURA<sup>6</sup>, dont les Japonais eux-mêmes n'ont jamais fait usage mais qui, dans la modification de MATTHEY a donné d'excellents résultats chez les Mammifères (MATTHEY<sup>7</sup>) et les Reptiles (MATTHEY et VAN BRINK<sup>8</sup>).

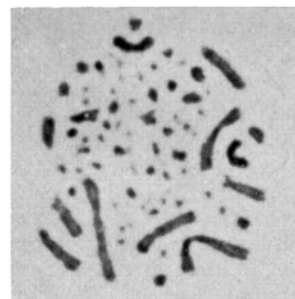
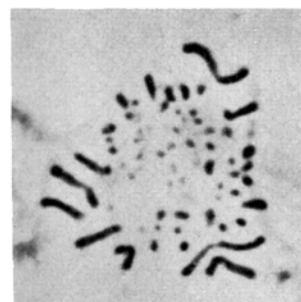
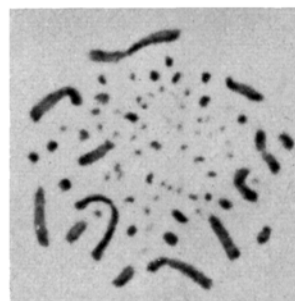
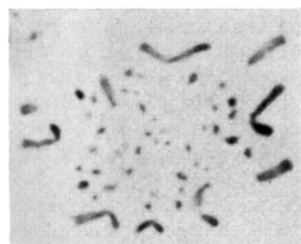
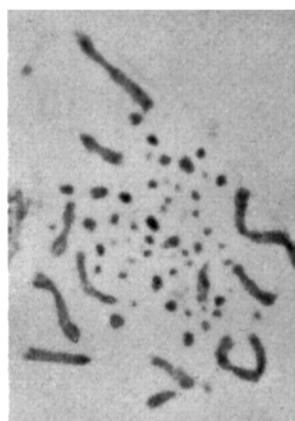
<sup>5</sup> Nous remercions vivement M. P. UBBELS, Directeur de l'Institut gouvernemental d'Aviculture, Beekbergen, Hollande, qui a mis aimablement à notre disposition un abondant matériel.

<sup>6</sup> S. MAKINO et I. NISHIMURA, Stain Techn. 27, 1 (1952).

<sup>7</sup> R. MATTHEY, Rev. Suisse Zool. 60, 225 (1953).

<sup>8</sup> R. MATTHEY et J. M. VAN BRINK, Exper. (sous presse).

**Résultats: A. Nombre de chromosomes.** De nombreuses mitoses de très bonne qualité – tous les éléments étant bien étalés et sans aucune superposition – ont été trouvées dans les gonades ainsi que dans la rate d'embryons de 10 à 13 jours. Les métaphases montrent l'image typique pour les Oiseaux: une couronne de grands éléments entoure un grand nombre d'éléments de taille extrêmement petite. Cependant la présence de chromosomes de dimensions intermédiaires rend la distinction des deux catégories plutôt imprécise. Dans les prométaphases, où les chromosomes sont encore peu contractés, la transition entre macros et micros est déplacée vers les petits éléments, et l'on trouve jusqu'à 10 ou 11 paires de chromosomes non-punctiformes (Fig. 1 et 4), tandis que dans les métaphases proprement dites la septième ou même la sixième paire est la dernière qui puisse être attribuée à la catégorie des macrochromosomes. Si les microchromosomes subissent une contraction comparable à celle des grands – ce qui semble ne pas être exclu (Fig. 1 et 3) – beaucoup d'entre eux, qui, à la prophase, sont déjà à la limite de la visibilité, pourraient peut-être à la fin de la métaphase avoir passé au delà de cette limite; en outre le «blocage» est toujours difficile à dépister lorsqu'il s'agit de chromosomes très petits.



1-3.

1a-3a.

*Gallus domesticus*. Fig. 1-3 et 1a-3a. Mitoses chez la ♀.

4-6.

4a-6a.

Fig. 4-6 et 4a-6a. Mitoses chez le ♂. × 1950.

Ceci ne signifie pas qu'il y ait «coalescence» ou «résorption des petits par les grands», supposition avancée par NEWCOMER et BRANT à propos de phénomènes analogues qui se produiraient à la fin de l'anaphase I, et qu'ils disent avoir également observés dans des divisions somatiques. Mais nous voyons que des exceptions apparentes à la loi de la constance numérique pourraient trouver leur cause dans la contraction des éléments les plus petits qui cessent, en passant de la prométaphase à la métaphase, d'être encore visibles. Inversement, la fissuration très marquée des grands chromosomes prométaphasiques se manifeste vraisemblablement chez les microchromosomes aussi, ce qui peut conduire l'observateur à compter deux éléments là où il y a deux chromatides. Dans ces conditions la nature «accessoire» qu'attribuent les auteurs américains aux microchromosomes ne nous paraît pas du tout prouvée par leurs observations sur la prophase méiotique (stade difficile à fixer et défavorable pour la numération). D'ailleurs, les photographies même de NEWCOMER et BRANT ne justifient en rien la thèse de ces auteurs: en particulier la métaphase I de leur figure 20 K montre clairement 35-40 bivalents et n'illustre nullement une prétendue fragmentation. Quant à l'argument génétique de six groupes de linkage, correspondant à un maximum de six paires de chromosomes génétiquement actifs, il est contredit par les auteurs eux-mêmes qui signalent l'existence de gènes se ségrégeant indépendamment des six groupes principaux.

Le tableau suivant montre les nombres de chromosomes que nous avons trouvés dans une trentaine de cinèses sévèrement sélectionnées:

Nombre de chromosomes	Nombre de cinèses ♀	Nombre de cinèses ♂
67	1	—
68	—	2
69	—	1
70	—	1
71	—	—
72	1	1
73	2	—
74	2	—
75	2	—
76	—	1
77	2	4
78	1	2
79	1	—
80	1	1
81	—	1
82	2	—

Si, parmi ces cinèses on choisit comme les plus représentatives celles qui donnent l'impression d'une fixation tout particulièrement réussie, la variabilité devient plus petite, mais ne disparaît pas tout à fait:

75	2 (Fig. 1 et 2)	—
76	—	—
77	—	1 (Fig. 6)
78	—	1 (Fig. 5)
79	1	—

A notre avis toutes les variations numériques trouvées s'expliquent d'une manière satisfaisante si on admet que les microchromosomes ne diffèrent des macrochromosomes que par leur dimensions, et que, mise à part cette différence inexpiquée, leur comportement est comparable à celui des macrochromosomes. Une hypothèse aussi révolutionnaire que celle de NEWCOMER et BRANT est inutile: la courbe de variation observée n'est qu'une

courbe d'erreurs, et ces erreurs elles-mêmes résultent des changements de forme et de dimensions qui affectent les chromosomes au cours de la division, changements dont les conséquences sont particulièrement graves lorsqu'il s'agit d'éléments très petits situés à la limite du pouvoir résolvant de nos microscopes.

B. *Hétérochromosomes*. La variation numérique observée, bien qu'assez petite pour nous laisser croire à un nombre constant, est toutefois assez grande pour nous empêcher de déterminer le nombre total avec une certitude absolue, et nous ne pouvons donc accepter sur ce point les affirmations de YAMASHINA: «The number of chromosomes... was found to be 78 in the spermatogonial cell and 77 in the oogonial cell with no exception in every of them.» Une paire d'hétérochromosomes ne peut être mise en évidence que si cette paire se trouve parmi les plus grands chromosomes, ceux-ci devant être morphologiquement bien individualisés; or, cette dernière condition est réalisée chez le Poulet: dans toutes les cinèses que nous avons examinées, il est sans exception possible de reconnaître chacune des six plus grandes paires. Chez la femelle, la cinquième paire n'est représentée que par un petit métacentrique (z) (Fig. 1-3) qu'on trouve en deux exemplaires chez le mâle (Fig. 4-6). Les chromosomes de la cinquième paire, tout en étant à peu près de la même longueur totale que ceux de la quatrième, s'en distinguent nettement par la position médiane de leur centromère, alors que la sixième paire est beaucoup plus petite.

Tout en reconnaissant la validité des critiques de MATTHEY relatives à l'identification des hétérochromosomes, nous croyons cependant que chez le Poulet les caractères morphologiques des 6 plus grandes paires rendent leur identification si peu douteuse, que la conclusion de YAMASHINA est ici pleinement justifiée: c'est la cinquième paire, formée de métacentriques de taille moyenne, qui représente les chromosomes Z. Par contre il n'est pas possible de décider si la digamétie est de type Z-O ou Z-W.

Summary

The chromosomes of the fowl were studied with the aid of MAKINO's and NISHIMURA's water pretreatment squash technique, modified by MATTHEY, in embryonic spleen and gonads of both sexes. The number of chromosomes was found to be about 78; the numerical variations are to be ascribed to technical difficulties, caused by the extremely small size of the microchromosomes, rather than to an unchromosomalike behaviour of the latter, as was supposed by NEWCOMER and BRANT. As to the exact number of chromosomes, we consider its determination beyond the possibilities of cytology. The 5th largest pair of the male, represented by a single element in the female, could be identified as the sex chromosome pair, in accordance with the findings of YAMASHINA. The digamety might be of the Z-O or Z-W type.

Corrigendum

J. MAYER and CLAUDINE Y. ZIGHERA: *Fat Metabolism in Various Forms of Experimental Obesity*. VI. *Instantaneous Lipogenesis in Hypothalamic Obese Mice*, Exper. 11, fasc. 9, 358 (1955).

In the table entitled "C<sup>14</sup>-acetate Incorporation into Carcass and Liver Fatty Acids in Hypothalamic Obese Mice and Controls", the total C<sup>14</sup> incorporation for non-fasted, non-obese animals should be 370 ± 56 (instead of 3705 ± 561).