

and 0.017% after 24 h; a parallel test gave values of 0.015 and 0.018 respectively. Our best performance to date gave a value after 24 h equivalent to only 0.01% NaCl but we feel that even this can be improved, for, since the plants were raised in the compost mentioned above, we were operating under unfavourable conditions; the peat granules adhere very intimately to the roots and, even after prolonged washing, not all particles are removed. In future we intend raising the plants in vermiculite.

After 24 h, the plants still stand well. Indeed, we have kept plants in this fashion for some days, but there appears to be a decrease in the output of the hatching factor after this period and we have never used such solutions.

For small volumes of solution, filtration through filter paper should be avoided if possible; in a test with 20 ml samples, we found, in some cases, that if all the increase in conductivity were due to salts, this was more than doubled by passage through a Whatman No. 40 acid extracted filter paper. The increases appear to be connected with the nature of the solutions for they were much less with distilled water, our samples of Whatman No. 1 being superior in this respect to the No. 40. The total increase is slight where large volumes of solutions are dealt with; solutions are then filtered through a Büchner funnel after giving the filter paper a preliminary wash with at least 100 ml of high grade distilled water. Resistance glass and polythene bottles are used throughout.

Although the solutions are of very low ionic content, our investigations have shown that, if it were all calcium chloride, its addition to low calcium Ringer would be sufficient, very occasionally, to increase the beat of the frog heart even in the absence of the hatching factor, since the heart is very sensitive to Ca^{++} ; the assay would therefore be misleading. However, the 24-h solutions are very strong; they can therefore be diluted until it is quite certain that their ionic contribution to the low calcium Ringer in which they are assayed can safely be ignored. Such an assay showed that the initial solution obtained from the four plants after 24 h was about 10 times as strong as the minimal concentration of Cambridge 'standard solid'⁵ hatching factor; the yield from the four plants in 24 h was therefore equivalent to more than 1 g of the Cambridge solid. We have since found that even stronger solutions can be obtained from the small root systems of younger plants; these can be contained in smaller quantities of water.

This work forms part of a programme supported by a grant from the Nuffield Foundation to whom we have pleasure in expressing our thanks.

C. ELLENBY and A. B. GILBERT

Department of Zoology, University of Durham, Newcastle upon Tyne, October 14, 1957.

Zusammenfassung

Zur quantitativen Bestimmung des Schlüpfaktors der Kartoffelnematode, entweder mit sogenanntem Schlüpfest, oder durch unsere, vor kurzem beschriebene Froschherzmethode, muss die Ionenkonzentration in der Lösung kontrolliert werden. Eine Methode zur Herstellung geeigneter Lösungen wird beschrieben.

⁵ C. T. CALAM, H. RAISTRICK, and A. R. TODD, *Biochem. J.* 45, 513 (1949).

Obtention de lignées cellulaires en culture de tissus d'invertébrés

Le rôle prépondérant des cultures de tissus dans la recherche médicale, notamment en virologie, est avant tout le résultat de l'obtention de souches de cellules à partir de tissus humains ou de vertébrés, avec possibilité de maintien de celles-ci.

Chez les invertébrés, plusieurs tentatives de cultures de différents tissus ont été faites soit pour l'étude physiologique, soit en vue de travaux de pathologie cellulaire. Dans quelques cas on a noté, à partir d'un explant, l'émigration de fibroblastes ou de l'épithélium; ces développements étaient toujours réduits¹ et ce n'est que rarement que l'on a observé des mitoses ou des divisions amitotiques². Mais les repiquages successifs des cultures en voie de multiplication et la formation de souches cellulaires, critères actuels des cultures de tissus, n'ont pas été réalisés.

Nos expériences ont porté parallèlement sur deux lépidoptères: *Bombyx mori* L., et *Galleria mellonella* L., sur un orthoptère *Blaberus fusca* et sur les mollusques: *Helix aspersa* MÜLLER et *H. pomatia* L. Nous résumons ici ce qui concerne la culture des lignées relatives à *B. mori* et *H. aspersa* les plus anciennement maintenues.

L'enceinte de culture a été choisie de telle manière qu'on associe les procédés de multiplication modernes sur grande surface avec changement de milieu et les repiquages aseptiques. Nous avons abandonné les techniques en goutte pendante, sur lame détachée et sur anneaux, ainsi que les procédés septiques, pratiquement les seuls à être employés jusqu'alors pour les insectes ou pour les mollusques. Les cultures ont été réalisées en tubes roulants, en tubes plats avec lame intérieure en boîtes de Kolle et de Roux et dans des flacons permettant le contrôle au microscope, à l'immersion sans interruption de la culture³.

Les tissus de *B. mori* ont été cultivés dans un milieu contenant pour 1000 cm³ d'eau bi-distillée, les éléments minéraux suivants: KCl: 3,0 g; CaCl_2 : 0,5 g; NaH_2PO_4 : 1,0 g; $\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 3,5 g; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 3,0 g; CO_3NaH jusqu'à pH 6,4. Les glucides étaient représentés par le glucose à raison de 1 g % et la source d'acides aminés par l'hydrolysate de caséine (Vitrum) ayant montré préalablement une certaine polyvalence pour les tissus de vertébrés. Ce produit (0,5 g) a été complété de glutamine (0,1 %). Les facteurs de croissance étant peu connus chez les insectes, un extrait de levure (obtenu par effet de NaCl) à raison de 2 cm³ %, avec choline à 0,002 % a été ajouté. En plus de 200 000 U.I. % de pénicilline et de 50 mg % de streptomycine le milieu est additionné d'hémolymphe de *B. mori* (10%) chauffée à 60°C pendant 5 min pour éliminer l'effet de la tyrosinase⁴.

A partir des explants de gonades femelles de larves à la fin du 5^e âge, l'émigration des cellules type «fibroblastes» s'intensifie à 30°C, après 48 h, avec formation

¹ W. E. BECKEL, *Nature* 177, 534 (1956). – P. BOHUSLAV, *Arch. exp. Zellforsch.* 14, 1 (1933). – J. G. H. FREW, *Brit. J. exp. Biol.* 6, 1 (1928). – J. B. GATENBY, J. C. HILL et T. J. MACDOUGALD, *Quart. J. micr. Sci.* 77, 129 (1935). – A. J. P. GOODCHILD, *Nature* 173, 504 (1954). – T. D. C. GRACE, *Nature* 174, 187 (1954). – M. R. MURRAY, *Proc. Soc. exp. Biol., N.Y.* 6, 1 (1928).

² J. B. GATENBY, J. C. HILL et T. J. MACDOUGALD, *Quart. J. micr. Sci.* 77, 129 (1935). – W. TRAGER, *J. exp. Med.* 61, 501 (1935). – S. S. WYATT, *J. gen. Physiol.* 39, 941 (1956).

³ C. VAGO, *Mikroskopie* (sous presse).

⁴ S. S. WYATT, *J. gen. Physiol.* 39, 941 (1956).

d'un réseau. Le halo prélevé tous les 8-14 jours et transposé sur de nombreux points dans un autre flacon de culture, assure la continuation d'un développement lent des fibroblastes avec formation d'un tissu à structure moyennement serrée. Dans les subcultures apparaissent quelquefois aussi des formes épithéliales. Certaines lignées ont été repiquées douze fois (Figure).



Culture de tissu de gonade femelle de larve de *Bombyx mori*. Culture de 5 jours, troisième transfert. Hémalum-éosine-orange 1:600.

Pour les tissus du mollusque *H. aspersa*, le milieu contenait pour 1000 cm³ d'eau bi-distillée: NaCl: 6,500 g; KCl: 0,14 g; CaCl₂: 0,12 g; NaH₂PO₄: 0,01 g; CO₂NaH: 0,20 g; glucose: 1,0 g; avec hydrolysate de caséine, glutamine, extrait de levure, choline et antibiotiques aux mêmes doses que pour *B. mori*. Le pH du sang augmente très rapidement après prélèvement. Aussi est-il immédiatement incorporé dans le milieu (10%) et centrifugé ensemble afin d'éliminer les hémocytes et obtenir un pH définitif de 7,6-7,9.

Les explants de la tunique pédieuse (non septique!) donnent naissance aux fibroblastes, lesquels prélevés et repiqués, forment des réseaux à évolution très lente. Après huit repiquages, les cellules se maintiennent avec peu de granules et un nombre réduit de mitoses.

Ces résultats montrent la possibilité de maintenir à partir des tissus d'invertébrés, des lignées cellulaires ininterrompues et de rendre accessibles ces tissus aux travaux de pathologie expérimentale *in vitro*. Nous soulignons cependant, que le développement des cellules après repiquages est beaucoup plus lent que celui des tissus de vertébrés en général. Nous attribuons ce fait à l'insuffisance de nos connaissances relatives aux facteurs de croissance chez les insectes et chez les mollusques. Cette question est d'ailleurs encore actuellement complexe pour les cultures de tissus de vertébrés. Les extraits obtenus à partir de l'organe de Bojanus et des ovaires des *Helix* semblent constituer un facteur accélérateur et c'est par l'adjonction de ce principe que nous essayons à l'heure actuelle d'augmenter la croissance. D'autre part, la blessure de la culture semble

libérer, comme cela a été signalé pour la culture de tissus de vertébrés, certaines substances activatrices. Enfin, pour assurer une homogénéité de développement, nous continuons à l'heure actuelle l'isolement des lignées à l'aide de dispersions cellulaires par voie enzymatique.

C. VAGO et S. CHASTANG

Institut National de la Recherche Agronomique, Station de Recherches d'Alès (France) (Laboratoire de Pathologie Comparée), le 10 décembre 1957.

Zusammenfassung

In Gewebekulturen von *Bombyx mori* ♀-Gonade und von *Helix aspersa*-Bindegewebe abimpfbare Fibroblasten-Zellenstämme wurden erhalten. Die Zusammensetzung der Nährflüssigkeiten ist gegeben, und es wird auf Schwierigkeiten in der Gewebekultur Wirbelloser hingewiesen.

Culture of Nucellar Tissue of *Citrus* *in vitro*

A variety of reproductive structures in plants, such as anthers, ovules, endosperm, embryos and embryo fragments, have been successfully cultured *in vitro*; but I have not come across any report of the culture of nucellar tissue. In *Citrus*, the cells of nucellus surrounding the micropylar part of the embryo sac are known to produce adventive embryos. It was, therefore, considered worthwhile to make *in vitro* cultures of the nucellus in order to explore its proliferative capacity. A horticultural variety of *Citrus*, growing in the 'Varsity Campus, was used for experimentation.

The upper half of the nucellus, in which proembryos had been initiated, was dissected out and inoculated on WHITE'S¹ medium modified by the addition of NITSCH'S² trace elements and cobalt chloride (0.025 ppm).

On this basal medium, the nucellus turned brown within a week. But in a medium supplemented with 400 ppm of casein hydrolysate (acid hydrolysed, neutralised and vitamin-free), profuse proliferation of nucellar cells was observed and the original tissue could hardly be traced as such 6-8 weeks after culture. Instead, there were produced abundant masses of tissue which are here designated as 'pseudobulbils' (Fig. 1) - a term first coined by LA RUE³ to designate the curious balls of tissue obtained in cultures of the female gametophyte of *Zamia*.

The pseudobulbils were pearly white and consisted of parenchymatous cells. They have now been maintained for over a year through several transfers to fresh media. Kinetin (2 ppm), added in conjunction with casein hydrolysate (400 ppm) to the basal medium, was found to enhance the production of pseudobulbils. It is possible that, apart from the proliferation of nucellar cells, the pseudobulbils may in part also originate from callusing of proembryos.

Pseudobulbils, left in culture media containing casein hydrolysate alone (400 ppm), and in combination with kinetin (2 ppm), for more than two months, occasionally developed into seedlings which presented several

¹ P. R. WHITE, *A Handbook of Plant Tissue Culture* (Lancaster, Pa. James Cattell, 1943).

² J. P. NITSCH, *Amer. J. Bot.* 38, 566 (1951).

³ C. D. LA RUE, *Brookhaven, nat. Lab. Symp. No. 6*, 187 (1954).