

Endomeiosis and Sex Determination in *Daphnia pulex*

Environmental factors that favour the appearance of amphigonic individual ins parthenogenetically reproducing populations are supposed to exert their influence upon female individuals that, although they are phenotypically homogeneous, are nevertheless endowed with sexually differentiated genotypes¹. It has also recently been shown that a modified type of true meiosis—which has been named endomeiosis—takes place during the maturation of parthenogenetic eggs of Aphids and gives rise to genetic variability within parthenogenetic lines².

This investigation was started in order to establish whether endomeiosis takes place also during the maturation of parthenogenetic eggs of Daphnids, where WEISMANN established that a single polar body is formed and the diploid number of chromosomes is preserved³. More recent research seemed to confirm the absence of meiosis in the parthenogenetic lines of *Daphnia pulex*⁴, which are therefore thought to form clones.

The attached Figures 1-4 have been taken from very young oocytes of *Daphnia pulex* from Emily which appears to belong to a tetraploid race, the diploid number being 8⁵. Figure 1 shows an oocyte at pachytene stage where pairing appears evident in the formation of bivalents. Figure 2 shows an advanced diplotene stage where the bivalents, which appear near the periphery of the nucleus, are rather contracted. Eight bivalents are present in the nucleus although the photograph shows only six of them. The next photograph (Figure 3) shows various stages of the deconjugation⁶ or disjunction of the

bivalents corresponding to the first anaphase, which is taking place within the nuclear membrane. Figure 4 shows the product of these pairing and deconjugation processes corresponding to the first maturation division. These, however, result in the restoration of the somatic number of chromosomes because the products of the division of the bivalents remain within the nuclear membrane and no polar body is formed as a result of this division. Only twelve such chromosomes—instead of sixteen—are visible in the Figure. The subsequent division—which has been described by various authors⁷—corresponds, therefore, to the second maturation division and the single polar body which is formed subsequently corresponds to the second polar body, as already demonstrated in the case of Aphids.

Thus parthenogenesis is of meiotic type in the Emilian race of *Daphnia pulex* and it can safely be assumed that recombination can give rise to genetic variability within single parthenogenetic lines of *Daphnia*, as has been genetically demonstrated in parthenogenetic lines of Aphids. This explains why BANTA and WOOD⁸ found that variability in theligenous parthenogenesis of Daphnids is as high as in the offspring of amphigonic reproduction.

Previous experimental research has shown that male individuals can be induced in parthenogenetic lines of *Daphnia pulex* and of several other species of Daphnids⁹ by a number of environmental factors. As meiotic parthenogenesis was unknown in Daphnids, the appearance of amphigonic individuals from such parthenogenetic lines was thought to be exclusively due to external factors, that is to be entirely phenotypical¹⁰.

The discovery of endomeiosis in *Daphnia pulex* shows the possibility of obtaining different sex genotypes through recombination within parthenogenetic lines of Daphnids and consequently the possibility of a not purely phenotypic sex determination. Previous observations can also be explained by the presence of endomeiosis. It has been reported¹¹ that strains which were able to produce amphigonic individuals under given environmental conditions were no longer able to do so under the same conditions after a long period of parthenogenetic reproduction. It can now be suggested that, during the endomeiotic processes, predominantly male genotypes have been segregated and have been eliminated while under the laboratory conditions that selected in favour of parthenogenetic reproduction. The sex variability of the original strains has apparently been reduced through an elimination of male factors and a race showing acyclical parthenogenesis has been evolved.

Environmental factors thus appear to have in Daphnids both a direct influence upon the differentiation of the sex phenotypes and a selective influence upon the different genotypes available within parthenogenetic lines. The latter was indeed postulated in pioneer work by WEISMANN¹².

¹ G. BACCI, Rend. Acc. Naz. Lincei 23 (8), 165 (1957).

² G. COGNETTI, Exper. 17, 168 (1961).

³ A. WEISMANN, Zool. Anz. 9, 570 (1886).

⁴ C. H. MORTIMER, Zool. Jahrb. (Abt. Phys.) 56, 323 (1936).

⁵ F. SCHRADER, Z. ind. Abstamm.- Vererb. Lehre 40, 1 (1925).

⁶ W. VON BAEHR, La Cellule 30, 317 (1920).

⁷ A. KÜHN, Arch. Zellforsch. 1, 538 (1908).

⁸ A. M. BANTA and T. WOOD, Verhandl. V. Int. Congr. Vererbungs-wiss. (1927).

⁹ A. M. BANTA and L. A. BROWN, Phys. Zool. 5, 218 (1932). - M. von DEHN, Zool. Jahrb. (Abt. Phys.) 65, 334 (1955).

¹⁰ M. HARTMANN, Die Sexualität, 2. Aufl. (Jena 1956).

¹¹ A. M. BANTA, Science 41, 442 (1915).

¹² A. WEISMANN, Beiträge zur Naturgeschichte der Daphniden (Leipzig 1876-79).

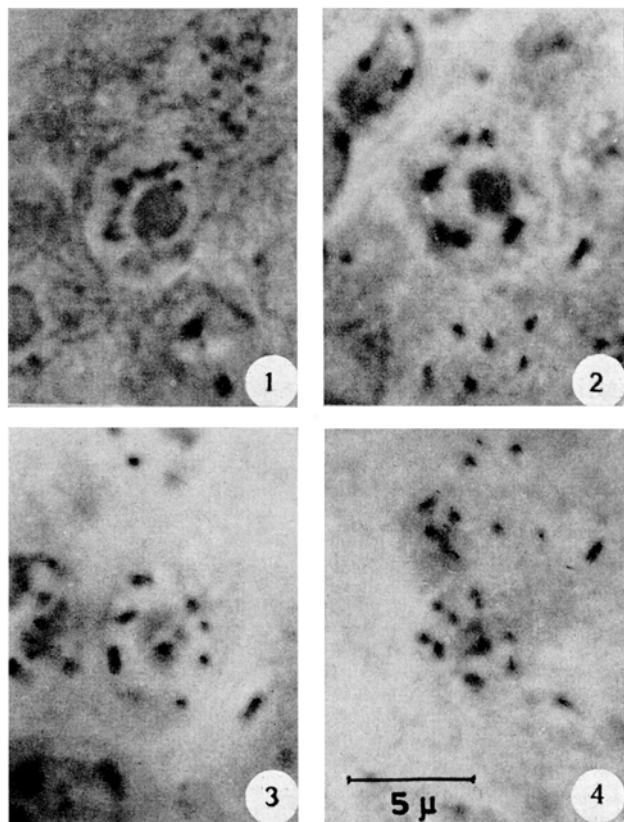


Fig. 1. Pachytene stage in the maturation of the parthenogenetic eggs of *Daphnia pulex*. Fig. 2. Late diplotene stage. Fig. 3. 'Deconjugation' or disjunction of the bivalents. Fig. 4. Chromosomes resulting from pairing and deconjugation.

Riassunto. È descritto un processo endomeiotico in *Daphnia pulex* dove la maturazione delle uova partenogenetiche veniva finora ritenuta di tipo ameiotico. L'endomeiosi e la conseguente possibilità di ricombinazione genetica mostrano la possibilità di comparsa di genotipi sessuali multipli e spiegano la riduzione della variabilità sessuale

in allevamenti di Dafnidi riprodottisi partenogeneticamente per molte generazioni.

G. BACCI, G. COGNETTI, and A. M. VACCARI

Istituto di Zoologia dell'Università di Modena (Italy), July 28, 1961.

Extraction et isolement d'une hormone placentaire à effet inhibiteur sur l'utérus¹

Le liquide amniotique prélevé sur des grossesses humaines jeunes et intactes a un pouvoir inhibiteur sur la motilité utérine de la rate, du cobaye et de la lapine. Son effet consiste dans un abaissement du tonus et dans une diminution de la fréquence et de l'amplitude des contractions spontanées de l'utérus²⁻⁴. Cette action pharmacologique particulière du liquide amniotique, confirmée récemment par CUPARENCU⁵ a pu être reproduite sur l'utérus *in situ* de la rate et de la lapine⁶⁻⁸ et sur l'utérus *in situ* de la rate portante⁹. Outre l'inhibition utérine, le liquide amniotique provoque également une hyperémie de l'utérus et des ovaires de la rate. L'origine placentaire du facteur inhibiteur et du facteur provoquant l'hyperémie des ovaires a pu être démontrée par leur production *in vitro* dans des cultures de cellules choriales¹⁰. Des travaux récents ont abouti à l'extraction et l'isolement de l'hormone en question de l'urine de femmes enceintes. La présente communication donne une description sommaire du procédé utilisé et des résultats obtenus. Pour simplifier, le facteur inhibiteur et d'hyperémie est désigné par les lettres P.P.F. (Pregnancy Protecting Factor).

(1) *Méthode d'extraction.* La préparation schématisée dans le Tableau I consiste à extraire la dite substance par précipitations répétées en milieu acide avec un solvant organique, de soumettre les précipités à des dialyses prolongées et de séparer les protéines insolubles et inactives par centrifugation. On obtient ainsi un produit purifié (U 11) titrant 1200–3400 Unités-Rat par mg de substance sèche.

(2) *Méthode d'isolement.* L'extrait U 11 est ensuite séparé en une fraction protéique inactive et en un péptide glycidique biologiquement actif. Cette séparation se fait avec le procédé suivant: On dissout 6 mg de l'extrait U 11 dans 0,3 ml d'une solution de bicarbonate de sodium à 1%. Le mélange est déposé sur une ligne droite longue de 30 cm située à 5 cm de distance du bord d'un papier filtre Whatman No. 2 (dimensions 35 × 35 cm). Chromatographie ascendante dans un solvant éthanol à 50% à la température de 4° pendant 16 h. Après que le papier ait été séché à la température ambiante, on découpe la zone de papier comprise entre les valeurs Rf 0,11–0,38 et on l'élue en chambre humide à 4° avec de l'eau distillée. L'éluat est lyophilisé, puis déminéralisé par ultra-filtration sous pression de 8 atmosphères d'un mélange gazeux composé de 95% d'oxygène et de 5% d'anhydre carbonique.

(3) *Résultats biologiques.* Le procédé indiqué fournit une substance sèche contenant par mg 25 000–50 000 U. Rate. 0,05 γ/ml de cet extrait produisent une inhibition de la motilité spontanée de l'utérus isolé de la rate en pro-oestrus. 0,01–0,025 γ de la dite substance injectée par voie intrapéritonéale à des rats femelles d'un poids de 35–45 g provoquent une hyperémie des ovaires qui se reconnaît à une coloration rouge intense et persistante des ovaires 16 h après l'injection.

(4) *Propriétés physiques et chimiques de l'hormone isolée.* La substance isolée est très soluble dans l'eau. Elle n'est

pas précipitée par l'éthanol ou l'acétone à 50%. En solution alcoolique 15–20% de l'activité biologique traversent des ultracellfiltres «feinst» (Membranfilter-Gesellschaft, Göttingen). La substance est instable dans l'eau distillée à la température ambiante et perd 80% de son activité biologique dans les 6 h. Conservée à 4° sous forme

Tab. I. Méthode d'extraction du P.P.F.

	Conditions de température
1000 ml urine congelée	– 15°
décongelée, filtrée par laine de verre	4°
+ HCl conc. –pH 3,3	
+ 4 Vol. acétone puriss.	– 15°
centrifuger	– 15°
surnageant = U 1/227	
précipité = U 2/227	
+ 50 ml H ₂ O dist.	4°
+ HCl conc. pH 3,3	
+ 4 Vol. acétone puriss.	– 15°
centrifuger	
surnageant = U 3/227	
précipité = U 4/227	
+ 75 ml H ₂ O dist.	4°
dialyse 120 h contre	4°
2000 H ₂ O dist. échangé	
toutes les 6 h	
dialysat centrifuger	
surnageant = U 5/227	
sédiment = U 6/227	
+ HCl conc. pH 3,3	4°
+ 4 Vol. acétone puriss.	– 15°
centrifuger	– 15°
surnageant = U 7/227	
précipité = U 8/227	
sécher 60 min	– 15°
+ 20 ml H ₂ O dist.	4°
dialyse 16 h contre	
2000 H ₂ O dist.	
dialysat centrifuger	
surnageant = U 9/227	
sédiment = U 10/227	4°
Lyophilisation = résidu sec = U 11/227	

¹ Ce travail a été bénéficié de l'appui du Fonds national suisse de la recherche scientifique.

² O. STAMM, *Avortements tardifs et accouchements prématurés* (Masson & Cie., Paris 1959).

³ O. STAMM et H. DE WATTEVILLE, *Gyn. et Obstr.* 53, 171 (1954).

⁴ O. STAMM, *Arch. Gynäk.* 182, 663 (1953).

⁵ B. CUPARENCU, *Zentralbl. Gynäk.* 82, 192 (1960).

⁶ O. STAMM, *Arch. Gynäk.* 184, 761 (1954).

⁷ O. STAMM, *Gynaecologia* (Basel) 136, 377 (1953).

⁸ O. STAMM, *Gynaecologia* (Basel) 135, 125 (1953).

⁹ D. DESSARZIN, Thèse No. 2741, Université de Genève.

¹⁰ O. STAMM et M. PACCAUD, *Arch. Gynaek.*, sous-pressé.