

served differences (see below) between I and the equally acid-sensitive II and III would have been obscured; it is known that an acid-catalyzed equilibrium of all four compounds is established, finally yielding the stable IV². Use of strong NaCl solution instead of HCl to decrease the rate of dissolution led to complications already observed in other instances⁸. All solutions of compounds I–IV were made $3 \times 10^{-3} M$ in benzene, except for one series of measurements carried out with a solution of I in petroleum ether (b. 30–60°). All solvents were redistilled and were found free of surface-active contaminants.

III. Results and Discussion. The results of the film-balance studies are shown in Figure 1; they demonstrate that all four compounds form condensed films. Furthermore, Figure 1 shows that the limiting area of I (52.3 Å^2) is significantly larger than that of II, III, and IV (46.3 – 47.3 Å^2)^{9,10}. Interpretation of these results is possible with the help of molecular models of the compounds. Areas per molecule, derived from Catalin models assuming the usual orientation of the molecules with their carboxyl groups towards the aqueous phase, are: for 13β -I about 70 Å^2 , for 13α in conformation IA 55.5 Å^2 and in conformation IB 48.5 Å^2 (see Figure 2). The latter value also applies to the other 'extended' conformations of compounds II–IV. Our film-balance results are compatible only with configuration 13α and conformation IA for levopimaric acid; in particular, they clearly eliminate configuration 13β .

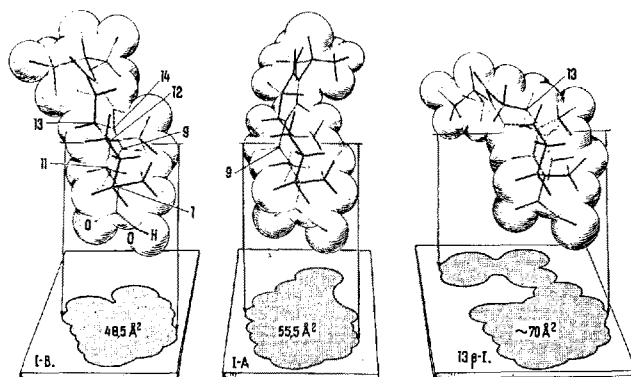


Fig. 2. Dreiding models of levopimaric acid shown in perspective with atomic radii drawn in. Shaded areas are the projections of the plane through C-9.

The cross-sectional areas quoted above and indicated in Figure 2 were derived from projections of a plane through C-9 of the oriented models. This level was chosen because study of the fit of two identical models of IA and IB suggested that this was the significant part of the molecule determining the closest possible packing. In levopimaric acid, it appears that it is the indirect influence of the conformation of ring C on C-9 rather than this conformation itself which determines the space requirements of the molecule (see Figure 2). In particular, it seems that the larger area of I, compared to that of the other compounds, results from the fact that the hydrogen on C-9 protrudes markedly in IA only and prevents the close packing possible with the other models (see Figure 2).

We feel that our results support the assumption that levopimaric acid has the 13α -configuration and exists, at least to a substantial extent, in conformation IA¹¹.

Zusammenfassung. Monomolekulare Oberflächenfilme von Lävopimarsäure (I) und von drei nahe verwandten Harzsäuren wurden mit Hilfe einer Methode untersucht, welche gestattet, den Einfluss der ausgesprochenen Wasserlöslichkeit dieser Substanzen auszuschalten. Die erhaltenen Resultate beweisen eine Sonderstellung von I, die mit einer früher auf Grund der Rotationsdispersion angenommenen «gewinkelten» Konstellation in Einklang steht.

U. WEISS and N. L. GERSHFELD

Laboratory of Physical Biology, National Institute of Arthritis and Metabolic Diseases, National Institutes of Health, Bethesda (Maryland, U.S.A.), May 21, 1962.

⁸ A. R. GILBY and E. HEYMANN, Australian J. Sci. Res., Series A, 5, 160 (1952).

⁹ The larger surface area of I cannot be due to a specific incorporation of benzene into the film¹⁰, since substitution of petroleum ether for benzene as the solvent had no influence upon the results (see Figure 1).

¹⁰ M. L. ROBBINS and V. K. LA MER, J. Colloid Sci. 15, 123 (1960).

¹¹ We are indebted to Drs. R. V. LAWRENCE and W. H. SCHULLER, Naval Stores Research Laboratories, Olustee (Florida), and to Professor A. W. BURGSTALLER, University of Kansas, for the samples of rosin acids used in this study.

Létalité et anomalies du développement embryonnaire dans la descendance des femelles triploïdes de l'Amphibien Urodèle *Pleurodeles waltlii*

Michah

Une descendance aneuploïde d'Urodèles triploïdes a été obtenue pour la première fois par FANKHAUSER et HUMPHREY^{1,2}, chez l'*Axolotl*, puis par KAWAMURA³ chez *Triturus pyrrhogaster*. Les résultats de ces auteurs concernent essentiellement des croisements du type $\text{♀}3n \times \text{♂}2n$, car les mâles triploïdes de ces deux espèces sont quasi-stériles et les croisements $\text{♀}2n \times \text{♂}3n$ n'ont pu être effectués qu'après fécondation artificielle et sacrifice des progéniteurs. Au contraire, dans le cas du *Pleurodèle* ($2n = 24$), un certain nombre de mâles triploïdes sont pleinement féconds et on a pu réaliser pour la première fois chez les Vertébrés, par accouplements spontanés, des

croisements $3n \times 3n$, ainsi qu'un grand nombre de croisements $\text{♀}2n \times \text{♂}3n$ (GALLIEN et BEETSCHEN⁴; BEETSCHEN⁵).

Les résultats obtenus initialement chez l'*Axolotl*^{1,2}, ont permis de définir un syndrome hyperdiploïde affectant la quasi-totalité des larves obtenues, et incompatible avec une survie prolongée au-delà de l'éclosion, sauf pour quelques individus faiblement aneuploïdes ($2n + 1$, $2n + 2$, $2n + 3$). Ce syndrome aneuploïde affecte aussi les

¹ G. FANKHAUSER et R. R. HUMPHREY, J. exp. Zool. 115, 207 (1950).

² G. FANKHAUSER et R. R. HUMPHREY, J. exp. Zool. 126, 33 (1954).

³ T. KAWAMURA, J. Sci. Hiroshima Univ., Ser. B, Div. 1, 12, 1 (1951).

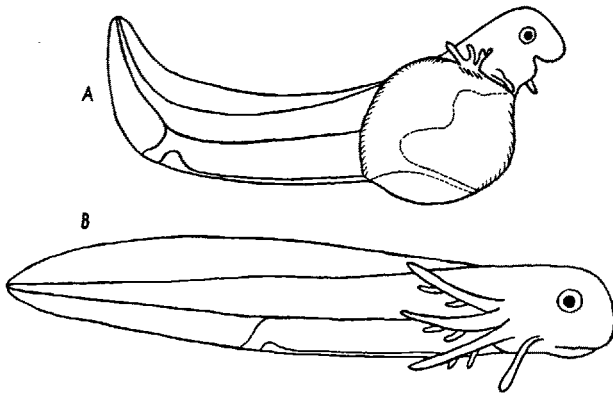
⁴ L. GALLIEN et J. C. BEETSCHEN, C. R. Acad. Sci. 248, 3618 (1959).

⁵ J. C. BEETSCHEN, Bull. Biol. Fr. Belg. 94, 12 (1960).

descendants de progéniteurs triploïdes chez le Pleurodèle (Figure).

Nous envisagerons ici les résultats de croisements $23n \times \delta 3n$ comparés à ceux de croisements $\varphi 3n \times \delta 2n$, réalisés alternativement avec les mêmes femelles triploïdes, et nous considérerons en particulier l'aspect embryologique des phénomènes, sans nous attacher ici aux caractères des rares individus aneuploïdes qui ont pu survivre après l'éclosion. Signalons seulement qu'une vingtaine d'entre eux, malgré divers troubles de croissance, ont pu vivre plusieurs mois, parfois plus d'un an, et atteindre ou dépasser le stade de la métamorphose.

Chez le Pleurodèle, les $\varphi\varphi$ triploïdes ont, dans l'ensemble, une fécondité inférieure à celle des $\varphi\varphi$ diploïdes normales, et leurs ovaires sont réduits⁶. Certaines d'entre elles ont cependant émis plusieurs centaines d'œufs à chaque fois. Mais la première ponte, possible dès l'âge de 18 mois pour une femelle diploïde, n'a été obtenue qu'après 3 à 4 ans dans 5 cas sur 7; deux autres $\varphi\varphi$ ont pondu peu après 2 ans, mais d'autres n'ont pas encore émis d'œufs après plus de 4 ans.



Larves de 11 jours. (A) Larve aneuploïde provenant d'un croisement $3n \times 3n$; forte microcéphalie, branchies atrophiées, ascite dans la région cardiaque, lordose, queue réduite. (B) Témoin diploïde du même âge (stade 34).

Le Tableau I résume l'ensemble des résultats obtenus avec 5 $\varphi\varphi$ triploïdes, croisées alternativement avec des $\delta\delta$ triploïdes et diploïdes, et ayant fourni au total 15 pontes groupant 5392 œufs. Une durée de 8 mois au moins a séparé deux accouplements avec des mâles de ploïdie différente; à plusieurs reprises l'émission spontanée d'œufs non fécondés, précédant l'accouplement, a constitué d'ailleurs une preuve de l'absence de spermatozoïdes résiduels dans les voies génitales femelles.

Diverses notions se dégagent de l'examen du Tableau I. Dans l'ensemble, la mortalité précoce, avant le stade 22 (début du bourgeon caudal)⁷, est deux fois plus élevée pour les croisements $3n \times 3n$, où elle n'a jamais été inférieure à 10%, mais presque toujours supérieure à 20% des œufs pondus, que pour les croisements $3n \times 2n$, où elle peut descendre à 6% et n'a atteint qu'une seule fois 22%.

Aux stades du bourgeon caudal (st. 22 et suivants), et jusqu'à l'âge correspondant à l'éclosion pour un germe normal (st. 34, 11 j. à 18°C)⁷, la mortalité des embryons issus des croisements $3n \times 2n$ a varié très fortement selon les pontes, et sans rapport avec la mortalité aux stades précoces. En effet pour 4 pontes des $\varphi\varphi$ 56-1 et 56-2, la mortalité précoce a été du même ordre (6 à 8%); la mortalité ultérieure est restée faible dans le cas des 2 pontes de la φ 56-1 (10 à 12%) mais a été considérable dans les 2 pontes de la φ 56-2 (56 à 70%), le maximum pour l'ensemble de nos résultats ayant été atteint à cette occasion. Dans l'ensemble cependant, le taux de mortalité aux stades avancés reste beaucoup plus faible que pour les pontes issues des croisements $3n \times 3n$, où il n'est jamais inférieur à 20% du total des germes, fréquemment supérieur à 50%, et pouvant même atteindre 80%.

Les croisements $3n \times 3n$ ayant correspondu dans 4 cas sur 5 aux premières pontes de $\varphi\varphi$ vierges, on peut penser que la qualité des œufs était responsable de cet accroissement de mortalité. Mais, si certains éléments semblent favorables à cette interprétation (pontes de la φ 56-2), d'autres ne l'appuient pas (φ 58-2) et un plus grand

⁶ L. GALLIEN, J. Embryol. exp. Morph. 7, 380 (1959).

⁷ L. GALLIEN et M. DUROCHER, Bull. Biol. Fr. Belg. 91, 97 (1957).

Tab. I

Protocole des croisements			Nombre d'œufs pondus (100%)	Nombre et % de germes vivants		% de mortalité embryonnaire		Total
$\varphi 3n$	Date	δ		Au stade 22 ^a Nombre	Age de l'éclosion %	St. 0 à 21	St. 22 à 33	
56-0	15 II 60	$3n$ (57-6)	347	273	78,6	86	25	75
	20 III 62	$2n$ (59-1)	161	140	86,9	130	80,7	19,3
56-1	10 II 59	$3n$ (57-7)	259	229	88,4	20	7,7	92,3
	20 I 60	$2n$	319	255	80	149	46,7	53,3
	10 IV 60	$2n$	659	619	94	541	82	18
	11 XI 61	$2n$	208	193	92,7	172	82,7	17,3
56-2	26 I 59	$3n$ (56-1)	207	147	71	29	14	86
	8 X 59	$2n$	250	230	92	90	36	64
	15 II 60	$2n$	430	401	93,2	98	22,7	77,3
	5 XII 60	$3n$ (58-3)	577	449	77,8	333	57,7	42,3
56-4	10 II 60	$3n$ (56-1)	183	111	60,6	63	34,4	65,6
	5 II 62	$2n$	308	240	77,9	161	52,2	47,8
58-2	17 I 61	$2n$	844	719	85,2	552	65,4	34,6
	16 XII 61	$3n$ (56-1)	402	257	63,9	93	23,1	76,9
	26 I 62	$3n$ (56-1)	238	183	76,8	80	33,6	66,4
Totaux	$\varphi 3n \times \delta 2n$		3179	2797	87,9	1893	59,5	40,5
	$\varphi 3n \times \delta 3n$		2213	1649	74,5	704	31,8	68,2

^a La table chronologique des stades du développement est celle de GALLIEN et DUROCHER⁷.

nombre de croisements permettra seul d'éclaircir la question. En tout cas, la viabilité des embryons aneuploïdes semble beaucoup plus élevée dans la descendance de certaines ♀♀ (56-1 par exemple). Des résultats du même ordre, mettant en évidence le rôle de la constitution maternelle dans l'expression du syndrome aneuploïde, ont d'ailleurs été obtenus dans le cas des croisements ♀ 2n × ♂ 3n et feront l'objet d'une publication détaillée.

Les caractères de ce syndrome aneuploïde sont un peu différents pour les deux types de croisements réalisés à partir des ♀♀ 3n. Pour les croisements ♀ 3n × ♂ 2n, les diverses anomalies observées correspondent à celles décrites chez l'*Axolotl*^{1,2}. Les troubles de la morphogenèse se sont généralement manifestés à la neurulation et aux stades 21–22, c'est-à-dire plus précocement que dans le cas des croisements inverses (♀ 2n × ♂ 3n), où les embryons sont parfois normaux jusqu'au stade 28.

Dans le cas des croisements 3n × 3n, ces troubles sont beaucoup plus précoces (parfois dès la gastrulation), plus accentués et on observe deux phénomènes caractéristiques: (a) une inhibition beaucoup plus fréquente de la croissance du bourgeon caudal; (b) une courbure du corps dans le plan sagittal, également beaucoup plus fréquente. En outre les branchies sont plus fréquemment hypodéveloppées ou totalement atrophiées, la circulation est plus déficiente, l'ascite est plus répandue et les nécroses superficielles sont très fréquentes (Tableau II). Le détail des pourcentages des divers caractères du syndrome aneuploïde n'a pu être établi que pour les 5 pontes intégrées dans le Tableau II, mais la comparaison des résultats des deux types de croisements obtenus avec la même ♀ (58-2) est déjà significative.

Dans la descendance de progéniteurs tous deux triploïdes, les formules chromosomiques aneuploïdes sont certainement beaucoup plus diversifiées que dans l'autre type de croisements (3n × 2n), les gamètes des deux sexes étant tous ici hyperhaploïdes. Les numérations exactes sont pratiquement impossibles sans techniques spéciales, mais beaucoup d'embryons sont nettement hypertriploïdes. Il est certain en tout cas que l'accentuation du déséquilibre chromosomique est à l'origine de l'accroissement de la mortalité et des désordres morphogénétiques observés dans ce cas. La phase de différenciation histologique et fonctionnelle apparaît, à cet égard, beaucoup plus sensible à l'aneuploïdie que ne le sont les phases pré-

cédentes. La même différence de sensibilité phasique peut aussi s'observer, avec plus de netteté encore, dans le cas des croisements ♀ 2n × ♂ 3n.

L'étude histologique et cytologique des germes aneuploïdes létaux a été entreprise essentiellement sur des embryons provenant de croisements 3n × 3n. Une cinquantaine d'embryons, fixés au Zenker ou au Helly, ont été coupés et colorés au vert de méthyle-pyronine ou au Feulgen. Leurs anomalies principales portent sur la constitution des dérivés ectodermiques, bien que tous les organes soient atteints à divers degrés. Le système nerveux a une structure fréquemment dyssymétrique à différents niveaux. On y observe parfois des épaississements localisés ou, au contraire, une dilatation du canal de l'épendyme et un amincissement de la paroi du tube neural dans lequel se détachent des éléments en cytolyse. Les différentes parties de l'encéphale sont souvent très difficiles à distinguer les unes des autres. On y observe des cellules pycnotiques en nombre variable, parfois très élevé, mais même dans ce cas les mitoses peuvent encore être abondantes. Les vésicules sensorielles sont également lésées. L'épiderme a une épaisseur inégale et est souvent papilleux. De telles anomalies avaient déjà été observées sur les germes aneuploïdes obtenus après réfrigération d'œufs insegmentés et dont la différenciation n'avait pu s'effectuer qu'en parabiose⁵.

Les somites sont, eux aussi, souvent dyssymétriques et réduits unilatéralement, avec agénésies locales. Ils peuvent être déprimés par l'ascite sous-cutanée. La chorde présente un aspect très variable. Sa section est fréquemment irrégulière et le diamètre en est souvent inégal, avec dilations ou rétrécissements locaux. Elle peut être raccourcie vers l'avant. La structure du pronéphros montre des tubules dilatés ou au contraire à lumière étroite. Le cœur est très fréquemment hypoplasie. L'aspect des lames latérales est souvent irrégulier. La masse intestinale, chargée de vitellus dont la résorption complète n'est jamais réalisée, présente elle-même des cellules nécrosées.

Au niveau cellulaire, on note partout la présence de noyaux pycnotiques isolés ou en amas, et de cellules mélanisées en cytolyse. Dans l'ensemble, tous les organes peuvent être atteints par les pycnoses mais le système nerveux est particulièrement lésé dans certains cas. L'activité mitotique ne paraît cependant pas ralentie dans le névraxe de certains embryons, mais les mitoses aneu-

Tab. II. Principaux caractères du syndrome aneuploïde chez les survivants, à l'éclosion, de 5 pontes issues de 4 femelles triploïdes

	Pourcentage selon les pontes							
	3n × 2n				3n × 3n			
♀ et date de la ponte	56-4	5 II 62	56-1	11 XI 61	58-2	17 I 61	58-2	16 XII 61
Microcéphalie	90		93		75		99	
Microphthalmie	96		95		95		99	
Branchies								
normales ou peu anormales	14		21		29		5	
dilatées	13		18		16		4	
réduites ou atrophiées	73		61		54		91	
Circulation branchiale								
normale	3		18		20		3	
défectueuse	35		26		25		22	
nulle	62		56		55		75	
Stases sanguines et hématomas *	39		56		67		32	
Ascite en divers points	69		67		54		78	
Nécroses superficielles	14		27		26		61	
Torsion sagittale du corps (lordose)	15		12		15		48	
Malformations caudales	31		41		47		79	

* Dans ce cas particulier, les pourcentages les plus faibles, dans des pontes d'autre part très anormales, s'expliquent par un retard général dans l'établissement de la circulation sanguine.

pléides sont fréquemment anormales (perte ou non-disjonction de chromosomes). L'un de nous a déjà signalé la présence dans l'épiderme, chez certaines larves aneuploïdes, de mitoses ségrégatives accentuant le degré d'aneuploïdie initial^{4,5}. Il ne semble pas, cependant, que ces mitoses soient également fréquentes dans les diverses pontes et ici encore l'hérédité maternelle paraît jouer un rôle déterminant dans la fréquence de leur apparition (BEETSCHEN, FAURIE et LE ROUX, inédit). Nous n'en avons observé que très rarement dans les tissus des embryons appartenant aux deux pontes étudiées en détail.

Les nucléoles des noyaux interphasiques ont une morphologie souvent altérée; ils sont fréquemment vacuolaires et hétérogènes. La synthèse de l'ARN y est sans doute perturbée par l'aneuploïdie. D'autre part on peut

observer dans certains cas l'extrusion de nucléoles entiers dans le cytoplasme, où ils dégénèrent probablement.

Summary. A comparison is made between aneuploid offsprings of triploid females mated with diploid or triploid males of *Pleurodeles waltlii*. In the latter case, embryonic lethality is raised, and abnormalities are more severe. The disturbances affect morphogenesis, embryonic growth and physiological differentiation. At the cellular level, nuclear and nucleolar degenerative changes are conspicuous.

J. CL. BEETSCHEN et S. PAYET

Laboratoire de Biologie Générale, Faculté des Sciences, Toulouse (France), le 10 mai 1962.

Histochemical Localisation of β -Glucuronidase in Healing Wounds of the Natterjack Toad *Bufo calamita*

It is a well-known fact that β -glucuronidase is related to cell proliferation and the formation of connective-tissue ground-substance. This enzyme has been demonstrated in the basal layers of the oral mucous membrane and the epidermis, the blood vessels of the normal corium, in healing wounds of the skin of the back, the tongue and the palate of the rat¹⁻³, and in healing wounds of the dorsal skin and the tongue of the common iguana and the axolotl⁴. In continuation of this investigation we have examined the activity of β -glucuronidase in healing wounds of the dorsal skin and the tongue of the toad *Bufo calamita*, the animals being killed after 4, 8, 15, 22, 32 and 40 days. After excision of the wound with an extensive zone of normal surrounding tissue and fixation in formalin/chloral hydrate, the enzymatic activity was determined by the method of FISHMAN and BAKER⁵ on frozen sections with different incubation times.

In the superficial necrotic band of the connective tissue in the 4-day specimens a negative reaction was found, whereas immediately beneath this negative zone there was an intensely positive zone due to the presence of inflammatory exudate, and particularly leucocytes.

As healing of the wounds progressed, the fibroblastic proliferation zone reacted moderately but consistently. The histiocytes and giant cells appeared to react more in-

tensely. In the 22-day specimens the epidermis, which had proliferated over the margins of the wound, exhibited a significant increase in enzymatic activity.

In the light of these results we conclude that epithelial proliferations is closely related to β -glucuronidase activity. In connective-tissue this enzyme is associated with tissue formation. As these results correspond with those obtained in the rat¹, the common iguana and the axolotl⁴, more extensive significance must no doubt be attached to the β -glucuronidase.

Zusammenfassung. Histochemischer Nachweis von β -Glukuronidase bei der Wundheilung der Kröte *Bufo calamita*.

A. STOLK

Department of Histology, Free University, Amsterdam (The Netherlands), May 9, 1962.

¹ R. L. CABRINI and F. A. CARRANZA, *Naturwiss.* **45**, 533 (1958); **48**, 131 (1961); *Arch. oral Biol.* **2**, 28 (1960).

² A. M. SELIGMAN, K. C. TSOU, S. H. RUTENBURG, and R. B. COHEN, *J. Histochem. Cytochem.* **2**, 209 (1954).

³ O. BRAUN-FALCO, *Arch. klin. exp. Derm.* **203**, 61 (1956).

⁴ A. STOLK, *Lancet* **1961**, 144; *Nature*, in press (1962).

⁵ W. H. FISHMAN and J. R. BAKER, *J. Histochem. Cytochem.* **4**, 570 (1956).

The Biogenesis of Helminthosporal

The isolation¹ and elucidation of the structure² of the fungal toxin helminthosporal (1) from *Helminthosporium sativum* has recently been reported. This toxin, which is responsible for considerable losses in cereal production, is a sesquiterpenoid, but the structure, though derived from three isoprene units, cannot be formed by the cyclisation of a farnesyl type precursor. This phenomenon, although comparatively uncommon, is not unknown and led Ruzicka to propose the biogenetic isoprene rule wherein the derivation from a farnesyl precursor may be followed by subsequent, and consequently biogenetically trivial, chemical steps³. The classic instance of this, is eremophilone, a concluding biogenetic step being a methyl migration. An-

other mode of transformation from a farnesyl precursor in the sesquiterpenoids is found in the genesis of elemol, where a Cope rearrangement has been proposed⁴.

Neither of these schemes appears to be relevant to the biogenesis of helminthosporal. Inspection of the structure suggested that the substance might be derived from a precursor such as (2) (itself derivable from farnesyl cycli-

¹ P. DE MAYO, E. Y. SPENCER, and R. W. WHITE, *Can. J. Chem.* **39**, 1608 (1961).

² P. DE MAYO, E. Y. SPENCER, and R. W. WHITE, *J. Amer. chem. Soc.* **84**, 494 (1962).

³ L. RUZICKA, *Exper.* **9**, 357 (1953); *Proc. chem. Soc.* **1951**, 341.

⁴ J. B. HENDRICKSON, *Tetrahedron* **7**, 82 (1959).