

cell types have been found in the ganglion tissue, labelled: small, large, with a filamentous expansion, giant, elongated (Figure 3). The 4th and the 5th types have been observed only in some cultures. All types seem to correspond to cells already existing when the ganglia are still *in situ*.

The frequency of small cells released is different between stocks only at the end of the 1st and of the 3rd week: since the other cell types are very rare, their behaviour has not been considered.

If one tries to synthesize the differential behaviour of the three stocks, the following description can be proposed:

Stocks	Degree of dissolving of the ganglion	Amount of cells liberated	Total number of cells adhering to coverslip (in cultures)
Varese	++++	++ + + +	34.718
Aspra 52	++	++	15.279
S. Maria	+	+ +	19.176

The relationship between released cells and disintegration of the ganglion is obvious only in Varese.

Also the nervous cells adhering to the coverslip show an overall acidophilia, denoting an abnormal functional state, but some rare mitotic stages have been observed.

**Discussion.** The facts referred to should require for evaluation the demonstration that they are not artefacts but true biological manifestations. Unfortunately, it is impos-

sible at present to assert that releasing of cells is only due to an active cell migration and that all stained cells are functionally normal. Indeed, attachment to the coverslip, which is a general phenomenon, and the rare mitoses prove that at least an aliquot of cells is still living *in vitro*. Although a component of artefact is certainly present in our slides, nevertheless it seems justified to conclude that the stocks (i.e. the different genotypes) analysed so far, show a high repeatability while different stocks behave differently. Thus, one may conclude that the technique of tissue culture reveals phenotypic differences at the cellular level which are not detectable with other means, and is suitable for further genetical analysis<sup>3</sup>.

**Riassunto.** Sono stati coltivati in identica condizione gangli nervosi e ghiandole della linfa di diversi ceppi di *Drosophila*, differenti genotipicamente. Si sono notate diverse peculiarità di comportamento che - sebbene in parte forse artefatti - denotano l'esistenza di differenze fra il fenotipo, che risulta così analizzato a livello cellulare. Il metodo sembra adatto a ulteriori analisi del fenotipo, in rapporto a genotipi diversi.

M. C. CASTIGLIONI and G. REZZONICO RAIMONDI

Istituto di Genetica dell'Università di Milano (Italy),  
May 20, 1963.

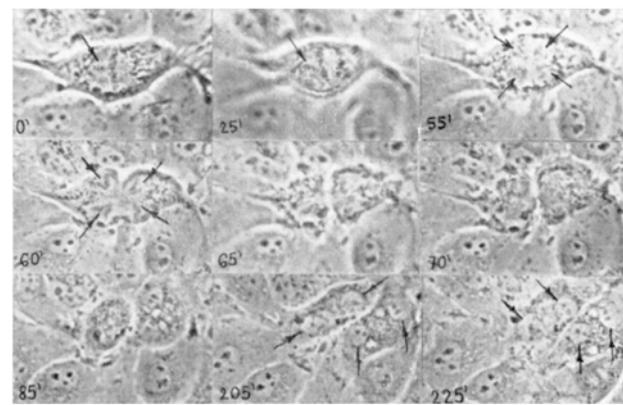
<sup>3</sup> This investigation was supported financially by the Rockefeller Foundation N.Y.

### Beobachtung der Bildung zweikerniger Zellen aus einer Zelle der Gewebekultur ohne experimentellen Eingriff

Die Bildung zweikerniger Zellen wird grundsätzlich auf zwei Arten erklärt: entweder durch amitotische Teilung des Kernes ohne Cytodierese, oder durch eine Mitosestörung; 1954 haben SCHLEICH und MAYER<sup>1</sup> die Bildung einer zweikernigen fibroblastischen Zelle durch Adrenalin-Einfluss beschrieben. Wir haben in fixierten und gefärbten Kulturen eines stabilisierten Seitenstammes der PK-Zellen auffallend grosse Mengen von multipolaren Mitosen und mehrkernigen Zellen gefunden, deren Ursprung wir nicht feststellen konnten. Weitere, von uns beschriebene Beobachtungen am lebenden Material könnten die Bildung eines gewissen Teiles dieser Anomalien erklären.

Die PK-Zellen wurden unter gewöhnlichen Bedingungen in Medium nach Earle mit Zugabe von 20% inaktiviertem Kalbsserum und anderen Komponenten (0,001 Phenolrotlösung und Penicillin mit Streptomycin) auf Deckgläsern in Petrischalen gezüchtet. Nach der 24–48 h dauernden Züchtung wurden die Gläser in die Maximowschen Kamern eingesetzt, im Phasenkontrastmikroskop Reichert (Obj. 70:1, Ok. 15×) bei einer Temperatur von 38°C beobachtet und in 5 min Intervallen photographiert.

Die erste Aufnahme (zur Zeit 0) zeigt ein Monaster, aus welchem senkrecht auf die äquatoriale Achse etliche Chromosomen absteigen. Diese Bildung nimmt eine Ypsilonform an (25 min). In der Anaphase teilen sich die Chromosomen in vier Gruppen (Zeit 55 min – siehe Pfeile). Am Anfang der Telophase (60 min nach dem Beginn der Beobachtung – siehe Pfeile) ist zu beobachten, dass jeweils Zweiergruppen von Chromosomen in eine Tochterzelle ge-



langen. Die sich nachträglich bildende Spaltung hält die Zelle wobei jeder Teil zwei gut sichtbare Kerne mit entwickelten Kernkörperchen enthält (Zeit 205 min und 225 min, die Kerne sind mit Pfeilen bezeichnet).

Unsere Beobachtung zeigt, dass die Bildung von zweikernigen Zellen durch eine Störung der Mitose ohne Änderung der Kultivationsbedingungen möglich ist. Es ist auch wahrscheinlich, dass in den Zellen stabilisierter Zellstämme die lange *in vitro* gezüchtet wurden, dieser Mechanismus häufig ist, ebenso wie bei entgegengesetzten Verfahren, wobei aus mehrkernigen Zellen mitotisch wieder

<sup>1</sup> A. SCHLEICH und A. MAYER, Z. Krebsforsch. 60, 47 (1954).

soviel Zellen entstehen, entsprechend den Kernen der ursprünglichen Formation<sup>2</sup>. Die Ursachen dieser ungewöhnlichen Zellteilung in Gewebekulturen konnten vorerst noch nicht entdeckt werden.

**Summary.** The author reports on the development of two binuclear cells from one PK cell dividing mitotically, which, by its aberrant chromosomes, recalls tripolar mitosis. He believes that this process is not an exception and that it may be used for the explanation of the develop-

ment of a certain part of binuclear cells frequently found in stabilized strains.

V. PŮŽA

*Institut für allgemeine Biologie der Karlsuniversität, Hradec Králové (Tschechoslowakei), 29. Mai 1963.*

<sup>2</sup> D. FALKE und I. E. RICHTER, Naturwissenschaft. 16, 187 (1961).

### Extensives Größenwachstum larvaler Speicheldrüsenchromosomen von *Drosophila melanogaster* im Adulstmilieu

Die Riesenchromosomen in den larvalen Speicheldrüsen der Dipteren wachsen vor allem während des letzten Larvenstadiums kontinuierlich zur bekannten Endgrösse heran. In der Vorpuppe kommt dieser Prozess zum Stillstand, da in der Metamorphose die Speicheldrüse aufgelöst wird.

Erfahrungen an larvalen Imaginalscheiben haben uns gezeigt, dass diese Primordien als Implantate im Abdomen von adulten Weibchen sehr stark wachsen (URSPRUNG<sup>1</sup>, HADORN<sup>2</sup>, SCHLÄPFER<sup>3</sup>). Bei dieser Zellvermehrung kann der larvale Differenzierungszustand dauernd erhalten bleiben (HADORN, unveröffentlicht). In Transferserien konnten solche Zellstämme nun während zehn Monaten *in vivo* kultiviert werden. Eine Einschränkung der Proliferationspotenz ist bis heute nicht festzustellen. Dabei vermehrt sich die Zellzahl eines transferierten Fragmentes je in zwei Wochen bis auf das Fünfzigfache.

Nach diesen Ergebnissen musste interessieren, ob auch larvale Speicheldrüsenzellen weiterwachsen. Da die Teilungsfähigkeit dieser Zellsysteme bereits embryonal zum Stillstand kommt, müsste sich hier das Wachstum lediglich in einer Zunahme der Zellgrösse und der Chromosomengrösse (Polytaeniegrad) manifestieren. Im besonderen war zu prüfen, ob «über grosse» Riesenchromosomen erzielt werden können, wenn die Speicheldrüse jenen Einflüssen entzogen wird, die zu Beginn der Metamorphose ihren Zerfall bedingen.

Larvale Speicheldrüsen des frühen 3. Larvenstadiums (72 h nach Eiablage bei 25°) werden in die Abdomina von unbefruchteten adulten *white*-Weibchen implantiert. In diesem Stadium sind die Chromosomen noch recht klein (Figur a). In einigen Tagen erreichen sie im Adulwtzt zunächst regelmässig die bisher bekannte Endgrösse, wie sie in der Vorpuppe (Figur b) maximal möglich ist. Bei längerer Kulturdauer (21 Tage) nehmen die Chromosomen nach Länge und Dicke Dimensionen an, die deutlich das in einer Vorpuppe verwirklichte Ausmass übertreffen. Solche «über grosse Chromosomen» sind in der Figur (c) gezeigt. Das Wachstum wird jedoch nicht unbegrenzt fortgesetzt. Nach einer Kulturdauer von 14 Tagen zeigen sich die ersten Anzeichen der Histolyse im distalen Teil der Drüse. Das Cytoplasma wird hier opak, und die Kerne beginnen zu degenerieren. Die Chromosomen zerfallen in feinste Chromatinkörper. In einigen Fällen ist es aber gelungen, die Kultur *in vivo* bis auf 50 Tage auszudehnen, indem das Implantat auf einen zweiten Wirt übertragen wurde. Durch diese Manipulation, wie auch durch die Histolyse, geht allerdings der grösste Teil der

Zellen zugrunde. In einzelnen Kernen konnten jedoch nach 50 Tagen noch intakte, allerdings gequollene Chromosomen beobachtet werden (Figur d).

Damit ist entgegen früheren Befunden (BODENSTEIN<sup>4</sup>) gezeigt, dass im Adulstmilieu ein vollständig normales – allerdings verlangsamt – Wachstum der larvalen Speicheldrüsenzellen erfolgt, wobei die chromosomale Polytaenie ebenso zunimmt wie im larvalen Normalmilieu und wahrscheinlich noch darüber hinausgeht. Die von BODENSTEIN verwendeten ♂-Wirte stellen offenbar auch für Speicheldrüsenimplantate das «schlechtere Kulturmedium» dar als unsere *white*-♀.

Die kultivierten Speicheldrüsen enthalten neben den larvalen Riesenzellen noch den sogenannten Imaginalring: Hier sind am Ausgang der beiden Drüsenschinkel je 200–240 sehr kleine und kleinkernige Zellen dichtgepackt vereinigt. Im Adulstmilieu vermehren sich diese Zellen, wobei ihr larvaler Charakter unverändert erhalten bleibt. So fanden wir z. B. in einer während 28 Tagen kultivierten Drüse eine Erhöhung der Zellzahl bis auf 700.

Die bisherigen Befunde erlauben kein abschliessendes Urteil über die Natur der erreichten «über grossen» Chromosomen. So wissen wir nicht, ob und in welchem Ausmass der Polytaeniegrad die bekannte Norm übertrifft. DNS-Messungen wären hier angezeigt. Ein Teil der Grössenzunahme mag auf Quellung beruhen, doch spricht die klare Persistenz der Bänderstruktur eher gegen ein blosses Quellungs-wachstum. Hervorgehoben sei sodann die Beobachtung, dass die einzelnen Zellen einer kultivierten Drüse ausserordentlich verschieden auf das Adulstmilieu ansprechen, indem bei weitem nicht alle Chromosomensätze das «Riesenformat» erreichen.

Auf das Verhalten der Puffs möchten wir hier nicht eingehen, da uns die notwendigen Erfahrungen fehlen. Immerhin sei vermerkt, dass einzelne für das Vorpuppenstadium charakteristische Puffs (BECKER<sup>5</sup>) bei längerer Kultur zurückgehen.

Ein interessantes Problem stellt die mit starker Ver-spätung auftretende Histolyse der Implantatsdrüsen dar. Es bieten sich folgende Erklärungsmöglichkeiten: Entweder erfolgt die Histolyse autonom, d.h. sie wird durch zellinterne Faktoren verursacht oder dann enthält das Adulstmilieu noch geringe Mengen von Wirkstoffen, die die Histolyse erst nach 14 Tagen auszulösen vermögen.

<sup>1</sup> H. URSPRUNG, Develop. Biol. 4, 22 (1962).

<sup>2</sup> E. HADORN, Develop. Biol. 7, 617 (1963).

<sup>3</sup> T. SCHLÄPFER, Roux' Arch. Entw. 154, 378 (1963).

<sup>4</sup> D. BODENSTEIN, Biol. Bull. 84, 13 (1943).

<sup>5</sup> H. J. BECKER, Chromosoma 13, 341 (1962).