

genized lightly by means of a glass rod and pressed through an 80 mesh stainless steel grid that had been fitted to the bottom of a stainless steel homogenizer. The tissue pulp was collected in a centrifuge tube containing 5 ml medium. The egg shells were allowed to settle to the bottom of the centrifuge tube, the suspension containing the cells and tissues was collected, centrifuged at 800 rpm for 3 min, washed three times and then seeded either in Leighton tubes or in Porter flasks. Various vertebrate and invertebrate tissue culture media were tested either alone or in combinations.

Good results were obtained in TRAGER's modified insect tissue culture medium<sup>2</sup>, where in addition to the altered

salt composition the yeast extract was substituted by the vitamins of EAGLE's medium<sup>3</sup>. MORGAN'S 199 vertebrate tissue culture medium<sup>4</sup> alone also supports cell proliferation, but the cells are not healthy looking and resemble mostly filamentous forms. However, this medium, in combination with TRAGER's modified medium or with the medium formulated by KITAMURA<sup>5</sup> for the cultivation of ovarian tissues from *Culex pipiens* var. *molestus*, gave the most satisfactory results so far. In these media, enriched with 2% chick embryo extract, new transparent cells were seen to appear on the third or fourth day. By the fifth or sixth day whole microscopic fields were seen to be covered with new cells and many mitotic figures could be demonstrated. Figure 1 shows a 10-day-old culture grown in Leighton tube, and Figure 2 is the same after being stained with Giemsa. The medium was changed usually once in 4 days. Cultures were maintained in good condition for over 3 weeks<sup>6,7</sup>.

Preliminary results obtained from virological studies in these cells indicate that they support the proliferation of WN virus.

**Résumé.** Des tissus et cellules d'embryos d'*Aedes aegypti* ont été cultivés dans des milieux de culture pour tissus des insectes contenant aussi le milieu MORGAN 199 pour cellules-vertébrés. On peut observer, au commencement du troisième jour, des cellules transparentes nouvelles et formes mitotiques. Les cultures sont restées en bon état pendant plus de trois semaines.

J. PELEG

*Israel Institute for Biological Research, Ness-Ziona (Israel), February 21, 1966.*

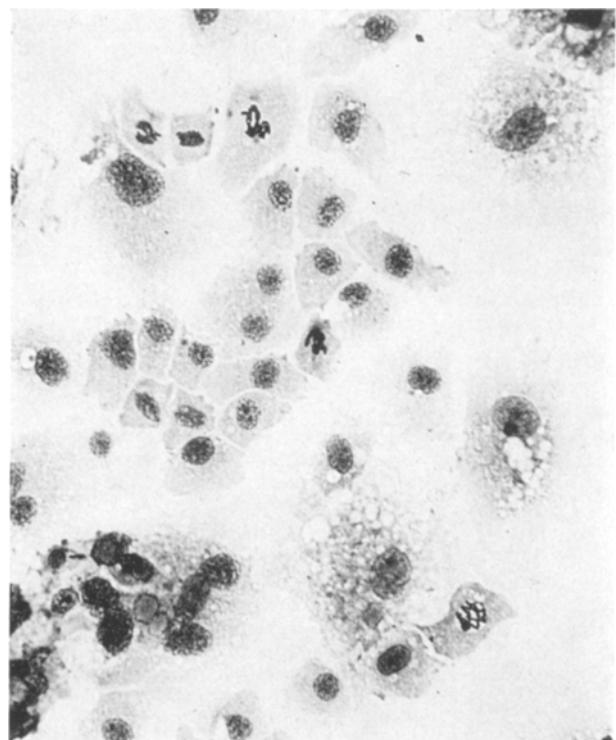


Fig. 2. Mitotic figures in 10-day-old culture ( $\times 400$ ).

<sup>2</sup> W. TRAGER, Nature 184, B.A. 31 (1959).

<sup>3</sup> H. EAGLE, J. exp. Med. 102, 595 (1955).

<sup>4</sup> J. F. MORGAN, H. J. MORTON, and R. C. PARKER, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 73, 1 (1950).

<sup>5</sup> S. KITAMURA, Kobe J. med. Sci. 11, 23 (1965).

<sup>6</sup> Acknowledgments: The technical assistance of Mrs. CH. HORAK is gratefully acknowledged.

<sup>7</sup> This investigation was supported by Research Grant No. 63-CDC-51-01 from the U.S. Public Health Service, Bureau of State Services.

### Facteurs influençant la fertilité des mâles de *Xenopus laevis* D. (Batracien anoure)

A toute saison, il est possible de provoquer le développement des caractères sexuels secondaires chez *Xenopus laevis* par l'injection d'hormone gonadotrope chorionique, tel le Gonadotropine chorionique (CIBA), le Pregnyl (Organon) ou le Physex (Leo). Ces produits, riches en hormone luténisante (LH) provoquent chez le mâle la formation des callosités nuptiales et leur pigmentation, ainsi que l'amplexus. Chez la femelle, l'hormone induit la ponte (un surdosage peut même provoquer la ponte d'œufs immatures (ORTOLANI et VANDERHAEGHE<sup>1</sup>). Toutefois, les résultats de ces croisements sont mauvais en automne.

La figure illustre ce déclin saisonnier. Elle a été établie sur la base de 410 croisements effectués avec des animaux d'âge et d'origine très divers, pendant la période de juin 1962 à novembre 1965. Néanmoins, malgré l'effet saisonnier, on obtient encore un faible pourcentage de fécondation en «mauvaise période» (16%), par contre en «bonne période» le pourcentage de fécondation n'est pas aussi élevé que possible (37% seulement). Comme la température de notre salle d'aquariums est maintenue constante à 22–23°C, ce déclin d'origine apparemment photo-

<sup>1</sup> G. ORTOLANI et F. VANDERHAEGHE, Rev. suisse Zool. 72, 652 (1965).

périodique ne peut pas se manifester au maximum dans les conditions artificielles du laboratoire.

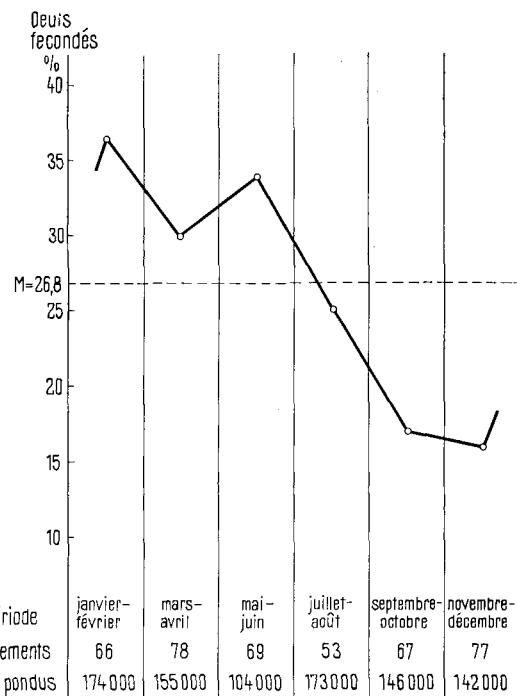
L'expérience suivante nous a montré qu'il est possible d'activer la spermatogenèse primaire chez les mâles par un traitement à l'Antex (Leo) riche en FSH, en période de faible activité des gonades. Chez les femelles, Dr. A. S. C. CURTIS (University College, London) obtient régulièrement des pontes de bonne qualité en alternant les injections de FSH et LH (Communication personnelle à A. DROIN). La même expérience a permis de mettre en évidence l'effet de la longueur de l'éclairage journalier.

*Matériel et méthodes.* Hormone: Antex (Leo). 5 injections de 20 U.I. chacune. Conditions lumineuses: (a) Durée moyenne de l'éclairage de la salle d'aquarium: 10/24 h. (b) Jour prolongé: Eclairage 12/24 h au néon, contrôlé par une minuterie, en chambre thermostatisée à 00°C.

*Les mâles:* 30 *Xenopus* mâles provenant de deux familles différentes furent répartis en 4 groupes de traitement: Groupe I: Groupe témoin, sans aucun traitement (isolé 3 jours avant le croisement). Groupe II: traité pendant 3 semaines par un éclairage 12/24 h. Groupe III: 5 injections de 20 U.I. Antex au cours de 3 semaines (sans lumière supplémentaire). Groupe IV: traitement avec 5 injections de 20 U.I. Antex et traitement simultané par la lumière 12/24 h au cours de 3 semaines. Au début du traitement (27 octobre 1965) aucun des mâles ne présentait de pigmentation ni callosités nuptiales sous les bras.

*Les femelles:* Isolée 3 jours avant le croisement, aucune femelle ne fut traitée. Les 30 femelles provenant, comme les mâles, de deux familles différentes, furent croisées autant que possible en nombre égal avec les mâles de chaque famille et de chaque mode de traitement. Le croisement fut effectué selon notre mode habituel: 7 h après une première injection de 50 U.I. à chaque sexe, les femelles reçoivent 250 U.I. et les mâles 100 U.I. de Physex (Leo).

*Résultats.* Le nombre d'œufs pondus, le nombre d'œufs fécondés et le pourcentage des œufs fécondés dans chaque croisement sont présentés dans le Tableau.



Pourcentage de fécondation à différentes périodes de l'année (croisements effectués de juin 1962 à novembre 1965). M = moyenne totale: 26,8%. Moyenne par période: total des œufs fécondés/total des œufs pondus.

#### Résultats de 30 croisements de *Xenopus* après traitement des mâles

Hormones 5 · 20 U.I. Antex	Traitement par un éclairage 12/24 h			Avec traitement				
	Mâles	Œufs		Mâles	Œufs			
	Pondus	Fécondés	% fécondé		Pondus	Fécondés	% fécondé	
Sans Antex	Ia	466	110	24%	IIa	900	620	69%
	Ib	2800	10	0,3%	IIb	1700	390	23%
	Ic	2000	360	18%	IIc	3500	1300	37%
	Id	2400	310	13%	IId	2400	770	32%
	Ie	1650	825	50%	IIe	3000	450	15%
	If	1000	230	23%	IIIf	1800	310	17%
	Total	10 316	1 845	18%	Total	13 300	3 840	29%
Avec Antex	IIIa	2 500	2 250	90%	IVa	3 300	2 770	84%
	IIIb	6 400	2 750	43%	IVb	3 500	3 325	95%
	IIIc	1 600	1 040	65%	IVc	4 500	3 780	84%
	IIId	6 450	2 710	42%	IVd	2 800	390	14%
	IIIe	2 100	1 680	80%	IVE	1 310	1 200	90%
	IIIf	3 400	3 230	95%	IVf	3 700	3 330	90%
				IVg	430	150	34%	
				IVh	1 900	1 045	55%	
				IVi	2 400	1 440	60%	
				IVj	1 850	850	46%	
Total		22 450	13 660	61%	Total	25 690	18 280	71%

*Observations et conclusions.* Fécondité des 6 mâles non traités: (Groupe I) 18% des 10 316 œufs pondus ont été fécondés. L'injection de 150 U.I. de Physex (LH) a provoqué la pigmentation sur les bras ainsi que l'amplexus, mais le nombre de spermatozoïdes libérés a été insuffisant.

*Photopériodicité:* Par une prolongation de l'éclairage journalier (de 2 h environ), la fécondité a été augmentée de 10-11% dans les groupes II et IV, sans ou avec Antex. Cette augmentation est statistiquement significative et pourrait indiquer que le déclin saisonnier de la fécondité a une origine photopériodique. Il est intéressant de noter que l'exposition à un éclairage prolongé stimule les caractères sexuels secondaires, avant que les gonades n'aient produit suffisamment de sperme (cf. groupe II).

*Action de l'Antex:* Indépendamment de l'effet du jour long, le traitement avec l'Antex riche en FSH a beaucoup amélioré la fécondité des mâles. L'effet folliculo-stimulant de cette hormone s'est exprimé déjà 3 semaines après la première injection. Au cours du traitement les caractères sexuels secondaires se sont très fortement développés. La dose minimum nécessaire pour une activation suffisante de la gamétogénèse est encore à déterminer.

*La qualité des œufs:* Si l'on suppose que les mâles du groupe IV ont fourni suffisamment de spermatozoïdes pour féconder tous les œufs capables de développement, les femelles ont pondu 71% d'œufs fécondables, 29% des œufs étant hypermatures. Cette valeur correspond aux observations de K. MIKAMO (communication personnelle). Aussi, parmi les œufs non développés aucun ne présentait le faux-clivage (ORTOLANI et VANDERHAEGHE<sup>1</sup>).

*Summary.* Under the conditions prevailing at the Station de Zoologie expérimentale (University of Geneva), the fertility of males of *Xenopus laevis* decreases every year in the autumn (Figure). 'Long-day' treatment significantly increases the fertility and leads to the conclusion that the decrease is due to photoperiodic influences. Treatment with Antex (Leo) (i.e. a follicle-ripening hormone) for 3 weeks highly activates spermatogenesis at a time when the gonads normally remain inactive.

VERENA UEHLINGER<sup>2</sup>  
avec la collaboration technique de  
KARIN DUCRET

Station de Zoologie expérimentale, Université de Genève  
(Suisse), 17 février 1966.

<sup>2</sup> Remerciements: Je dois ma reconnaissance à Mlle K. PONSE, Professeur d'endocrinologie, pour ses conseils et les discussions sur l'effet des différentes hormones gonadotropes; au Professeur A. LINDER, Professeur de statistique mathématique, qui a bien voulu faire l'analyse statistique des croisements; et à mes collègues Mme F. VANDERHAEGHE, Dr ès sc., et Mlle A. DROIN, Dr ès sc., pour leurs observations et discussions. Le travail technique a été effectué avec l'appui du Fonds National Suisse pour la Recherche Scientifique N° 2551.

## Über ein Zwischenprodukt bei der Darstellung von Rhodamin B-Isothiocyanat

Zur Markierung von Antikörpern bei immunchemischen Untersuchungen werden in der Hauptsache Fluorescein-isothiocyanat, Rhodamin B-Isothiocyanat (I), Rosamin-isothiocyanat, Dimethylaminonaphthalinsulfochlorid und Hydroxyppyrentriflusosäure verwandt. I wird nach einer Vorschrift von RIGGS et al.<sup>1</sup> auf folgendem Wege gewonnen: Nitrophthalsäure wird mit m-Diäthylaminophenol zu Nitrorhodamin (II) kondensiert, aus dem man durch katalytische Hydrierung Aminorhodamin erhält. Letzteres lässt sich mit Thiophogenen zu I umsetzen. Eine andere Darstellungsmöglichkeit für II ist folgende: Man setzt Nitrofluorescein<sup>2</sup> nach der Vorschrift von BOREK<sup>3</sup> mit Phosphorpentachlorid in Phosphoroxychlorid (als Fliessmittel) zu 3,6-Dichlornitrofluoran (III) um. III kann analog<sup>4</sup> mit Diäthylaminohydrochlorid und Natriumacetat in Dimethylformamid bei 200-220°C im Bombenrohr in II umgewandelt werden. Die weitere Verarbeitung erfolgt dann wie bei<sup>1</sup>. Die Methode hat den Vorteil, dass sich aus einem Ausgangsprodukt, nämlich Nitrofluorescein, das leicht in grösserer Menge hergestellt werden kann, verschiedene fluoreszierende Farbstoffe (FITC, Rhodamin B-ITC, Tetramethylrhodamin-ITC) gewinnen lassen.

*Arbeitsvorschrift.* 3 g Diäthylaminohydrochlorid, 3 g Natriumacetat, 2 g Dichlornitrofluorescein und 6 ml Dimethylformamid werden miteinander vermischt und im Bombenrohr 24 h auf 200-220°C erhitzt. Nach dem Erkalten und Öffnen wird das Rohr mit wenig Chloroform

ausgespült. Die Lösungsmittel werden im Vakuum entfernt. Der feste Rückstand wird zweimal mit je 15 ml Chloroform extrahiert. Dabei bleiben die anorganischen Substanzen ungelöst. Der Farbstoff kann mit Benzin (Kp. 60-80°) aus der Chloroformlösung ausgefällt werden. Falls er in öiger Form ausfällt, empfiehlt es sich, die Lösung vor dem Fällen mit etwas Tierkohle zu behandeln. Die Umkristallisation erfolgt aus i-Propanol.

*Summary.* The synthesis of nitrorhodamin via nitrofluorescein and 3,6-dichlornitrofluoran is described. Nitrorhodamin is an intermediate for the preparation of rhodamin B-isothiocyanate and tetramethylrhodamin-isothiocyanate. Starting from nitrofluorescein, both FITC and rhodamin-ITC can be prepared.

O. KÜHNEMUND und W. OZEGOWSKI

Deutsche Akademie der Wissenschaften zu Berlin,  
Institut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie,  
69 Jena (DDR), 1. März 1966.

<sup>1</sup> J. L. RIGGS, R. J. SEIWALD, J. H. BURCKHALTER, C. M. DOWNS und T. G. METCALF, Am. J. Pathol. 34, 1081 (1958).

<sup>2</sup> A. H. COONS und M. H. KAPLAN, J. exp. Med. 91, 1 (1950).

<sup>3</sup> F. BOREK, J. org. Chem. 26, 1292 (1961).

<sup>4</sup> DRP 48367, P. FRIEDLÄNDER, Fortschritte der Teerfarbenfabrikation, Zweiter Teil (1887-1890), Springer-Verlag, Berlin 1891), p. 79.