

*Nucleoli in somatic cells.* The results obtained by means of specific stains (methyl-green and pyronin method, followed by RNase tests) indicate that 1 or sometimes 2 nucleoli are present in each interphase nucleus of adult tissues. Hence, *T. marmoratus* karyotype is characterized by a single pair of nucleolus organizers. From the outset of the present study it appeared that chromosome X was the element endowed with the nucleolus-organizing region, since it is the only one displaying consistently the secondary constriction from the early stages of embryonic development.

This assumption turned out to be true when, upon inspection of the lampbrush chromosomes (unpubl.), only chromosome X was found to carry a nucleolus inserted in subterminal region of the long arm (Figure 3).

*Nucleoli in spermatogonia.* This investigation has been carried out on both first and second spermatogonia<sup>15</sup> mainly of *T. marmoratus* as well as of other newt species. First spermatogonia are generally enclosed by a few follicle cells and recognizable by their large polymorphous nucleus with poorly stainable diffuse chromatin. They may be identified with the cells already known as 'large polymorphous spermatogonia' in *Batrachoseps*<sup>16</sup> and 'cellules-mères primitives' in several *Triturus* species<sup>17</sup>. Their most remarkable character is the presence of endonuclear bodies of varying sizes, ranging from 2 to 20 per cell in number. Such bodies are clearly identifiable under phase-contrast microscope (Figure 4); they display an outer Feulgen-positive ring, are stained by Unna-Pappenheim methyl-green and pyronin, and are disrupted by RNase. Owing to these characteristics they may be

considered as nucleoli. On the contrary, second spermatogonia display only 1 or, occasionally, 2 nucleoli per cell.

The presence of multiple nucleoli recalls the phenomenon of gene amplification of the cistrons for ribosomal RNA which, already known in oocytes I, has been recently suggested also in amphibian oogonia<sup>18</sup>. This may be the case of the first spermatogonia as well; however, at present, their degree of ploidy has yet to be ascertained. If gene amplification is proved to occur in primitive spermatogonia beside oogonia, it will be of great interest to examine more closely the cytological process of the germ-line cell differentiation.

*Riassunto.* I cromosomi mitotici di *Triturus marmoratus* sono stati ordinati in cariotipo. Gli organizzatori nucleolari sono due per cellula, ma negli spermatogoni primitivi sono presenti numerosi nucleoli liberi.

IRMA NARDI and G. MANCINO

*Istituto di Zoologia e Anatomia comparata dell'Università, Via Volta 4, Pisa (Italy), 26 October 1970.*

<sup>15</sup> Same terminology as in: SH. IRIKI, Sci. Rep. Tokyo Bunrika Daig., B 1, 81 (1932).

<sup>16</sup> G. EISEN, J. Morph. 17, 1 (1900).

<sup>17</sup> F. A. JANSENS, Cellule 19, 7 (1901).

<sup>18</sup> J. G. GALL and M. L. PARDUE, Proc. natn Acad. Sci., USA 63, 378 (1969).

## Étude comparée de la multiplication des cellules germinales à la fin de la première semaine de la vie embryonnaire chez trois espèces de Gallinacés (*Gallus domesticus*, *Meleagris gallopavo*, *Coturnix coturnix japonica*)

Chez le Poulet (*Gallus domesticus*) et le Dindon (*Meleagris gallopavo*), les populations de cellules germinales subissent un accroissement de type exponentiel entre le moment qui suit leur installation dans les ébauches gonadiques et l'époque de la multiplication rapide qui va les transformer en gones. Toutefois, chez ces deux espèces, les populations de départ et les taux d'accroissement ne sont pas identiques: le Poulet possède une population de gonocytes primaires plus dense au départ mais dont la prolifération est moins active que chez le Dindon<sup>1</sup>. L'étude de la progression du nombre des gonocytes a été réalisée chez une troisième espèce (*Coturnix coturnix japonica*) et pour la même période de la vie embryonnaire (entre 4 et 7 jours d'incubation) afin d'en comparer les résultats aux précédents.

*Techniques.* Des embryons de Caille ont été sacrifiés toutes les 24 h entre 4 et 7 jours d'incubation. 2 spécimens sont fixés simultanément pour chacun des 4 stades étudiés. Le premier est fixé au Gendre à 4°C pour être ultérieurement traité par la technique du PAS<sup>2</sup> qui s'est avérée efficace chez la Caille comme chez les deux autres espèces; le second est fixé au Bouin en vue de la coloration des coupes à l'hématoxyline-éosine. Les embryons ont été inclus dans la paraffine et on a débité en coupes transversales de 7,5 µm d'épaisseur une région du corps incluant largement les ébauches gonadiques. Les gonocytes primaires ont été identifiés grâce à leurs enclaves glycogéniques chez les sujets traités par la technique du PAS., et d'après des critères morphologiques classiques

sur les autres préparations. Les cellules germinales ont été dénombrées coupe par coupe, pour chacun des stades étudiés, mais on s'est efforcé de ne pas compter plusieurs fois une même cellule.

*Résultats.* Les résultats des dénombremens de gonocytes effectués chez la Caille sont les suivants: 366 et 412 gonocytes au 4<sup>e</sup> jour d'incubation, 795 et 816 au 5<sup>e</sup>, 1457 et 1623 (2 individus ♀) au 6<sup>e</sup> jour, 2884 (♀) et 3199 (♂) au 7<sup>e</sup>. Ils montrent que les nombres totaux de gonocytes augmentent assez régulièrement avec le stade de développement, bien que l'on puisse noter un écart plus ou moins grand entre les valeurs trouvées à chaque stade, ce qui est aussi le cas chez les deux autres espèces<sup>1</sup>. La différenciation morphologique du sexe qui se manifeste dans les ébauches gonadiques à la fin de la période étudiée (un peu plus précocement chez la Caille et le Poulet que chez le Dindon) n'entraîne pas aussitôt une disparité d'effectif global des cellules germinales entre le mâle et la femelle, la répartition bilatérale des gonocytes pouvant être néanmoins très asymétrique (indice G/D des gonocytes variant de 1,20 à 6,9 chez les sujets examinés). En portant les valeurs obtenues pour les populations de gonocytes sur un axe logarithmique, l'échelle

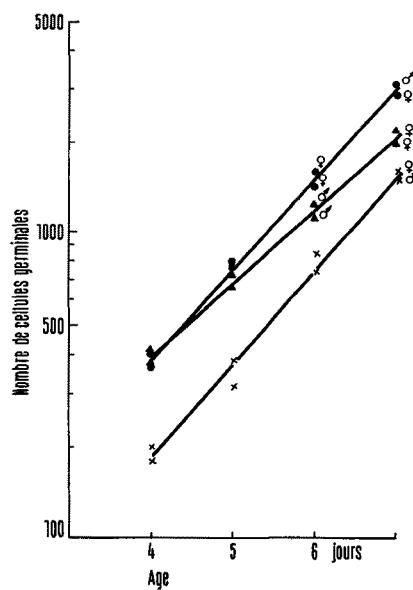
<sup>1</sup> G. REYNAUD, C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci. 268, 2275 (1969).

<sup>2</sup> D. B. MEYER, Stain Technol. 35, 83 (1960).

des temps demeurant linéaire, on peut comparer la variation dans le temps de la multiplication de ces cellules chez les 3 espèces (Figure).

1. Comme chez le Poulet et le Dindon, on se trouve chez la Caille dans une phase d'accroissement exponentiel de la population des cellules germinales: les points de référence sont pratiquement alignés. Ce type de progression paraît être assez général<sup>3</sup> et caractéristique de la période considérée puisque les travaux de CHRÉTIEN<sup>4</sup> révèlent une croissance exponentielle de la population des gonocytes de Lapin entre 9 et 14 jours post coitum, c'est-à-dire également durant la période précédant la différenciation sexuelle.

2. Le nombre de gonocytes primaires est à peu près le même (voisin de 400) chez la Caille et le Poulet de 4 jours, alors qu'il est inférieur de moitié chez le Dindon. Ce fait ne peut apparemment pas s'expliquer par le développement embryonnaire plus lent du Dindon



Evolution des populations de cellules germinales, entre 4 et 7 jours d'incubation, chez l'embryon de Poulet (▲), de Dindon (×) et de Caille (●). Le sexe est indiqué lorsqu'il a été reconnu avec certitude.

(28 jours d'incubation au lieu de 21 chez le Poulet) puisque la Caille qui a un développement encore plus court (16 jours) possède à 4 jours le même nombre de gonocytes que le Poulet. On pourrait essayer de mettre en parallèle les populations de cellules germinales et les niveaux de fécondité (beaucoup plus faible chez la Dinde que chez les deux autres espèces) mais cela nécessiterait des résultats plus nombreux et, en outre, les observations de HARDISTY<sup>5</sup> ne semblent pas conclure à l'existence d'une relation de ce type.

3. Les taux de croissance des populations de gonocytes sont presque les mêmes chez la Caille et le Poulet (les deux droites traduisant leur variation sont à peu près parallèles) alors qu'il est nettement plus faible chez le Poulet (pente inférieure de 8% environ). Alors que le mode exponentiel de croissance paraît être général pour la période considérée, il est possible que le taux d'accroissement soit caractéristique de l'espèce. Dans ce cas, les différences de taux constatées rendraient compte, de façon satisfaisante, des distances immunologiques découvertes par MAINARDI<sup>6</sup> et qui font ressortir un lien phylogénétique plus étroit entre Caille et Dindon (distance immunologique: 11) qu'entre Caille et Poulet (d.i.: 32) ou Dindon et Poulet (d.i.: 22).

*Summary.* Counts were made of the numbers of germ cells in quail embryos aged 4–7 days' incubation. The rate of growth in the population of gonocytes was compared to these of chick and turkey embryos during the same period. The increase is exponential in the three species and the rates are more similar between quail and turkey than between each of them and the chick.

G. REYNAUD

Laboratoire de Morphogénétique animale,  
Faculté des Sciences de Marseille,  
Place Victor-Hugo, F-13 Marseille 3<sup>e</sup> (France),  
26 septembre 1970.

<sup>3</sup> De façon très générale, cette phase de multiplication exponentielle constitue en fait la période la plus active de la vie d'une population cellulaire.

<sup>4</sup> F. C. CHRÉTIEN, J. Embryol. exp. Morph. 16, 591 (1966).

<sup>5</sup> M. W. HARDISTY, Biol. Rev. 42, 265 (1967).

<sup>6</sup> D. MAINARDI, Nature, Lond. 184, 913 (1959).

## Organotypical Culture of Irradiated and Non-Irradiated Chick Mesonephros

Organotypic cultures are suitable for the study of irradiation effects on cells and tissues. We used the chick mesonephros in our experiments because this organ is fully differentiated and functional. In this sense, it is comparable to adult organs. As an embryonic tissue, it is easy to culture. The differential effect of ionizing irradiation on epithelial and fibrous tissue occupied our special attention.

*Methods.* The 9-day-old chick mesonephros (Stage 34–35 of HAMBURGER and HAMILTON<sup>1</sup>) has been used throughout the present experiments. One of the 2 organs is kept in Tyrode's solution after dissection, while the other is irradiated. The irradiation technique used is mentioned in a previous paper<sup>2</sup>; single doses of 500 rad, 1000 rad, and 2000 rad are delivered.

After irradiation, both control and irradiated organs are cut into pieces, and transferred for incubation to a

semi-solid nutrient medium<sup>3</sup> in culture dishes as described by GAILLARD<sup>4</sup>. The mesonephros is explanted in vitro following WOLFF's technique<sup>5</sup>. The cultures are fixed in Zenker after 6 h, 48 h, 72 h and 7 days of incubation at 37.5°C, embedded in paraffin, sectioned at 8 µm and stained with haematoxylin and eosine, and Azan or Bielschowsky's<sup>6</sup>.

<sup>1</sup> V. HAMBURGER and H. HAMILTON, J. Morph. 88, 49 (1951).

<sup>2</sup> L. DE RIDDER, M. MAREEL and M. VAN VAERENBERGH, *Strahlentherapie*, Sonderband, Teil B (1967), p. 393.

<sup>3</sup> L. VAKAET and L. PINTELON, C. r. Soc. biol., Paris 153, 147 (1959).

<sup>4</sup> P. J. GAILLARD, in *Methods in Medical Research* (Ed. M. B. VISSCHER), Year book publishers, Chicago 1951), p. 241.

<sup>5</sup> E. WOLFF, Tex. Rep. Biol. Med. 10, 463 (1960).

<sup>6</sup> B. ROMEIS, *Mikroskopische Technik*, Verbesserte Auflage (R. Oldenbourg, München 1948).