

a variable number of secondary constrictions has been reported⁵. In this study, we used specimens of the Swiss Albino strain maintained at the Instituto Butantan since 1956⁶. Employing the same methods⁷ and without any special treatment, we compared cytological preparations from adult and newborn animals. We found that there was a greater number of chromosomes with secondary constrictions, mainly of the 'rabbit ear' type, in the metaphases of the young animals (Figure 3).

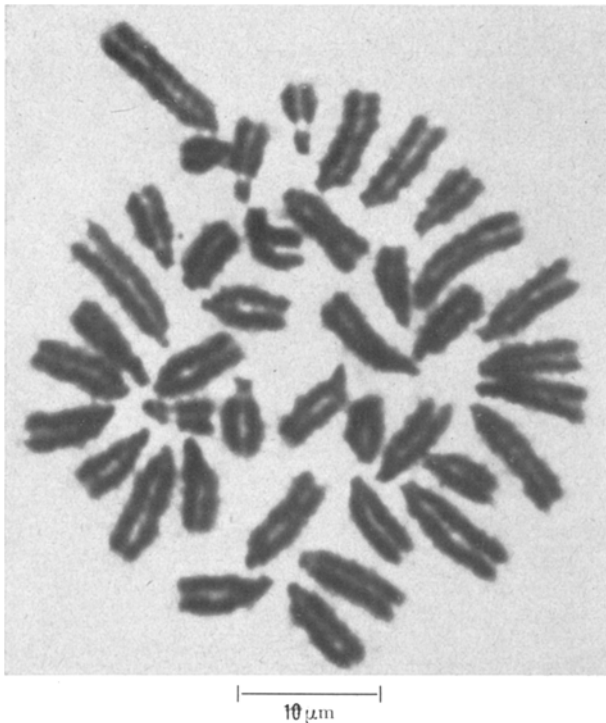


Fig. 3. Mitotic metaphase of a newborn *Mus musculus*, showing secondary constrictions and 'rabbit ear' chromosomes.

The 3 species, although phylogenetically distant, and despite their great differences in type of development from zygote to adult, show a common feature of a more intense proteic metabolism in the embryo or the newborn, as compared to the adult.

On the other hand, it is evident that a higher protein synthesis rate would require a higher ribosomal RNA synthesis. We may assume that the rDNA cistrons are mainly located at the nucleolar organizer regions at the chromosome satellites and other secondary constrictions.

Our findings suggest that at the early phases of development, where a higher synthesis rate is needed, there would be an increased number of active cistrons for ribosomal RNA, and that this could be morphologically expressed by a larger number of cytologically detectable secondary constrictions. In the adult, part of the rDNA cistrons would become inactive, thus reducing the number of constrictions visualized at the light microscope.

Furthermore, karyotypical variability as to the number of the secondary constrictions among the different tissues of the same animals, could be due to a different number of active rDNA cistrons, depending on the metabolic activity of the tissue, and on the physiological state of the animal.

Zusammenfassung. In den Metaphasen von embryonalen und neugeborenen Amphibien, Reptilien und Säugern wurde eine grössere Anzahl von Satelliten und anderen sekundären Strukturen beobachtet als in solchen von ausgewachsenen Tieren. Dies kann bedingt sein durch eine grössere Anzahl von Cistronen der rDNS, die sich aktiv in den Zellen junger Tiere befinden.

MARIA LUIZA BEÇAK and W. BEÇAK

*Serviço de Genética, Instituto Butantan,
Caixa Postal 65, São Paulo (Brasil), 16 August 1972.*

⁵ J. J. ARROYO NOMBELLA and C. RODRIGUEZ MURCIA, *Chromosoma* 37, 63 (1972).

⁶ W. BEÇAK, *Organização de Biotério de Camundongos* (Instituto Butantan 1958).

Die Bedeutung des Serumeiweissbildes zur Diagnose von *Bufo calamita* Laur., *Bufo viridis* Laur. und deren Bastarden (Amphibia, Anura, Bufonidae)

Zur spezifischen Diagnose der beiden europäischen Krötenarten *Bufo calamita* (Kreuzkröte) und *Bufo viridis* (Wechselkröte) wurden bislang Merkmale des Körperbaus und der Färbung und Zeichnung herangezogen, so die relative Länge der Hinterbeine, die relative Länge des 1. und 2. Fingers, die Grösse der Schwimmhaut am Hinterfuss, die Form der Ohrdrüsen, die Zahl der Zehengelenkhöckerchen, die Fleckenzeichnung und das Vorhandensein eines Rückenbandes¹⁻³. Hiervon haben die beiden letzteren allerdings nur für mitteleuropäische Vertreter beider Arten volle Gültigkeit, nachdem diese Zeichnungsmerkmale bei den Kreuzkröten der iberischen Halbinsel⁴ und bei mittelmeerländischen, insbesondere östlichen Wechselkröten⁵ stärkere Variation jeweils in den Bereich der anderen Art aufweisen. Unter Einbeziehung auch dieser südlichen Formen erscheinen von den Körperbaumerkmalen die relative Hinterbeinlänge, die relative Fingerlänge, und mit Einschränkung die Zahl der Zehengelenkhöckerchen als am besten zur Arttrennung geeignet. Auch mit ihnen kann jedoch im Randbereich der Variation nicht immer eine eindeutige Aussage erzielt werden.

Eine eindeutige Differenz zeigt sich im Serumeiweissbild, in dem sich beide Arten durch die Lage ihrer jeweiligen Albuminfraktion unterschieden. Bei elektrophoretischer Auftrennung der Serumeiweisse laufen die Albumine von *Bufo viridis* etwas weiter als diejenigen von *Bufo calamita*, was bei Auftragung einer Mischung von Seren beider Arten zur Verdoppelung der Albuminfraktion führt (Figur 1). Diese Situation findet sich bei allen bislang daraufhin untersuchten Formen und ist damit als artspezifisch zu werten. Während sie sich für vor dem Erkennen dieses Sachverhaltes untersuchte Wechselkröten aus der Türkei⁵ nur durch vergleichende Messung der Laufstrecke ebenfalls bestätigen liess, konnte sie über Mischserumbildung mit jeweils morphologisch eindeutig

¹ E. SCHREIBER, *Herpetologica europaea* (Jena 1912).

² R. FLINDT und H. HEMMER, *Zool. Jb. Syst.* 94, 162 (1967).

³ R. FLINDT und H. HEMMER, *Zool. Beitr.* NF 13, 149 (1967).

⁴ R. FLINDT und H. HEMMER, *Salamandra*, im Druck.

⁵ R. FLINDT und H. HEMMER, *Senckenberg. biol.* 49, 99 (1968).

charakterisierten arteigenen und artfremden Standardtieren aus dem Rhein-Main-Gebiet bei Kreuzkröten von der iberischen Halbinsel, aus Holland, Norddeutschland und dem Rhein-Main-Raum, sowie bei Wechselkröten aus Marokko und dem Rhein-Main-Raum unmittelbar nachgewiesen werden.

Während intraspezifisch also die Albumine einheitlich erscheinen, ist eine nicht unbeträchtliche qualitative und quantitative Variation bei den verschiedenen Globulinfractionen festzustellen. Unterschiede bezüglich Lage und Vorhandensein einzelner Banden erwiesen sich bei *Bufo viridis* als zur Subspeziescharakterisierung geeignet. Während sich bei *Bufo viridis viridis* Exemplare aus dem Neusiedlersee-Gebiet praktisch nicht von solchen aus dem Rhein-Main-Gebiet unterscheiden, lassen Wechselkröten aus der Türkei (*Bufo viridis arabicus*)⁵ und aus Marokko (*Bufo viridis* ssp.) jeweils eigene Serumeiweissbilder erkennen. Bei der Kreuzkröte weichen Tiere von der iberischen Halbinsel⁴ von solchen aus Südfrankreich, Holland, Norddeutschland und dem rechtsrheinischen Teil des Rhein-Main-Gebietes (bis in den Mannheimer Raum) in

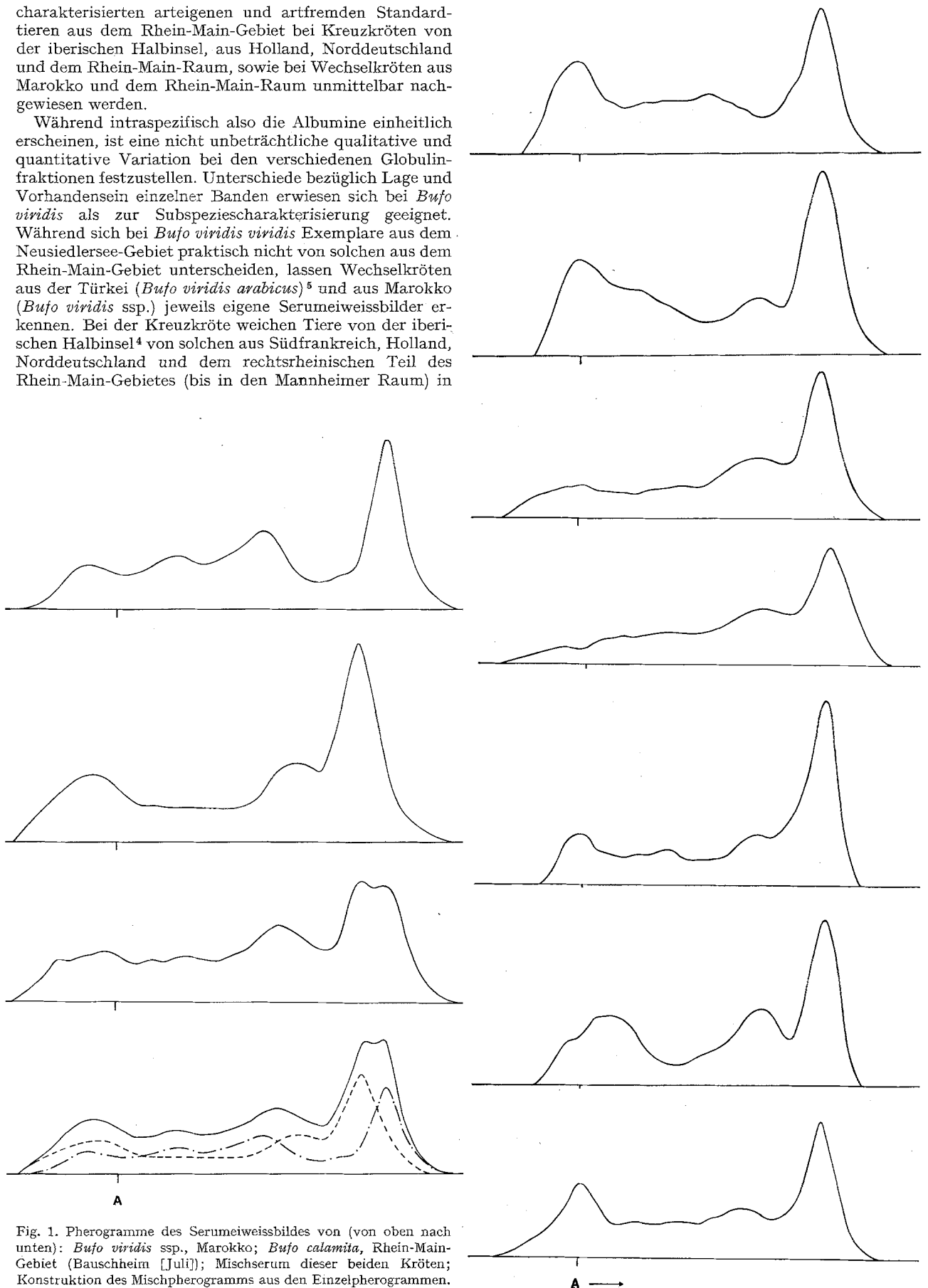


Fig. 1. Pherogramme des Serumeiweissbildes von (von oben nach unten): *Bufo viridis* ssp., Marokko; *Bufo calamita*, Rhein-Main-Gebiet (Bauschheim [Juli]); Mischserum dieser beiden Kröten; Konstruktion des Mischpherogramms aus den Einzelpherogrammen.

geringem Masse hauptsächlich in der relativen Lage der am weitesten anodisch wandernden Hauptglobulinfraktion ab. Hierin zeigt sich auch ein starker Unterschied zwischen einer Kreuzkrötenpopulation von Mainz (linksrheinisch) und Tieren aus dem Raum Bauschheim, Bischofsheim, Rüsselsheim (rechtsrheinisch)⁴, bei denen unter insgesamt 18 serologisch geprüften Individuen 1 Exemplar des Mainzer Serumptyps gefunden wurde (für welches zudem eine Verschleppung aus dem linksrheinischen Gebiet nicht auszuschliessen ist, nachdem eine

solche für einige Wechselkröten sicher vorkam). In quantitativer Hinsicht ändert sich vor allem der Anteil der weniger weit anodisch laufenden Proteinfractionen, für welche während der Laichzeit höhere Stärke als im Sommer gefunden wurde (Figur 2). Derartige quantitative Verschiebungen im Jahreszyklus stimmen mit den Befunden von FLINDT und GIMBEL⁶ an *Rana temporaria* und von REICHEL und HÜBNER⁷ an *Rana temporaria* und *Rana esculenta* überein. Zur Feststellung und zum Vergleich einzelner intraspezifisch verschiedener Serumeiweisstypen erscheinen daher bei den hier untersuchten Arten die starken, am weitesten anodisch wandernden Globulinfraktionen in besonderem Masse geeignet, während das Erkennen der intraspezifischen Variation im Bereich der anodisch unmittelbar auf die Auftragestelle folgenden Serumeiweisssanden grösseren Fehlerquellen unterworfen ist (Figuren 2 und 3).

Die artspezifische Lage der Albuminfraktion hat, ähnlich wie bei den Grünfröschen *Rana ridibunda*, *Rana lessonae* und *Rana esculenta*⁸, deren Verdoppelung bei Bastarden beider Arten zur Folge. Eine Reihe derartiger unter weitgehend natürlichen Bedingungen⁹ im Labor gezüchteter Kröten der Kreuzungsrichtung *Bufo viridis* ♀ (Population Gensingen) × *Bufo calamita* ♂ (Population Mainz-Hartenberg) konnte daraufhin auf verschiedenen Altersstufen untersucht werden (Figur 4). Mit diesem Merkmal der Albuminverdoppelung ist über die elektrophoretische Trennung der Serumeiweisse eine eindeutige Objektivierbarkeit der Bastardnatur einer diesbezüglich

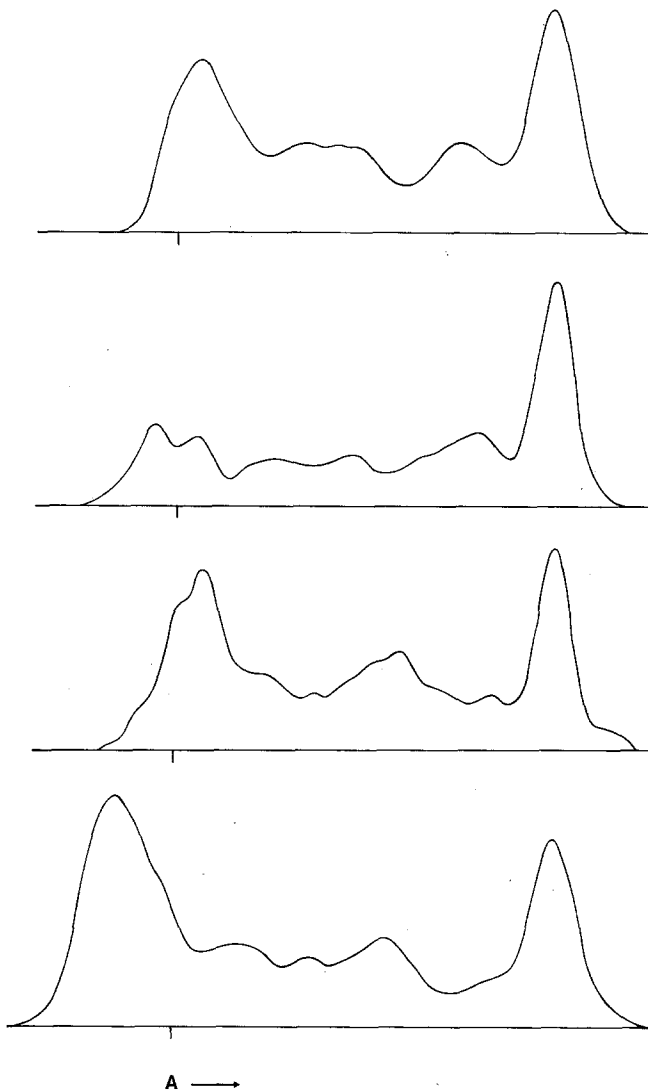


Fig. 3. Pherogramme des Serumeiweisssbildes von Wechselkröten verschiedener Herkunft (jeweils Mittelwertspherogramme aus mehreren Proben). Von oben nach unten: Rhein-Main-Gebiet (Bauschheim, Bischofsheim [April]); Neusiedler See-Gebiet [Januar]; Türkei (Adana); Marokko.

Fig. 2. Pherogramme des Serumeiweisssbildes von Kreuzkröten verschiedener Herkunft (jeweils Mittelwertspherogramme aus mehreren Proben). Von oben nach unten: Rhein-Main-Gebiet (Mainz-Hartenberg); Rhein-Main-Gebiet (Bauschheim [April]); Rhein-Main-Gebiet (Bauschheim [Juli/August]); Norddeutschland (Thülsfelder Talsperre, Kreis Cloppenburg); Holland (Wassenaar); Südfrankreich (Sète); Spanien (Provinzen Teruel, Sevilla).

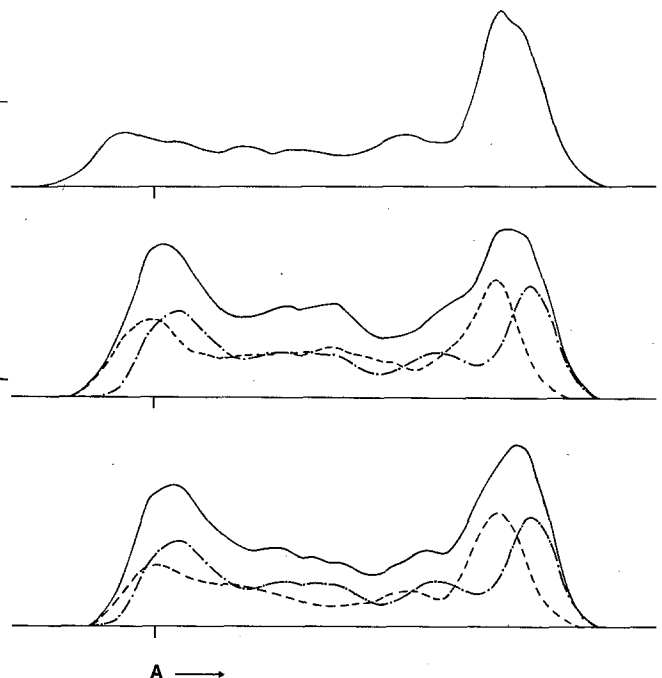


Fig. 4. Pherogramm eines Bastards *Bufo viridis* ♀ (Population Bauschheim) × *Bufo calamita* ♂ (Population Mainz-Hartenberg) im Vergleich zu (darunter): Mischkonstruktion aus den Einzelpherogrammen von *Bufo viridis* (Bauschheim) und *Bufo calamita* (Mainz-Hartenberg); Mischkonstruktion aus den Einzelpherogrammen von *Bufo viridis* (Bauschheim) und *Bufo calamita* (Bauschheim).

⁶ R. FLINDT und M. GIMBEL, Rev. Suisse Zool., im Druck.

⁷ A. REICHEL und G. HUBNER, Biol. Rdsch. 10, 59 (1972).

⁸ H. G. TUNNER, Verh. dt. zool. Ges., Köln 1970, p. 252.

⁹ R. FLINDT and H. HEMMER, Zool. Anz. 178, 419 (1967).

fraglichen Kröte aus dem Variationsbereich beider Arten gegeben. Das Pherogramm erscheint für die Globuline eines Wechselkröten-Kreuzkröten-Bastards hingegen weniger kennzeichnend. Infolge der saisonabhängigen quantitativen Veränderungen kann sich in diesem Bereich die bei Vorhandensein der Eiweissbanden beider Elternarten (entsprechend der Situation bei Fischbastarden¹⁰) resultierende Bastardkurve in stärkerem Masse verschieben; weiterhin treten in der für eine natürliche Bastardierung in Frage kommenden, hauptsächlich mitteleuropäischen Überschneidungszone der Verbreitungsgebiete beider Arten bei *Bufo calamita* zwei verschiedene Globulinmuster auf (Figuren 2 und 4). Mit diesen Befunden lässt sich die von den Verfassern bereits früher¹¹ ausgesprochene Vermutung bestätigen, dass es sich bei in einer Population bei Gensingen häufig gefundenen Wechselkröten mit Rückenband nicht um F1-Bastarde handelt. Als solche angesprochene Kröten⁹ aus Freilandpopulationen waren nach der Erarbeitung des hier mitgeteilten Befundes nicht in lebendem Zustand zur Überprüfung mit dieser Methode verfügbar.

Die Blutentnahme für derartige Bestimmungen ist in für die angewandte Methode der Serumgewinnung^{12,13} voll ausreichender Menge ohne dauerhafte Schädigung der Kröten aus der Vena angularis möglich¹⁴. Das Serum-eiweissbild kann daher ohne Schwierigkeit auch zur Diagnose von solchen Individuen Verwendung finden, deren weitere Lebendhaltung von Interesse ist.

Summary. Electrophoretic investigations of the serum protein patterns of natterjacks (*Bufo calamita* Laur.) from the Iberian Peninsula and from Western and Central Europe, and of green toads (*Bufo viridis* Laur.) from Central Europe, Asia Minor and North Africa show that the two species differ distinctly in the position of their albumin fractions. The identification of problematic specimens can result from the production of mixed serum with specimens of both species. As the albumin fraction of hybrids is doubled according to this method, it is also suitable for demonstrating the existence of such hybrids in natural populations.

R. FLINDT und H. HEMMER

*Institut für Physiologische Zoologie der
Johannes Gutenberg-Universität, Postfach, D-65 Mainz
(Deutschland), 20. Dezember 1972.*

¹⁰ L. NYMAN, Laxforskningsinst. Meddelande 13, 1 (1965).

¹¹ R. FLINDT und H. HEMMER, Salamandra 5, 18 (1969).

¹² R. JAEGER, Experientia 19, 660 (1963).

¹³ R. FLINDT, H. HEMMER und R. JAEGER, Zool. Jb. Physiol. 74, 155 (1968).

¹⁴ H. G. NÖLLER, Pflügers Arch. 269, 98 (1959).

Resistance to Carbon Dioxide, an Anoxic Stress in *Drosophila melanogaster*

Variation in response to carbon dioxide in *D. melanogaster* was first reported by L'HERITIER and TEISSIER¹ who discovered sharp segregations between strains which were capable of surviving short exposure to CO₂, and those which were not. Further work² showed that this variation was caused by a virus called sigma which was passed between generations in the cytoplasm of the eggs and sperm. Individuals carrying the virus are incapable of withstanding even a 30-sec exposure to CO₂. Populations of *D. melanogaster* carrying sigma seem to be widespread³, and the virus has been discovered in at least two other species⁴.

In the present work variation in response to longer exposure to CO₂ is reported. 18 strains derived from single inseminated female *D. melanogaster* collected at Leslie Manor near Camperdown in Victoria in December 1963 and December 1964 were tested for their mortality levels after exposure to CO₂. There was no significant mortality after 15 min exposure during a pilot trial which indicated that a 6 h exposure allowed adequate discrimination between strains for mortality. A plastic gas chamber was used for administration of CO₂ which bubbled through water, passed into the chamber, and passed out again through small holes drilled in the lid. For this experiment, the 6 replicates involved were tested separately. Mortalities were scored as percentages 1 day later, and were transformed using the angular transformation for analysis. This transformation is commonly used for fractional, proportional or percentage data which typically are distributed binomially, and whose variance depends on the magnitude of the proportion, and on the size of the sample⁵.

The analysis of variance showed highly significant ($P < 0.005$) differences between strains, both for males and for females. Table Ia) shows that the mortalities among strains, far from being sharp and discontinuous,

as in L'HERITIER and TEISSIER's¹ experiments, show a continuous distribution.

A diallel cross was undertaken to analyse in more detail the genetic basis of differences and in particular to test for maternal effects, a characteristic of cytoplasmic inheritance⁶. 4 strains (22, 29, 34 and 3) were selected to represent the range of mortalities. 2 collections of F₁ progeny were made and tested separately for 6 h. Resulting female mortalities (Table IIa) were analysed using GRIFFING's^{7,8} Method 1 Model No. 1 combining ability analysis (Table IIb). Male data are not given as they add no further information, and the analysis is essentially similar. Significant reciprocal effects were found, but were probably due solely to the strain pair 34-29 whose reciprocal F₁s were different. There were no systematic reciprocal differences, and hence no evidence of maternal effects or cytoplasmic inheritance.

The highly significant general combining ability effects indicate the presence of additive genetic variation among the strains used in the diallel. This implies the existence of such variation among all the L.M. strains, which in turn implies genetic polymorphism in the original popula-

¹ Ph. L'HERITIER and G. TEISSIER, C. r. hebdom. Séanc. Acad. Sci., Paris. 205, 1099 (1937).

² Ph. L'HERITIER, in *Evolutionary Biology* (Eds. The DOBZHANSKY, M. K. HECHT and W. C. STEERE; Appleton-Century Crofts, New York 1970), p. 185.

³ Ph. L'HERITIER, Adv. Virus Res. 5, 195 (1957).

⁴ D. L. WILLIAMSON, Genetics 46, 1053 (1961).

⁵ K. MATHER, *Statistical Analysis in Biology* (Methuen London 1951).

⁶ J. L. JINKS, *Extrachromosomal Inheritance* (Prentice Hall, Englewood Cliffs 1964).

⁷ B. GRIFFING, Aust. J. biol. Sci. 9, 463 (1956).

⁸ B. GRIFFING, Heredity, Lond. 10, 31 (1956).