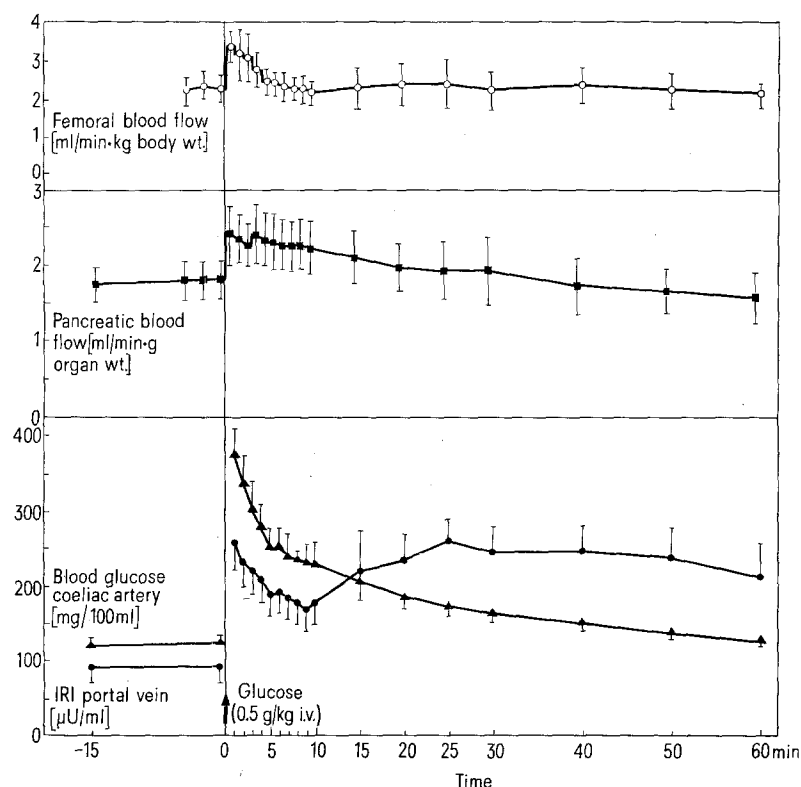




Blood flow in the A. pancreaticoduodenalis superior and the A. femoralis and concentrations of arterial blood sugar and portal venous IRI in anesthetized dogs ($n = 13$) before and after i.v. injection of 0.5 g/kg glucose. 0 min = end of the injection. Glucose assimilation constant $k 2.12 \pm 0.17$.

part of organ weight was estimated which is supplied by these arteria ($= 62.0 \pm 1.8\%$). By means of this number the pancreatic flow could be calculated on the basis of the organ fresh weight.

Results and discussion. After i.v. injection of saline (1.25 ml/kg) the pancreatic as well as the femoral blood stream are not altered. The Figure shows that the femoral flow increases to 150% during the glucose injection already. The level diminishes in relation to the first phase of the blood glucose decrease (distribution phase). After 5 min the blood glucose decrease is slower (assimilation phase), and the femoral circulation becomes normal. The pancreatic flow increases rapidly too. But there is no early decrease. It diminishes parallel to the glycemia, the starting level is reached after 20 to 40 min. The portal venous IRI concentration increases biphasically. No part of the mean IRI-curve is directly related to the flow alteration.

Obviously during this short-lasting hyperglycemia, 2 mechanisms influence the flow reaction of the pancreaticoduodenal vascular bed. On the one hand the blood stream increases rapidly. This reaction seems to be unspecific. It can be seen in the A.femoralis too. In a part of the individual registration curves of the A.gastropancreatica,

this primary circulatory reaction may be differentiated from the following long-lasting and possibly specific reaction of the pancreas. The second part of the circulatory reaction has never been seen in the A.femoralis or in the gastric blood flow⁸. The immediate unspecific reaction depends on the increase of osmolarity. The later phase is connected with a long lasting reduction of the peripheral vascular resistance in the pancreatic vascular bed only.

Zusammenfassung. Die Hyperglykämie nach einmaliger stossartiger Glukoseinjektion bewirkt einen Durchblutungsanstieg der Bauchspeicheldrüse. Dieser wurde kontinuierlich mit einem elektromagnetischen Blutstrommesser bei narkotisierten Hunden registriert. Der Anstieg setzt sich aus 2 Abschnitten zusammen, wovon der erste unspezifisch auch in der A.femoralis auftritt.

U. FISCHER, H. HOMMEL and E. SCHMID

Zentralinstitut für Diabetes 'Gerhardt Katsch'

DDR-2201 Karlsburg/Greifswald (DDR), 26 January 1973

⁸ L. S. SEMB, S. AUNE, Scand. J. clin. Lab. Invest. 27, 105 (1971).

Obtention, par la méthode des greffes de gonades embryonnaires, d'une femelle à descendance unisexuée femelle, chez le Triton *Pleurodeles waltlii* Michah.

La possibilité de réaliser, chez des Amphibiens tant Anoures qu'Urodèles, l'inversion phénotypique et fonctionnelle du sexe des femelles ou des mâles génétiques a été démontrée depuis longtemps¹. La fécondité des individus inversés obtenus a montré la labilité de la détermination du sexe chez plusieurs espèces d'Amphibiens; elle a permis également de connaître pour chacune des espèces

étudiées, à l'aide de croisements appropriés, les sexes homogamétique et hétérogamétique. Chez le Triton *Pleurodeles waltlii* Michah., un traitement gynogène administré pendant la vie larvaire a permis à GALLIEN² d'obtenir des néo-femelles (ZZ) qui, croisées avec des mâles standard (ZZ), donnent naissance à des pontes unisexuées constituées uniquement d'individus mâles. Dans

le but de disposer simultanément chez le Pleurodèle de femelles pondueuses de pontes unisexuées de sexe femelle, nous avons entrepris un travail directement inspiré de celui réalisé chez l'Ambystome par HUMPHREY³.

Protocole expérimental. Le point de départ de l'expérience consiste à réaliser la masculinisation de l'ovaire embryonnaire d'une femelle génétique et à le transformer en un testicule phénotypique fonctionnel. L'expérience a été réussie pour la première fois par HUMPHREY⁴ chez l'Ambystome. Etant donné que chez le Pleurodèle (tout comme chez l'Ambystome) le sexe femelle est hétérogamétique (ZW), un tel testicule devrait fournir deux catégories de spermatozoïdes et lors d'un croisement avec une femelle standard (ZW) on peut s'attendre à la production de mâles ZZ pour un quart d'entre eux, de femelles ZW pour une moitié et enfin d'individus WW pour le dernier quart si toutefois ces derniers sont viables, comme c'est le cas chez *Ambystoma sp.*³ et chez *Xenopus laevis*⁵. Chez ces espèces, les individus WW sont des femelles fonctionnelles qui, lorsqu'elles sont croisées avec des mâles standard (ZZ), fournissent des pontes constituées uniquement de femelles (ZW).

Notre expérience se déroule en plusieurs étapes. Dans un premier temps, elle consiste à greffer, au stade 24 (Table de GALLIEN et DUROCHER⁶), le mésoderme intermédiaire droit en position orthotopique selon la technique qui a été décrite chez le Pleurodèle par LACROIX et CAPURON⁷. A ce stade, les cellules germinales primordiales sont localisées à ce niveau⁸. Les embryons donneurs de greffons proviennent d'une ponte standard (comprenant des mâles et des femelles en nombre égal mais non reconnaissables à ce stade) et les embryons receveurs proviennent d'une ponte unisexuée constituée uniquement de mâles génétiques et issue d'une néo-femelle². De plus, pour pallier les risques d'une ablation incomplète de l'ébauche gonadique du receveur qui pourrait laisser en place des cellules germinales de type ZZ, nous avons préalablement triploïdisé les receveurs par choc thermique dès la ponte, selon la technique décrite et analysée par BEETSCHEN⁹. De cette façon, les individus receveurs triploïdes sont porteurs de cellules germinales triploïdes (ZZZ) qui évoluent en spermatozoïdes et ces derniers, lorsqu'ils fécondent des ovocytes issus de femelles standard diploïdes, produisent des individus aneuploïdes non viables ou bien exceptionnellement viables⁹⁻¹¹. Ainsi, on est en droit de considérer, lors du croisement d'un mâle receveur triploïde avec une femelle diploïde standard, que tout individu viable est issu de cellules germinales diploïdes implantées avec le greffon.

Dans un deuxième temps, les embryons donneur et receveur de chaque couple opératoire sont répertoriés et élevés séparément jusqu'à la métamorphose et à ce stade le sexe du donneur est identifié après dissection. Dans un troisième temps, au début de la puberté, soit 3 mois environ après la métamorphose, les partenaires des donneurs de sexe femelle subissent d'une part une castration du testicule gauche et d'autre part, à droite, une laparotomie exploratrice destinée à préciser l'état de développement et le sexe de la gonade située de ce côté et qui a évolué à partir du greffon. Le testicule prélevé du côté gauche est

utilisé pour réaliser des écrasements afin de connaître le degré de ploïdie de l'individu porteur du greffon.

Dans un quatrième temps, les individus triploïdes porteurs d'un testicule du côté droit sont croisés, dès que la maturité sexuelle est atteinte, avec des femelles vierges standard et la sex-ratio des pontes obtenues est établie par laparotomie exploratrice des descendants, 2 mois environ après la métamorphose. Dans un cinquième temps, les femelles ainsi reconnues sont à leur tour, dès qu'elles ont atteint la maturité sexuelle, croisées avec des mâles standard de façon à rechercher celles qui sont à l'origine de pontes unisexuées constituées uniquement de femelles (des échantillons des pontes sont élevés jusqu'à la métamorphose et la sex-ratio est établie après dissection des individus métamorphosés).

Résultats. 39 transplantations ont été réalisées à la fin Septembre 1968. 17 couples opératoires ont été élevés jusqu'à la métamorphose ainsi que 8 individus receveurs dont les donneurs étaient morts au début de la vie larvaire. La sex-ratio des 17 donneurs établie en Janvier 1969 était la suivante: 8 mâles et 9 femelles. Le degré de ploïdie des 9 receveurs correspondant aux 9 donneurs femelles n'a pu être établi que pour 5 animaux (les 4 autres sont restés malingres ou sont morts avant la puberté): 2 étaient diploïdes, 2 autres triploïdes, le dernier (R 35) était une mosaïque (2n/3n) ce qui apparaît exceptionnel après un choc thermique⁹. Le lot de 8 receveurs élevé d'autre part comportait 2 diploïdes et 6 triploïdes; l'analyse de la descendance de 3 de ces triploïdes mâles est en cours.

L'animal R35 s'est révélé particulièrement intéressant bien qu'il s'agit d'une mosaïque. En Février 1969, il portait une gonade droite vestigiale représentée par une très mince bandelette blanchâtre qui s'est transformée, après l'ablation du testicule gauche, en un testicule fonctionnel et, en Novembre 1969, le mâle R35 a fécondé les œufs d'une femelle standard; 6 mâles et 10 femelles ont été obtenus. Jusqu'à présent 5 de ces 10 femelles ont été éprouvées quant à la sex-ratio de leurs descendance; 4 ont donné naissance à des mâles et des femelles en nombre égal et la cinquième a fourni 2 pontes successives composées uniquement de femelles (respectivement 29 et 22 femelles), il s'agit vraisemblablement d'un individu WW.

Discussion et conclusion. Le seul individu mosaïque (2n/3n) observé par BEETSCHEN⁹ ne fut pas viable. Dans le cas du mâle R35 on peut envisager le passage, lors de la transplantation, de quelques cellules germinales primordiales diploïdes à partir du greffon vers le côté gauche d'un individu triploïde homogène; ceci expliquerait la présence simultanée sur les squashes du testicule gauche de figures de prophase méiotique de cellules diploïdes et triploïdes (reconnaissance de monovalents, bivalents et trivalents). L'inhibition de la gonade contra-latérale à la suite de la transplantation d'un testicule et la reprise du développement de cette gonade après l'ablation du testicule avaient déjà été observées chez l'Ambystome³. Ce phénomène est en cours d'étude. En effet, la possibilité d'utiliser désormais des pontes unisexuées (mâles ou femelles) nous permet d'aborder sur de nouvelles bases

¹ C. L. FOOTE, revue in *Intersexuality in Vertebrates including Man* (Ed. C. N. ARMSTRONG and A. J. MARSHALL; Academic Press, London and New York 1964), p. 233.

² L. GALLIEN, Bull. biol. Fr. Belg. 88, 1 (1954).

³ R. R. HUMPHREY, Am. J. Anat. 76, 33 (1945).

⁴ R. R. HUMPHREY, Anat. Rec. 82, 77 (1942).

⁵ K. MIKAMO et E. WITSCHI, Genetics 48, 1411 (1963).

⁶ L. GALLIEN et M. DUROCHER, Bull. biol. Fr. Belg. 91, 97 (1957).

⁷ J. C. LACROIX et A. CAPURON, C. r. Acad. Sci., Paris 263, 1244 (1966).

⁸ J. P. MAUFRÖID et A. CAPURON, Wilhelm Roux Arch. Entw. Mech. 170, 234 (1972).

⁹ J. C. BEETSCHEN, Bull. biol. Fr. Belg. 93, 12 (1960).

¹⁰ J. C. LACROIX, C. r. Acad. Sci. Paris 264, 85 (1967).

¹¹ C. GUILLEMIN, C. r. Acad. Sci. Paris 275, 1895 (1972).

méthodologiques l'analyse expérimentale des mécanismes de la différenciation sexuelle des gonades chez le Triton *Pleurodeles waltlii* Michah.

Summary. Thanks to a method established by HUMPHREY³ in *Ambystoma* sp. and founded on the orthotopic transplantation of the lateral mesoderm corresponding to the gonad primordium, we have produced, in the Salamander *Pleurodeles waltlii* Michah., 1 female which gives rise uniquely to female individuals. In this species, it is also possible to obtain, by an oestrogenic treatment during the larval stages of development, neo-females; these are genetic males feminized into phenotypic and

perfectly functional females and their offsprings are uniquely composed of males². The ability to experiment at will with unisexual, male or female, offsprings allows us to attack from a new basis, before any perceptible gonadic sex differentiation, the analysis of the mechanisms of this differentiation in the Salamander *Pleurodeles waltlii* Michah.

A. COLLENOT

Laboratoire de Biologie animale 7 PCEM,
Université Paris VI, 4, Place Jussieu,
F-75230 Paris Cedex 05 (France), 23 Février 1973.

Observations on the Staining of Centromeric Heterochromatin with Giemsa

Since the observation of PARDUE and GALL¹ of a denser staining of the centromeric regions with Giemsa as a result of the experimental sequence used to anneal satellite DNA to mouse chromosomes, techniques to reveal centromeric heterochromatin after denaturation-reassociation procedures have been developed^{2,3}. It has been suggested that the Giemsa stain demonstrates reassociated (repetitive) versus non-reassociated DNA²⁻⁶. It is noteworthy that Giemsa-stained regions, in addition to the centromeric ones (G bands)^{7,8-10}, can also be revealed by other procedures where a denaturing-reassociating mechanism cannot possibly be involved¹¹⁻¹⁴. Our observations on in situ DNA denaturation and reassociation, as revealed by acridine orange fluorescence¹⁵, are also not consistent with the assumed interpretation. In the present experiments, the mechanism of the centric heterochromatin staining by Giemsa is investigated.

Material and methods. Standard flame-dried preparations of thymus and bone marrow cells of C3H/BA inbred mice and of lymphatic cells of mice bearing transplantable leukemias were employed. In some cases, a postfixation of the slides in 4% formaldehyde or 2.5% glutaraldehyde for 4-18 h was made. Slides were treated with 0.07N NaOH, rinsed in running tap water, dried at 37°C and stained either with Giemsa (1:10 in phosphate buffer at pH 6.8) for 10-15 min, acridine orange (AO) or by the Feulgen reaction. Some preparations were treated with DNase (2 mg/ml in phosphate buffer at pH 6.0) at 37°C for 4-5 h, followed or not by 5% trichloroacetic acid (90°C, 15-20 min) before staining.

Results and discussion. The treatment of mouse chromosomes with 0.07N NaOH for 1-2 min, without further incubations in special conditions, results in a much denser staining of the centromeric regions with Giemsa, in relation to the arms (Figure 1). Very conspicuous interphase chromocenters are also observed (Figure 2). After a longer exposure (4-5 min), the chromosomes present a swollen and empty appearance although the contrast between centric regions and arms is enhanced; a variable proportion of metaphases is severely damaged.

Nuclei and chromosomes of preparations, treated 1-2 min with NaOH fluoresce green if stained with AO, indicating a double-stranded condition of DNA; only a few nuclei and metaphases show a yellow or red-orange emission. No differences in color or intensity of fluorescence between centromeric regions and arms are apparent (Figure 3). The Feulgen reaction also fails to reveal any differential staining of the centromeric regions (Figure 4). A 12-24 h incubation in 2 × SSC at 65°C of slides treated with NaOH (1-2 min) enhances the intensity contrast between centric regions and arms in Giemsa-stained

chromosomes. In these conditions, AO does not demonstrate any difference in color or intensity of fluorescence along the chromosomes in the majority of metaphases; this result is in disagreement with the findings of DE LA CHAPELLE et al.¹⁶. Remarkably, the incubation of untreated preparations also results in a heavier centromeric staining with Giemsa; in some metaphases, a banding pattern along the chromatids is also noticeable.

In aldehyde-postfixed preparations, the exposure to NaOH leads to no centric differentiation with Giemsa, the chromosomes staining uniformly, with an intensity equal to that of control slides (not postfixed nor subjected to NaOH). We have previously reported¹⁵ a similar lack of centromeric differentiation with Giemsa in aldehyde-postfixed chromosomes subjected to heating (a procedure also used to reveal centromeric heterochromatin, 3).

On the other hand, the differential staining of the centric regions with Giemsa is also positive if the NaOH treatment is followed by DNase incubation (Figure 5). Prolonged staining times (up to 4-6 h) are however required. DNA extraction was controlled with AO in similarly treated preparations.

The present and previous¹⁵ results indicate that the centromeric differentiation demonstrated by the Giemsa stain after exposure to heat or alkaline solutions is independent of the strandedness of chromosomal DNA as revealed by AO. That the treatment with NaOH in the time limits studied does not produce an unequal extraction of DNA from the arms in relation to the centromeric

¹ M. L. PARDUE and J. G. GALL, *Science* 168, 1356 (1970).

² F. E. ARRIGHI and T. C. HSU, *Cytogenetics* 10, 81 (1971).

³ J. J. YUNIS, L. ROLDAN, W. G. YASMEH and J. C. LEE, *Nature* 237, 532 (1971).

⁴ J. J. YUNIS and W. G. YASMEH, *Science* 174, 1200 (1971).

⁵ N. O. BIANCHI, B. H. SWEET and J. AYRES, *Exptl Cell Res.* 69, 236 (1971).

⁶ F. PERA, *Chromosoma* 36, 263 (1972).

⁷ 4th. Int. Conf. Standards in Human Cytogenetics, Paris (1971).

⁸ M. E. DRETS and M. W. SHAW, *Proc. natn. Acad. Sci.* 68, 2073 (1971).

⁹ W. SCHNEDL, *Chromosoma* 35, 111 (1971).

¹⁰ A. T. SUMNER, H. J. EVANS and R. A. BUCKLAND, *Nature New Biol.* 232, 31 (1971).

¹¹ B. DUTRILLAUX, J. DE GROUCHY, C. FINAZ and J. LEJEUNE, *C. r. hebdom. Séanc. Acad. Sci., Paris* 273, 587 (1971).

¹² H. KATO and T. H. YOSIDA, *Chromosoma* 36, 272 (1972).

¹³ M. SEABRIGHT, *Lancet* 2, 971 (1971).

¹⁴ S. PATIL, S. MERRICK and H. A. LUBS, *Science* 173, 821 (1971).

¹⁵ J. C. STOCKERT and J. A. LISANTI, *Chromosoma* 37, 117 (1972).

¹⁶ A. DE LA CHAPELLE, J. SCHRÖDER and R. K. SELANDER, *Hereditas* 69, 149 (1971).