

quired for long-term storage. However, considerable care would be necessary to ensure that the environment does not become too dry for seed stored on a long-term basis.

The large variability between replications due to the small number of seeds used in this experiment often resulted in failure to find statistically significant differences between means with large numerical differences. How-

ever, similar results were obtained with cabbage and onion seed in another trial, as well as after a 7-week storage period in this investigation. The differences noted in this paper clearly indicate a beneficial influence of LPS upon short-lived seeds. Further research on the application of LPS to long-term conservation of seeds is clearly required.

## Transmission expérimentale d'un facteur responsable de l'intersexualité des mâles chez *Orchestia gammarellus* (Pallas)

### Experimental Transmission of a Factor Responsible of Male Intersexuality in *Orchestia gammarellus* (Pallas)

T. GINSBURGER-VOGEL et M. C. CARRÉ-LECUYER

Laboratoire de Biologie et Génétique évolutives du C.N.R.S., F-91190 Gif-sur-Yvette (France); et E.N.S., F-92210 Saint-Cloud (France), 16 février 1976.

**Summary.** Grafts of male-intersex or thelygenous female organs induce oostegit development in normal males. The factor responsible of this intersexuality is experimentally transmissible. It is not strictly specific; it can provoke the appearance of oostegits in males of *Talitrus saltator* and *Orchestia cavimana*.

L'intersexualité des mâles, observée dans certaines populations de l'amphipode *Orchestia gammarellus* (Pallas) a été reliée à des anomalies de la proportion des sexes<sup>1,2</sup>: il existe des femelles dont la descendance est constituée d'une majorité de femelles (80 à 85%) lorsqu'elles sont élevées et croisées à 17°C. Les mâles issus de ces femelles thélygènes sont, en règle générale, intersexués; ils sont caractérisés par la possession d'oostégites et de gnathopodes anormaux, à lobe juvénile persistant<sup>3</sup>. Chez *Orchestia gammarellus*, ces anomalies sont thermosensibles dans la plupart des lignées<sup>4</sup>. Elles persistent dans les élevages maintenus à 17°C et disparaissent totalement à 22°C.

La démonstration du mode de transmission matrocline de la thélygénie et de l'intersexualité<sup>2,5</sup> nous a conduit à émettre l'hypothèse de l'existence d'un facteur féminisant thermosensible qui serait responsable de la thélygénie des femelles et de l'intersexualité des mâles. Par des expériences d'implantation ou d'injection de broyats d'organes, nous avons cherché à savoir si ce facteur peut être transmis à des mâles normaux, c'est à dire si l'on peut induire chez ceux-ci l'apparition d'oostégites. Un résultat positif constituerait un puissant argument en faveur de l'existence et de la nature infectieuse de l'agent féminisant.

**Matériel et méthodes.** Divers organes ou broyats d'organes de mâles intersexués (testicules, glandes androgènes, muscles, hémolymphé) et de femelles thélygènes

(ovaires) sont implantés ou injectés dans des mâles normaux de même espèce (implantations homospécifiques). Des implantations hétérospecifiques ont été réalisées chez *Orchestia cavimana* et *Talitrus saltator*. Les implantations d'organes sont réalisées à l'aide de brucelles fines, les injections effectuées avec des seringues Hamilton No 701; 5 à 10 µl de broyat dilué (20 ovaires dans 250 µl d'eau de mer 2/3) sont injectés dans chaque receveur.

Pour chaque série expérimentale, des témoins ont été réalisés en greffant ou en injectant des organes homologues d'individus normaux, afin d'éliminer l'hypothèse d'une influence de l'implantation ou de l'injection. Les opérés sont élevés isolément en enceinte thermostatée à 17°C.

**Résultats.** A) Implantations homospécifiques. Le Tableau indique les résultats observés pour chaque type d'implantation ou d'injection.

Nous constatons que des mâles normaux peuvent acquérir des oostégites lorsqu'ils reçoivent des implants provenant de mâles intersexués ou de femelles thély-

<sup>1</sup> T. GINSBURGER-VOGEL, Archs Zool. exp. gén. 114, 397 (1973).

<sup>2</sup> T. GINSBURGER-VOGEL, in *Intersexuality in the Animal Kingdom* (Ed. R. REINBOTH; Springer-Verlag, Berlin 1975), p. 106.

<sup>3</sup> H. CHARNIAUX-COTTON, Congr. A.F.A.S. (1953), p. 447.

<sup>4</sup> T. GINSBURGER-VOGEL, Archs Zool. exp. gén. 115, 93 (1974).

<sup>5</sup> T. GINSBURGER-VOGEL, Publ. Staz. Zool. Napoli 39, Suppl., 417 (1975).

Résultat des implantations ou injections d'organes de mâles intersexués ou de femelles thélygènes dans des mâles normaux.

	Nature de l'organe implanté				
	Glande androgène	Testicule	Muscle	Sang	Ovaire
No. de receveurs	30	27	30	30	31
No. de survivants 4 mois après l'opération	24	24	29	21	31
No. d'individus ayant différencié 1 ou plusieurs oostégites	8	10	10	9	15
Cas positifs (%)	33,3	41,6	34,5	42,8	48,4

gènes. La nature de l'organe utilisé semble indifférente, puisque nous obtenons des cas positifs dans les 5 séries d'expériences et que les pourcentages de réussite sont toujours très voisins. Ce pourcentage est légèrement supérieur lors des injections de broyats d'ovaires de femelles thélygènes. Les résultats des témoins ont toujours été négatifs: les implantations d'organes provenant de mâles normaux sont incapables d'induire le développement des oostégites chez les mâles normaux; il en est de même pour les injections de broyats d'ovaires de femelles normales.

Ces expériences démontrent que le facteur responsable de la différenciation d'ostégites chez les mâles intersexués peut être transmis expérimentalement à des mâles normaux; ceux-ci acquièrent l'une des caractéristiques morphologiques des intersexués. En général, la forme des gnathopodes n'est pas modifiée; dans 3 cas seulement ces gnathopodes ont évolué vers la forme des gnathopodes de mâles intersexués.

Une expérience complémentaire montre que les organes des mâles transformés en intersexués peuvent à leur tour induire l'apparition d'ostégites chez des mâles normaux. Des ostégites se sont différenciés quel que soit l'organe implanté: 6 cas positifs sur 11 avec les implants de glande androgène, 8/12 avec des implants testiculaires, 1/10 avec des implants de muscles, 1/8 avec des implants de vésicules séminales, soit un total de 16/41. Le pourcentage moyen de réussite (39%) est très voisin de celui obtenu dans la première expérience (40%). Nous pouvons conclure de cette expérience que le facteur responsable de l'intersexualité est capable de se multiplier dans des mâles normaux.

B) Implantations hétérospécifiques. Afin de déterminer si le facteur responsable de l'intersexualité est spécifique, des expériences analogues ont été réalisées en utilisant comme receveurs les mâles de deux espèces où l'intersexualité des caractères sexuels externes n'est pas connue: *Orchestia cavimana* et *Talitrus saltator*.

Chez *Talitrus saltator*, nous avons observé 11 cas positifs sur 13 et 19 sur 26 chez *Orchestia cavimana*. La proportion de cas positifs est, dans les deux espèces, supérieure à celle obtenue chez *Orchestia gammarellus*. Des indices d'une plus forte intersexualité se sont manifestées chez *O. cavimana*: les gnathopodes de quatre intersexués expérimentaux se sont dédifférenciés et ont évolué vers une forme intermédiaire entre la forme mâle et la forme

femelle; d'autre part les ostégites de ces intersexués ont développé des soies juvéniles, ce qui n'a jamais été observé chez les intersexués d'*Orchestia gammarellus*.

*Discussion.* Ces expériences renforcent l'hypothèse de l'existence d'un facteur épigénétique responsable de l'intersexualité des mâles. Elles démontrent que ce facteur possède un pouvoir infectieux et qu'il n'est pas localisé dans les gonades. Les implantations hétérospécifiques indiquent une absence de spécificité du facteur, au moins entre espèces voisines.

L'aspect paradoxal du développement d'ostégites chez des mâles normaux doit être souligné. Chez *Orchestia gammarellus*, la différenciation des ostégites n'est pas un caractère sexuel neutre inhibé par la glande androgène. De nombreuses expériences<sup>6</sup> ont démontré que la présence des ovaires est indispensable à la différenciation des ostégites: ceux-ci ne se différencient jamais spontanément chez des mâles privés de glandes androgènes, mais apparaissent après l'implantation d'un fragment d'ovaire. Nous retrouvons, lors de nos expériences, un résultat déjà observé par CHARNIAUX-COTTON<sup>7</sup>: les glandes androgènes des mâles intersexués peuvent induire l'intersexualité chez des mâles normaux. Cette action peut difficilement être imputée à des anomalies de l'hormone androgène comme le conclut CHARNIAUX-COTTON<sup>8</sup>, puisque d'autres organes de mâles intersexués ou de femelles thélygènes ont la même action.

On pourrait supposer que le facteur intersexualisant agit au niveau de la glande androgène et de l'appareil génital *in situ*. Toutefois, des observations préliminaires indiquent que la présence des glandes androgènes et des testicules autochtones n'est pas nécessaire à la différenciation des ostégites. Celle-ci a été observée après l'injection de 5 ml de broyat de muscles de mâles intersexués dans des mâles privés de leurs glandes androgènes ou de leurs testicules.

A titre d'hypothèse, on peut penser que le facteur responsable de l'intersexualité agit directement au niveau des cellules épithéliales intervenant dans la formation des ostégites.

<sup>6</sup> H. CHARNIAUX-COTTON, in *Organogenesis* (Eds. H. DE HAAN and H. URSPRUNG; Holt, Rinehart and Winston, New York 1965), p. 701.

<sup>7</sup> H. CHARNIAUX-COTTON, C. r. Acad. Sci., Paris 245, 1665 (1957).

<sup>8</sup> H. CHARNIAUX-COTTON, Bull. Soc. Zool. 87, 338 (1962).

## Metabolic Requirements for Entry of DNA in *Branhamella catarrhalis*

G. BRYANT and R. B. OTERO<sup>1</sup>

Department of Biological Sciences, Eastern Kentucky University, Richmond (Kentucky 40475, USA), 5 April 1976.

**Summary.** Although requirements for transformation in *Branhamella catarrhalis* are quite complex, DNA synthesis does not appear to be one of these needs, as indicated by the inability of nalidixic acid to interfere with transformation. Exogenous sources of energy, such as cAMP and cGMP, also failed to enhance frequency, suggesting cells may actively engage in energy production to achieve uptake of DNA, or lack a transport mechanism for these compounds.

Previous reports<sup>2,3</sup> have shown that *Branhamella catarrhalis* (formerly known as *Neisseria catarrhalis*<sup>4</sup>) transformation can be inhibited with antibodies, various chemical inhibitors, and antibiotics. These studies have further demonstrated that *B. catarrhalis* transformation is dependent on: 1. protein synthesis as evidenced by chloramphenicol inhibition; 2. sites present on cell surface as sodium periodate and specific antibodies interfered

with transformational frequency; 3. cell wall formation as indicated by cycloserine interference; and 4. energy as shown by dinitrophenol intervention.

This study was concerned with the effects of nalidixic acid, an inhibitor of DNA synthesis<sup>5</sup>, to determine if this activity is required for DNA entry in this system. Also, the effects of adding an exogenous supply of energy molecules, such as cyclic adenosine monophosphate and