

Differenzierungspotenzen und Geschlechtsstabilität der I-Zellen von *Hydractinia echinata*

WERNER MÜLLER

Zoophysiolgisches Institut der Universität Tübingen

Eingegangen am 3. April 1967

A. Einleitung

Der schon von KLEINEBERG (1872) erkannte embryonale Charakter der I-Zellen (IZ) hat die Frage nach ihrer Funktion und ihren Differenzierungspotenzen zum Anlaß zahlreicher Untersuchungen werden lassen. Dennoch ist diese Frage noch nicht endgültig geklärt. Die I-Zellentheorie hat alle morphogenetischen Leistungen des adulten Hydroiden-Organismus, die bei der vegetativen Fortpflanzung und der Regeneration so eindrucksvoll in Erscheinung treten, von der Existenz dieser Reserveelemente abhängig erklärt. Sie stützt sich dabei im wesentlichen auf histologische Zustandsaufnahmen und auf den Befund STRELINs (1928), wonach Hydren, deren IZ durch eine dosierte Röntgenbestrahlung eliminiert werden, die Fähigkeit zur Knospung und Regeneration verlieren. Ein Röntgeninsult hinterläßt aber auch in differenzierten Epithelzellen (EPZ) breitgestreute Defekte. Deshalb ist es nicht möglich, allgemeine Degenerationserscheinungen zweifelsfrei von solchen Defekten zu trennen, deren unmittelbare Ursache der IZ-Mangel ist. Ebenso wenig sind jene Parabiose-Versuche, die bei gonochoristischen Hydrozoen eine modifikatorische Geschlechtsbestimmung und die Existenz von Termonen zu belegen schienen, beweiskräftig. Bei experimentell erzeugten Sexualchimären tritt im ursprünglich weiblichen Partner eine Geschlechtsinversion auf. Da die Geschlechtsprodukte Derivate der IZ sind, wirft dieser Befund die Frage nach ihrer sexuellen Stabilität auf. GOETSCH (1927), WIESE (1953) und PIRARD (1961) deuten auf Grund ihrer Pfropfexperimente an getrenntgeschlechtlichen Klonen von *Hydra attenuata*, *Pelmatohydra oligactis* und *H. fusca* den Geschlechtsumschlag als Resultat einer Diffusion hormonartiger Substanzen von einem Pfropfpartner zum anderen. Sie schließen auf modifikatorische Geschlechtsbestimmung, kalkulieren aber nicht die ausgeprägte Wanderfähigkeit der IZ ein. MÜLLER (1964) legt auf Grund verschiedenartiger Transplantationsexperimente an *Hydractinia echinata* Argumente vor, die zumindest bei dieser Art die Geschlechtsinversion als Folge überwandernder IZ erscheinen lassen. Die sexuelle Determination der IZ wird als stabil gedeutet.

Vorliegende, wieder an *Hydractinia* durchgeführte Arbeit unterzieht die Entwicklungspotenzen der IZ und die These ihrer stabilen sexuellen Determiniertheit einer erneuten Analyse. Dieses stockbildende Hydrozoon wurde deshalb gewählt, a) weil zum Markieren der IZ tritiierte Nukleotide direkt im Medium gelöst appliziert werden können, b) weil *Hydractinia* eher als die in vielfacher Beziehung aberranten Hydren den Typus des Hydrozoons repräsentiert. Wir nehmen dennoch ausdrücklich davon Abstand, die Resultate auf andere Arten zu extrapolieren.

B. Methode

Stammklone werden nach der Methode HAUENSCHILD^s (1954) im Labor vom Ei auf gezüchtet. Von jedem Klon wird eine Liste angelegt, die seine Gewebeträglichkeit gegenüber allen anderen Klonen verzeichnet enthält (Test nach HAUENSCHILD, 1956). Zu Versuchszwecken werden von den Stammklonen Ableger auf

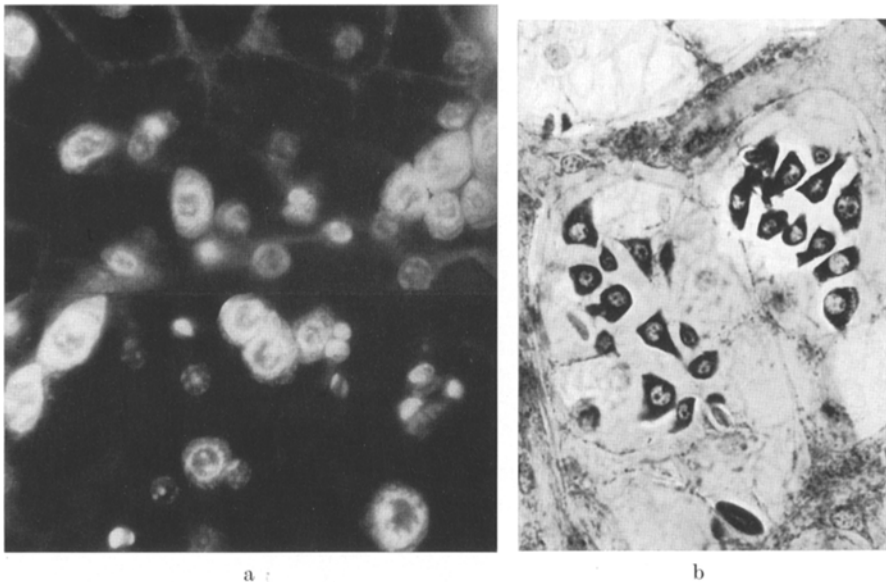


Abb. 1. Fluoreszenzmikroskopische (a) und histologische (b) Darstellung der I-Zellen in der Stolonenplatte. a Acridinorange, b Giemsa

Deckgläser angelegt, wobei das Ausgangsgewebe dem inneren Bereich der Stolonenplatte entnommen wird. Die als geschlossene Fläche sich ausbreitende Stolonenplatte kann analog einer Gewebekultur direkt den histologischen und autoradiographischen Verfahren unterzogen werden. Die IZ fixierter Präparate werden nach Fluorochromierung mit Acridinorange im Fluoreszenzmikroskop (Leitz Ortholux, Erregerfilter BG 12 + BG 38, Sperrfilter K 530) sichtbar gemacht oder nach MÜLLER (1964) histologisch dargestellt (Abb. 1). Zur Elimination der IZ werden die Stücke wahlweise mit 18000 r bestrahlt (Schichtdicke des Seewassers 1 mm) oder mit folgenden Lösungen inkubiert: Mitomycin 0,06 mM/l, 18 Std, oder Dichloren

0,64 mM/l, 10 min, oder Trenimon 0,18 mM/l, 10 min. Tritiierte Nukleotide werden in Seewasser gelöst appliziert. Zur Ermittlung der relativen Mitoseraten wird ^3H -Thymidin (spez. Aktivität 13 Ci/mM) bei einer Inkubationszeit von 20 min zu 4 $\mu\text{Ci/ml}$ dosiert; zur Markierung der IZ wird, um möglichst viele in der Mitosephase zu erreichen, die Inkubationszeit auf 18 Std verlängert, die Aktivität entsprechend auf 0,2—0,3 $\mu\text{Ci/ml}$ erniedrigt und dem Inkubationsmedium Spuren der übrigen DNS-Nukleotide zugesetzt. Nach Auswaschen mit inaktivem Träger (0,01 mM/l Thymidin) werden die Stöcke gefriergetrocknet (Isopentan in flüssiger Luft, Gewebetrockner nach PEARSE) oder mit Glutaraldehyd (6% in Seewasser) fixiert. Vor dem Überzug der Fotoemulsion (Kodak AR-10 oder NTB3) werden die Polypen und inkrustierten Bereiche der Stolonenplatte entfernt, um in Serienschritte zerlegt zu werden. Die nach einer Expositionszeit von 12 Tagen in Ultrafilm 1:5 entwickelten Autoradiogramme lassen sich nach DUDÉ et al. (1955) mit Giemsa färben, doch kontrastieren die Silbergranula nur schwach gegen das blaue Plasma der IZ. Ein Verfahren, das eine fluoreszenzmikroskopische Analyse fertiger Autoradiogramme erlaubt, wird an anderer Stelle beschrieben werden.

C. Ergebnisse

I. Die morphogenetischen Leistungen ihrer I-Zellen beraubter Stöcke

Nach unseren Befunden führen die alkylierenden Cytostatica Mitomycin C, Dichloren und Trenimon ebenso wie ein Röntgeninsult zur Lyse der IZ. Diese Pharmaka greifen wahrscheinlich primär die in den IZ hochaktiven Mechanismen der RNS-Synthese an und führen sekundär zur Zerstörung der DNS-Struktur (MÜLLER, im Druck). Die cytotoxische Wirkungsbreite ist dabei besonders bei Mitomycin enger als das Wirkungsspektrum einer zur IZ-Elimination ausreichenden Röntgendosis. Mitomycin lysiert selektiv die IZ; die in den differenzierten Zellen auftretenden Intoxikationen sind, soweit histologisch nachweisbar, reversibel. Röntgenstrahlen und Dichloren zerstören auch sich differenzierende Nervenzellen; Trenimon darüber hinaus die Cnidoblasten. Auch im Erscheinungsbild und in der Reaktionsfähigkeit der Polypen sind nach Applikation von Mitomycin im Gegensatz zu den übrigen lytischen Agentien keine Frühschäden zu erkennen. Diese Befunde werden nutzbar gemacht, die IZ-unabhängigen morphogenetischen Leistungen der *Hydractinia* aufzudecken. Durch Subtraktion der morphogenetischen Fähigkeiten IZ-freier Kulturen von den Leistungen intakter Stöcke sollten diejenigen Leistungen zu ermitteln sein, für welche die Anwesenheit der IZ obligatorisch ist.

Wir finden: *Auch die restlose Elimination der IZ nimmt dem Hydractinia-Stock weder die Fähigkeit zur Regeneration noch die Potenz zum stolonialen Wachstum und zur Erzeugung neuer Polypen. Unabhängig vom eingesetzten lytischen Agens hebt nach einer zweitägigen Karenzzeit die mitotische Aktivität der EPZ im peripheren Stockbereich wieder an und steigt sogar über das Normalmaß hinaus. Die Teilungsaktivität*

drückt sich mittelbar in der Anzahl neu entstandener Polypknospen aus. Wird zur Korrektur der unterschiedlichen Stockgrößen der Quotient $\frac{n \text{ Knospen}}{\sum \text{ Polypen}}$ gebildet, so liegt der Wert im Zeitraum von 5—20 Tagen nach der Applikation eines alkylierenden Agens bei 0,46 (Mittelwert von 30 Stöcken mit insgesamt 2258 Polypen) gegenüber 0,24 bei homoklonalen Kontrollen; d. h. die Knospungsrate ist um das Doppelte gestiegen. Auch nach Inkubation mit Trenimon, das die IZ noch vor dem Beginn dieser mitotischen Aktivitätsphase restlos eliminiert, entstehen neue Knospen. Demzufolge kommen die embryonalen Reservezellen nicht als Ausgangsmaterial der Knospung in Frage, vielmehr hat eine Entdifferenzierung und Umdetermination somatischer EPZ statt. Die aus den Knospen hervorgehenden Polypen sind erscheinungsbildlich normal und reagieren auf stockinterne rhythmische Erregungen und auf äußere Reize mit denselben Bewegungsstereotypien wie die übrigen Glieder des Stockes. Sie müssen demnach auch erregungsleitende Elemente entwickelt haben. Lediglich zwei Zelltypen fallen aus: Der Nachschub von Nesselzellen ist unterbunden, und ebenso werden keine Geschlechtszellen mehr erzeugt. Bemerkenswert ist, daß beim Fehlen von Geschlechtszellen die Blastostyle keine Gonophore mehr aussprossen, ein Hinweis darauf, daß die Gonophorenentwicklung erst unter dem Induktionsreiz der Sexualzellen einsetzt. Während der mitotischen Aktivitätsphase sind auch Regenerationen uneingeschränkt möglich. Ausschnitte aus der Stolonenplatte heilen zu, resektierte Peristome werden neu gebildet. Die Möglichkeit einer epigenetischen Regeneration hängt nur davon ab, daß der Schnitt im apikalen Drittel eines Nährpolypen und nicht unterhalb der Keimzone eines Blastostyls geführt wird. *Eine noch ausreichende Menge des „apikalen Faktors“*, der im Transplantationsexperiment als Induktor wirksam wird und vermutlich die polare Gestalt der Polypen aufrechterhält (MÜLLER, 1964), *ist Voraussetzung der Regeneration, nicht die Anwesenheit von IZ*. Ist die mitotische Aktivitätsphase abgeklungen, nimmt auch die Regenerationskapazität ab.

Diese Befunde belegen, daß auch in differenzierten Zelltypen in gewissem Umfang Genrepressionen aufgehoben werden können und eine Umsteuerung der für die Differenzierung relevanten Genaktivitäten möglich ist. Offen bleibt, in welchem Ausmaß dies bei einem gegebenen Zelltyp möglich ist. Jedenfalls scheinen in den EPZ diejenigen Gene irreversibel reprimiert zu sein, die für die Entwicklung von Nesselkapseln und von Geschlechtszellen notwendig sind. Diese Differenzierungspotenzen sind den IZ vorbehalten. Ihre wesentlichste Funktion ist es, für den Nachschub von Nesselzellen und Geschlechtszellen zu sorgen. Das bedeutet aber nicht, daß dies die einzigen Leistungen sind, zu denen sie überhaupt befähigt sind.

II. Die Differenzierungspotenzen der IZ

IZ-freie Kulturen sterben nach etwa 6 Wochen ab. Ob die Ursache dieser Degeneration unmittelbar die Folge des IZ-Mangels oder allgemeiner Spätdefekte ist, muß offenbleiben. Unabhängig davon sind solche Kulturen geeignete Systeme, die hier aufgeworfene Problemstellung zu bearbeiten. Sofern es gelingt, IZ — und möglichst nur solche — wieder einzuführen, so muß es sich erweisen, ob sie alle defekten Zellen des Wirtstockes zu ersetzen in der Lage sind und ihm unbeschränkte Vitalität zurückverleihen können.

1. Wiedereinführung homoklonaler IZ

Wird ins Zentrum IZ-freier Stücke Gewebematerial aus der Stolonenplatte eines homoklonalen, intakten Stockes implantiert, so breitet sich vom Implantationsort eine Gewebserneuerung aus, die äußerlich sichtbar wird. Die „Abnutzpigmente“ verschwinden, das Gewebe wird wieder transparent, die Entodermkanäle strecken sich, neue Polypen sprossen hervor. *Der Gewebserneuerung geht ein Ausschwärmen von IZ und Nessenzellen vom Implant ins Wirtsgewebe voraus* (Abb. 2). Die histologischen Zustandsbilder lassen bei einer solchen Versuchsanordnung jedoch keine Entscheidung darüber zu, ob die Gewebserneuerung allein auf Konto eingewanderter IZ geht, oder ob daneben ein sukzessiver Ersatz des Wirtsgewebes durch zentrifugal sich ausbreitendes Implantatgewebe stattfindet. Die zweite Möglichkeit muß um so mehr in Betracht gezogen werden, als bei manchen heteroklonalen Transplantationen eine solche Gewebsveränderung eindeutig nachgewiesen werden kann. Den Beweis für die Pluripotenz der IZ bringt folgender Versuch:

Sternförmig um einen trenimonbehandelten und deshalb IZ-freien Stock werden Tochterkulturen vom selben Klon angelegt. Die Satellitenkolonien werden dabei in direktem Kontakt zum Zentralstock gebracht und verwachsen mit ihm innerhalb von 24 Std. Nach weiteren 48 Std werden die Satellitenkulturen wieder abgetrennt, wobei der Schnitt parallel zu den Kontaktgrenzen innerhalb des Zentralstockes geführt wird. Die abgetrennten Gewebeteile werden entfernt. Diese Versuchsanordnung erlaubt, daß a) in kurzer Zeit zahlreiche IZ eingeführt, b) eventuell vorgedrungene EPZ der Spenderkulturen restlos entfernt werden können.

Von 25 derart mit IZ beimpften Kulturen überlebten 14. Zwar zeigten auch sie vorübergehend Degenerationssymptome, überstanden jedoch die Krisis, wuchsen weiter und wurden teilweise auch geschlechtsreif.

2. Aktivierung der Wander- und Teilungstätigkeit

a) *Wanderbewegung*. Nach STEPHAN-DUBOIS (1951) und TARDENT (1966) lösen durch Bestrahlung hervorgerufene Nekrosen und ähnliche

traumatische Erscheinungen noch keine gesteigerte Wanderung embryonaler Reservezellen aus. Als aktivierender Stimulus wird allein der Wundreiz gewertet. Da sich bei *Hydractinia*, im Gegensatz zu *Hydra*,

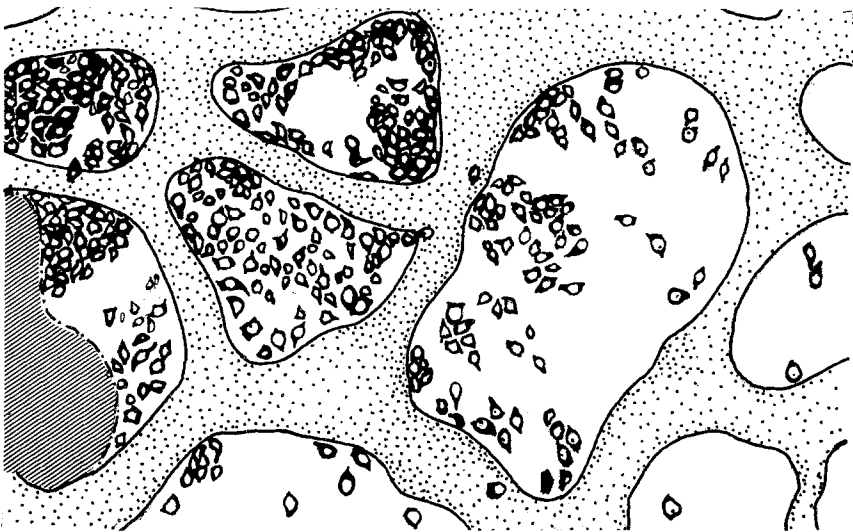
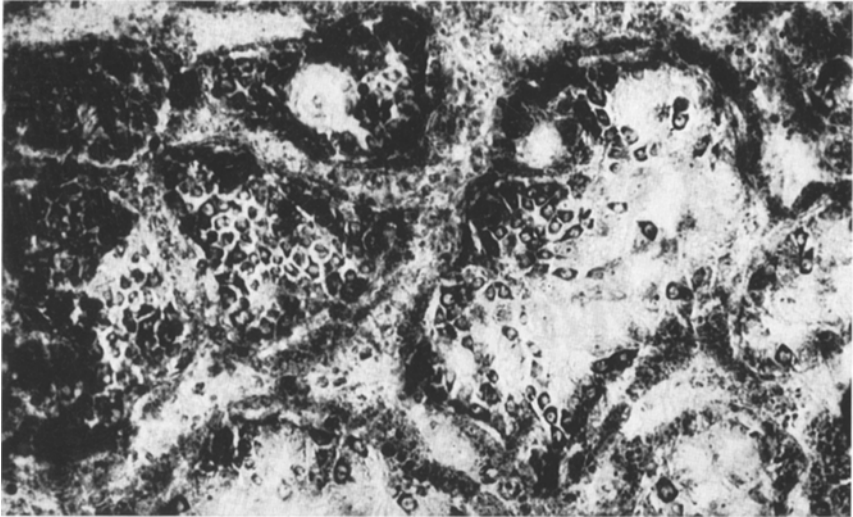


Abb. 2. Ausschwärmen der I-Zellen vom Implantat (linker Bildrand) in das Wirtsgewebe. In der Implantatnähe ist die Dichte der eingewanderten IZ so hoch, daß das Gewebe homogen dunkel erscheint. Totalpräparat der Stolonenplatte. Giemsa.

Zeichnung dazu: Schraffiert = Implantat; punktiert = Entodermkanäle

auch ohne Wundsetzung Parabiosen herstellen lassen, kann diese Hypothese unter Ausschaltung des Wundreizes geprüft werden. Als IZ-Quelle dienen intakte Spenderkulturen, als Empfänger IZ-freie Stöcke. Spender und Wirt verwachsen, wenn die meristematischen Stolonenplattenränder in Kontakt gebracht werden. Sofern Nekrosen die Wanderbewegungen stimulieren, kann bei Wirten im Zustand der Degeneration eine höhere Einwanderungsquote erwartet werden als bei frisch einem Röntgeninsult oder einem alkylierenden Pharmakon unterworfenen Stöcken. Die IZ der Spenderkulturen werden mit ^3H -Thymidin markiert und die Stöcke bereits 20 Std nach hergestelltem Gewebekontakt fixiert. Eine Markierung der Spenderzellen ist notwendig, weil bis zu 6 Tagen nach der Bestrahlung und bis zu 2 Tagen nach der Trennung noch wirtseigene IZ zugegen sind. Eine baldige Fixierung ist geboten, um Verfälschungen durch unterschiedliche Mitoseraten vorzubeugen. Eine verschieden starke Vermehrung der IZ im Wirt könnte eine unterschiedlich starke Einwanderung vortäuschen.

Zur Technik. Junge Kulturen werden in zwei Tochterkolonien zerlegt, indem das Substrat, ein Deckgläschen oder Kunstharzplättchen, zerteilt wird. Die eine Tochterkolonie wird 48 Std nach der Trennung mit 18000 r bestrahlt oder 20 min mit 40 $\mu\text{g/ml}$ Trenimon behandelt. Die andere Tochterkultur wird 18 Std mit 0,2—0,3 $\mu\text{Ci/ml}$ ^3H -Thymidin inkubiert, und zwar bei der Versuchsreihe A ebenfalls 2 Tage nach der Trennung, bei der Versuchsserie B erst dann, wenn sich die IZ-freie Kultur im Zustand der Degeneration befindet. Beide Tochterkulturen werden wiedervereinigt, indem die Substratteile ihrer ursprünglichen Lage entsprechend zusammengefügt werden. Als Hilfsmittel zur Montage dient eine Paraffinplatte mit einer Vertiefung, deren Maße dem Substrat genau angepaßt sind. Diese Platte gibt dem Stock bis zur Fixierung den nötigen Zusammenhalt. Das Verfahren hat den weiteren Vorteil, daß im Autoradiogramm kein Zweifel über den Verlauf der Verwachsungslinie möglich ist; denn sie ist identisch mit der Bruchlinie im Substrat. Allerdings lieferten die 130 eingesetzten Stöcke letztlich nur 23 auswertbare Präparate.

Als Maß der Einwanderungsquote Q gilt die Anzahl markierter Zellen im Wirt (Z_w), bezogen auf die Dichte solcher Zellen im Spender ($Z_s/100 \mu^2$) und auf die Länge der Verwachsungslinie in Millimeter. Beispielsweise ergibt sich $Q = 166$, wenn bei einer Kontaktlinie von 1 mm und bei 600 markierten Kernen pro Quadratmillimeter Spender-Stolonenplatte 100 markierte Zellen in die Stolonenplatte des Wirtes eingewandert sind. Die Versuchsgruppe A umfaßt 14 frisch ihrer IZ beraubte Stöcke, die Gruppe B 9 Wirtsstöcke im Zustand der Degeneration. Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Die Abweichung in der mittleren Differenz ist mit einer Überschreitungswahrscheinlichkeit von 5% gesichert. Die Befunde sind demnach mit der Annahme vereinbar, daß *die Wanderbewegungen der IZ um so mehr aktiviert werden, je mehr die Degenerationssymptome fortgeschritten sind.*

Tabelle 1. Quote eingewanderter markierter Spenderzellen bei frisch mit Trenimon behandelten Stöcken (A) und bei Stöcken im Zustand der Degeneration (B)

Gruppe	Stöcke	\bar{X}	SE
A	14	9	$\pm 1,63$
B	9	139	$\pm 30,0$

$P = 0,008$

$\bar{X} = \frac{Z_w}{(Z_s/100 \mu^2) \times l}$; Z_w = markierte Zellen im Wirt; $Z_s/100 \mu^2$ = Dichte markierter Zellen im Spender; l = Verwachsungslinie in mm.

b) *Mitotische Aktivität.* Eindeutiger sind die Differenzen, wenn die mitotische Aktivität der eingedrungenen IZ in Abhängigkeit vom Degenerationsgrad des Wirtsgewebes verglichen wird. In der Peripherie tre-

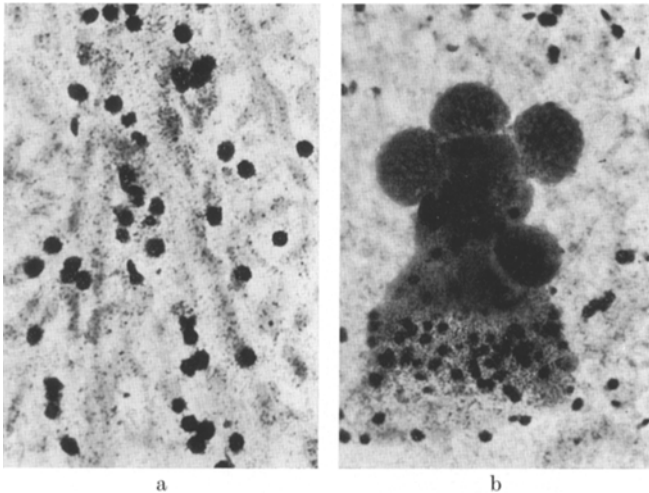


Abb. 3. Mitotische Aktivität der Spenderzellen im Wirtsgewebe. Ungefärbte Autoradiogramme nach einem 20 min-Puls mit ^3H -Thymidin. a Ausschnitt aus der Stolonenplatte; b junges Wirtsblastostyl

nimonbehandelter Stöcke werden homoklonale Satellitenkolonien als IZ-Spender angelegt, und zwar bei der Versuchsreihe A sogleich nach dem Auswaschen des Pharmakon, bei der Versuchsreihe B 30—40 Tage nach dem Trenimonschock. 48 Std nach hergestelltem Kontakt werden die von IZ neubesiedelten Stöcke 20 min mit $4 \mu\text{Ci/ml}$ tritiiertem Thymidin inkubiert und anschließend fixiert (Abb. 3). Verglichen wird der Prozentsatz der in der DNS-Synthesephase angetroffenen Wanderzellen während der Karenzzeit (Gruppe A) und während der Degenerationsphase (Gruppe B). Da zu diesen Zeiten die mitotische Aktivität der

Wirtszellen selbst ruht, kann der relative Anteil markierter Kerne ohne Korrektur als Maß der Teilungsaktivität der eingewanderten Zellen gewertet werden. Zum Vergleich wird durch Stichproben der Prozentsatz markierter IZ in normalen Populationen ermittelt, wobei nur Stöcke des gleichen Klons herangezogen werden (Kontrollgruppe C).

Ergebnis: Der Anteil der in der DNS-Synthesephase befindlichen IZ liegt bei der Gruppe A innerhalb der Streubreite der Kontrollwerte (C). Dagegen ist der mittlere Prozentsatz markierter Kerne bei den in degenerierende Stöcke (B) eingepflichten Zellen gegenüber A und C signifikant erhöht. Das besagt: *Je weiter die nekrotischen Erscheinungen im Wirtsgewebe fortgeschritten sind, desto höher ist die mitotische Aktivität der eingewanderten IZ.* Die Einzelwerte sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2. Bei einem 20 min-Puls mit ^3H -Thymidin in der DNS-Synthesephase angetroffener Anteil der I-Zellen in Wirtsstöcken während der Karenzzeit (0—2 Tage nach der Trenimongabe) = Gruppe A, in degenerierenden Wirtsstöcken (30—40 Tage nach der Trenimongabe) = Gruppe B, in normalen Kontrollstöcken = Gruppe C

Gruppe	Stöcke Σ	IZ Σ	Markierte IZ $\bar{X}\%$	Mittelwertfehler SE
A	18	3041 ^a	43%	$\pm 4,0$
B	11	2810 ^a	65%	$\pm 11,5$
C	10	5900 ^b	39%	$\pm 2,1$

$P = 0,00075$

^a Σ gefundener IZ; ^b Strichproben.

Der Prozentsatz synthetisch aktiver Zellen ist vermutlich größer als der im Autoradiogramm erfaßbare Anteil. Beim zweischichtigen Bau der Stolonenplatte muß mit einer erheblichen Selbstabsorption gerechnet werden. Dieser Fehler fällt aber nicht ins Gewicht, weil er bei allen Versuchsgruppen gleich ist und nur die relativen Werte von Belang sind.

3. Die Cytologie der Gewebeerneuerung

a) *Die Stolonenplatte.* Obzwar das histologische Bild keine Auskunft gibt, ob bei andauernder Verbindung von Wirt und Spender auch die EPZ des Spenders an der Restitution des beschädigten Gewebes teilhaben, so kann andererseits die Relevanz der IZ für die Gewebeerneuerung nicht bezweifelt werden. Von Implantaten, die ins Zentrum trenimonbehandelter Kulturen eingesetzt werden, dringen die IZ rasch ins Wirtsgewebe ein und besetzen auch den Randbereich der Stolonenplatte, die normalerweise frei von IZ ist. Die Dichteverteilung der IZ in Abhängigkeit von der Entfernung vom Implantat und von der Zeit zeigt einen charakteristischen Verlauf, der insbesondere bei Stöcken im Zustand der Degeneration deutlich wird (Abb. 4). Die Anzahl pro Flächeneinheit

steigt in der Umgebung des Implantates über das Normalmaß weit hinaus; oft sind die Zellen derart dicht gelagert und übereinandergeschichtet, daß ein Auszählen nicht mehr möglich ist. Das Dichtemaximum wandert vom Implantat weg der Peripherie zu. Während der Wanderphase liegen die IZ völlig ungeordnet. Ihr folgt eine Phase, in der sie sich stellenweise epithelartig zusammenlagern. Sie dehnen sich

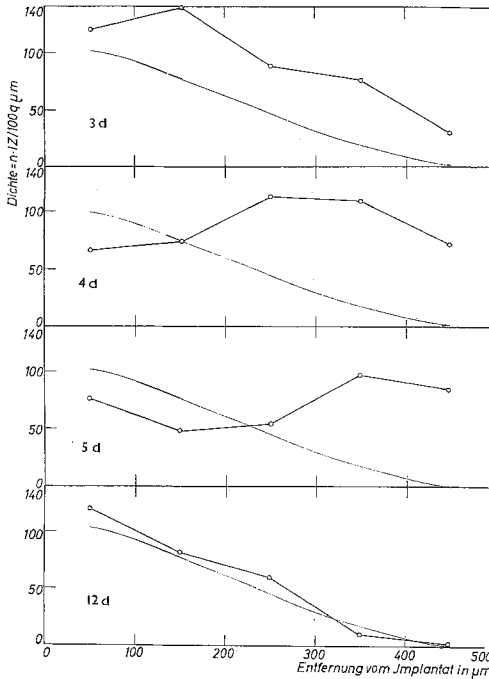


Abb. 4. Dichteverteilung der I-Zellen in Abhängigkeit von der Entfernung vom Spendergewebe und in Abhängigkeit von der Zeit nach dessen Implantation. Zum Vergleich ist jeweils die Normalverteilung der I-Zellen vom Zentrum zum Stolonplattenrand bei gleich großen (ca. 1,5 mm \varnothing) Kontrollstöcken angegeben

flächig aus und verlieren dabei an Basophilie, ein Ausdruck ihrer beginnenden Differenzierung. Wie sich der Ersatz der ursprünglichen Deckepithelien im einzelnen vollzieht, konnte wegen der geringen Transparenz der Präparate nicht festgestellt werden. Jedenfalls überdauert das untere Ektoderm länger als das obere. Nach vollzogener Gewebsrestitution sinkt die IZ-Dichte unter den Normalwert. Eine zweite Welle wandernder IZ bevölkert die erneuerten Bezirke. Erst diese lassen Cnidoblasten aus sich hervorgehen. Die IZ der ersten Wanderphase differenzieren sich vollständig zu EPZ. Diese Aussage wird durch folgendes Passagenexperiment gestützt:

In einen trenimonbehandelten und damit seiner eigenen IZ und seiner Cnidoblasten beraubten Stock wird als IZ-Quelle Normalgewebe implantiert. Dieses liefert zwar auch einige Cnidoblasten. Die hohe Teilungsaktivität der IZ im Wirtsgewebe verschiebt jedoch das Mengenverhältnis zu ungunsten der jungen Nesselzellen. Der Verdünnungseffekt wird potenziert, wenn Stücke des von Wanderzellen neu bevölkerten Gewebes in weitere IZ-freie Stöcke übertragen werden. Nach ein bis zwei solcher Passagen erhält man völlig cnidoblastenfreie, aber dennoch IZ-haltige Kulturen. In den zwölf so gewonnenen, in Abständen von 2 Tagen fixierten Kulturen waren erst in den letzten, d. i. nach vollendeter Gewebserneuerung, wieder junge Nesselzellen zu finden.

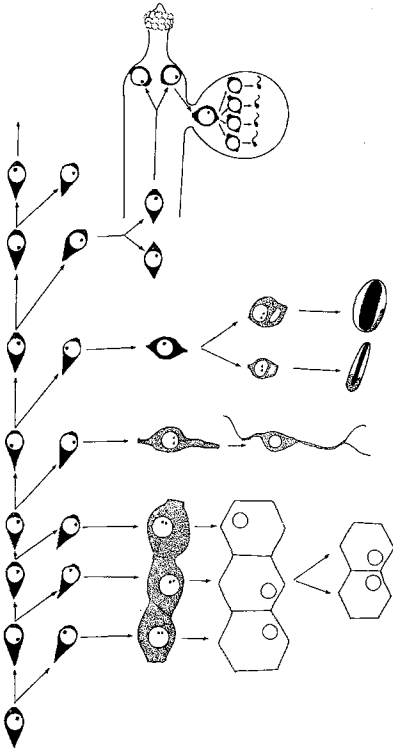


Abb. 5. Schema der Differenzierungsmöglichkeiten der I-Zellen. Im Zuge der Gewebserneuerung liefern die eingepflanzten IZ nacheinander Epithelzellen (EPZ), Nervenzellen (NZ), Nesselzellen (Cz) und nach Einwanderung in die Keimzone der Blastostyle Geschlechtszellen (SZ)

verhältnis zu ungunsten der jungen Nesselzellen. Der Verdünnungseffekt wird potenziert, wenn Stücke des von Wanderzellen neu bevölkerten Gewebes in weitere IZ-freie Stöcke übertragen werden. Nach ein bis zwei solcher Passagen erhält man völlig cnidoblastenfreie, aber dennoch IZ-haltige Kulturen. In den zwölf so gewonnenen, in Abständen von 2 Tagen fixierten Kulturen waren erst in den letzten, d. i. nach vollendeter Gewebserneuerung, wieder junge Nesselzellen zu finden.

Demgemäß ist ein hierarchisches System insofern zu erkennen, als die Reservezellen zunächst ausschließlich zum Ersatz defekter EPZ herangezogen werden und erst später zur Produktion von Nesselzellen und von Geschlechtszellen (Abb. 5).

b) Rekonstitution der Polypen.

Auch nach sofortigem Beimpfen eines mit alkylierenden Substanzen behandelten Stockes mit neuen IZ überdauern in der Regel nur wenige (ca. 16%) Polypen äußerlich unverändert. Manche werden gänzlich resorbiert (ca. 14%). Viele schmelzen ihr Peristom ein (ca. 50%), um ein neues auszubilden; in diesen

Fällen bleibt allein der basale Abschnitt der Polypen erscheinungsbildlich konstant. Nicht wenige Polypen (ca. 20%) schmelzen zu einem knospenartigen Rest zusammen; dieser entwickelt sich unabhängig vom ursprünglichen Differenzierungszustand des Polypen alternativ zu einem Nähr- oder Geschlechtspolypen.

Die apikalen Polypenstrukturen werden demnach nur selten von der Gewebsrestitution erfaßt; vielmehr werden sie epigenetisch regeneriert. Die Erklärung hierfür kann abgeleitet werden, wenn a) die Normalverteilung der Mitosen, b) die Normalverteilung der IZ, c) die gradientenartige Verteilung des „polarisierenden Faktors“ verglichen werden: Die Normalverteilung der nach Langzeitinkubation mit ^3H -Thymidin autoradiographisch erfaßten mitotischen Aktivität und die Normalverteilung der IZ in einem adulten Nährpolypen zeigt eine bemerkenswerte Korrelation: Im basalen Teil des Polypen bis zum Ansatz des Tentakelkranzes

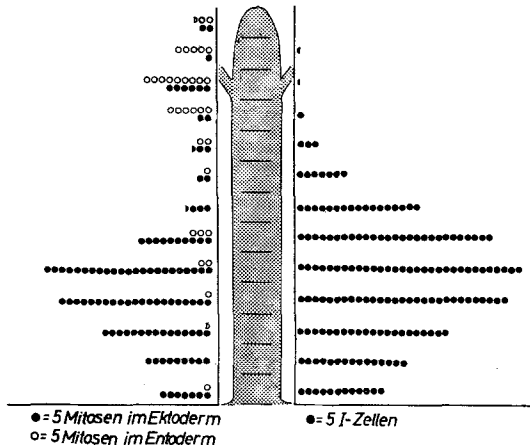


Abb. 6. Verteilung der I-Zellen (rechtes Diagramm) und der mitotischen Aktivität (linkes Diagramm) in einem adulten Nährpolypen

stimmen beide Kurven überein (Abb. 6). In den nach TARDENT (1966) ausgewerteten Autoradiogrammen sind denn auch die Silbergranula fast ausschließlich über IZ-Kernen lokalisiert. In diesem Abschnitt werden auch im Entoderm vereinzelt IZ angetroffen. Im apikalen, weitgehend IZ-freien Gewebe sind es dagegen differenzierte EPZ, deren Kerne markiert sind. Sie sind im Ekto- und Entoderm der Tentakelbasen, des peritentakulären Gewebes und im Mundfeld lokalisiert. Von Belang erscheint auch, daß die durch Silberimprägnation nach BODIAN darstellbare Stützlamelle im subtentakulären Polypenabschnitt von zahlreichen Poren durchbrochen ist, nicht aber im Mundfeld (Abb. 7).

Aus diesen Beobachtungen läßt sich folgendes ableiten: Der vom Tentakelkranz abwärts gerichtete, den laufenden Zellenverlust in der Polypenbasis kompensierende Materialschub (MÜLLER, 1964), wird von IZ gespeist, welche im Ektoderm bei gleichzeitiger Vermehrung hochwandern, sich in Ektodermzellen einerseits und nach Durchtritt durch

die Membranporen zu Entodermzellen andererseits differenzieren (Abb.8). Im Peristom dagegen leisten sich teilende EPZ selbst den Zellennachschub. Sistiert als Spätfolge des Pharmakoninsults die mitotische Aktivität, so fällt das Peristom der Degeneration anheim. Der basale Polypenabschnitt dagegen wird von Spender-IZ neu besiedelt, und diese leiten die Gewebsrestitution ein. Sofern die Menge der eingewanderten IZ nicht zur vollständigen Kompensation der zerfallenden Wirtszellen ausreicht, schmilzt der Polyp zu einem kleinen Restkörper zusammen. Dies

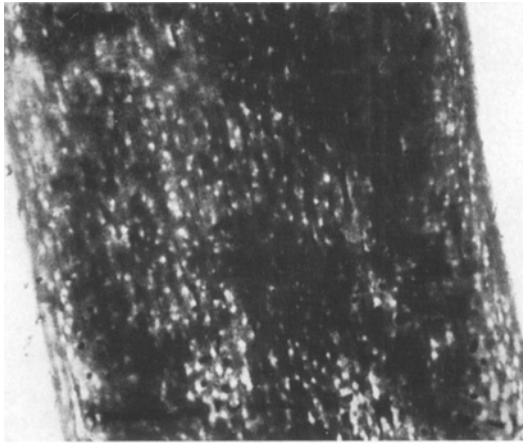


Abb. 7

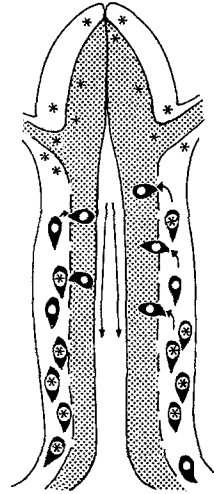


Abb. 8

Abb. 7. Poren in der Stützlamelle eines adulten Nährpolypen unterhalb des Tentakelkranzes. Silberimpregnation nach BODIAN. Totalpräparat

Abb. 8. Schema der Zellproliferation in einem Nährpolypen. Im subtentakulären Abschnitt leisten im Ektoderm hochwandernde, sich dabei teilende IZ den Nachschub für den dauernden Zellenverbrauch. Im Peristom sind differenzierte Zellen teilungsaktiv

hat zur Folge, daß der induzierende Faktor, der den Differenzierungstyp des Polypen bestimmt und dessen Maximum im Peristom liegt, verschwindet und bei der Regeneration wieder beide Differenzierungsrichtungen offen sind: Der Restkörper kann sich zu einem Nährpolypen oder zu einem Geschlechtspolypen entwickeln.

III. Die Eigenschaften mit heteroklonalen IZ beimpfter Kulturen

Sofern die Ausgangsklone unter sich wenigstens vorübergehend gewebeverträglich sind, lassen sich in IZ-freie Kulturen auch IZ fremder Klone einführen. Dies bietet die Möglichkeit, 1. die Frage nach der

Geschlechtsstabilität der IZ neu zu bearbeiten, 2. klonkonstante Merkmale dem Wirt zu „übertragen“; denn *der sukzessive Ersatz von Wirtszellen durch Spenderzellen verleiht dem Wirtsstock letztlich die Eigenschaften des Spenderklons. Der Wirt wird genotypisch identisch mit dem Spender.*

1. Die Geschlechtsstabilität der IZ

Bei Sexualchimären wird im Normalfall der weibliche Partner nach einer intersexen Zwischenstufe männlich. Wir hatten diese Maskulinisation dahingehend gedeutet, daß innerhalb der Keimzone der Geschlechtspolypen die teilungsaktiven Spermatogonien die mitotisch inaktiven Oocyten „verdünnen“ und letztlich verdrängen. Die Geschlechtsinversion tritt stets dann — und nur dann — ein, wenn das ♂ Spendergewebe IZ enthält, die ihrerseits nach Einwanderung in die ♀ Geschlechtspolypen Spermatogonien liefern. Da sich im Normalfall stets das ♂ Geschlecht durchsetzt, konnte jedoch nicht bewiesen werden, daß in ♂ Stöcke eingeführte IZ ♀er Spender ebenfalls ihr Geschlecht bewahren.

Durch vorhergehende Behandlung ♂er Wirtskulturen mit alkylierenden Pharmaka kann die Konkurrenz der ♂ IZ ausgeschaltet werden. Sofern die Hypothese der Geschlechtsstabilität zutrifft, müßte der mit IZ von ♀ Spendern beimpfte Stock rein ♀ werden, und zwar ohne intersexu Zwischenstufe. Bei insgesamt 21 Kombinationen von 3 geschlechtsdifferenten Klonpaaren wurden die ursprünglich ♂ Wirte auch ausnahmslos rein weiblich. Auch nach einer weiteren Passage durch ♂ Gewebe blieb das Geschlecht der Spenderzellen stabil (2 Versuche). Zusammen mit den Befunden von HAUENSCHILD (1954) und unseren früheren Resultaten belegen diese Versuche eindeutig, daß a) die IZ von *Hydractinia* in ihrem Geschlecht genetisch determiniert sind, b) *die sexuelle Determination auch im fremdgeschlechtlichen Gewebe stabil bleibt*, c) *der Geschlechtsumschlag keine echte, durch Sexualhormone oder Terphone hervorgerufene Inversion ist, daß vielmehr eine solche Inversion durch „parasitierende“ IZ vorgetäuscht wird.*

2. Die „Übertragung“ der Gewebeverträglichkeit

Wie das Geschlecht, so werden auch andere genetisch festgelegte Eigenschaften mit den IZ auf den Wirt übertragen. Eine solche, genau definierbare Eigenschaft ist die Gewebeverträglichkeit, die nach HAUENSCHILD (1956) klonkonstant ist und polygen vererbt wird. Gegenüber einer Reihe von Testklonen zeigt jeder Stamm ein charakteristisches Spektrum der Gewebeverträglichkeit. Nach vollzogener Gewebsrestitution ist das Spektrum des Wirtsstockes identisch mit dem des Spenderklons (Tabelle 3). Werden in eine IZ-freie Kultur (Klon Y in Abb. 9) IZ zweier Spenderklone eingeführt, wobei zwar jeweils die Spenderklone (♂ 4 und ♀ B) mit dem Wirtsklon, nicht aber die Spender unter sich

Tabelle 3. Der mit I-Zellen von ♀ Y beimpfte Wirtsstock ♂ 4 zeigt nach vollzogener Gewebserneuerung dasselbe Spektrum der Gewebeverträglichkeit mit den Testklonen wie der Spenderklon ♀ Y

Testklon	Wirt ♂ 4	Spender ♀ Y	Wirt nach Rekonstitution
B	—	+	+!
M	—	—	—
S	—	—	—
A	—	+	+!
3	+	+	+
5	—	—	—
9	—	+	+!
23	+	—	—!

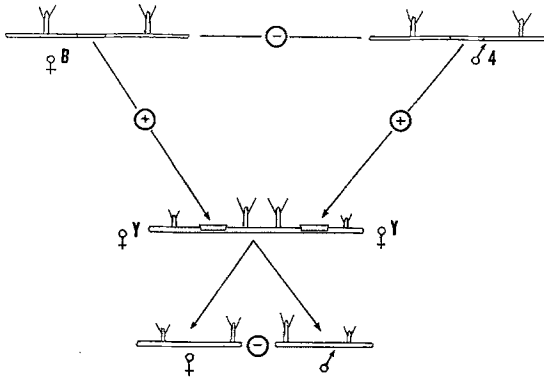


Abb. 9. Schema zur Versuchsanordnung Kap. III, 2: „Übertragung der Gewebeverträglichkeitseigenschaften“

verträglich sind, so zerteilt sich im Zuge der Erneuerung der Wirtsstock. Um die zwei Implantate grenzt sich jeweils ein Feld ab, das die Charakteristika des betreffenden Spenders zeigt. Im Kontaktbereich beider Felder zerfällt das Gewebe und es stehen sich zwei genetisch verschiedene, unverträgliche und gegengeschlechtliche Stücke gegenüber.

3. Der Einfluß der Gewebeverträglichkeit auf die Möglichkeit einer Gewebserneuerung

Wird eine IZ-freie Kultur mit I-Zellen eines gewebetoleranten Klons beimpft, so kann der Wirtsstock *erscheinungsbildlich seine Identität bewahren, obwohl er letztlich in seinem Genotyp dem Spenderklon entspricht*. Eine solche Umwandlung bei äußerer Formkonstanz gelang allerdings nur bei der Klonkombination ♂ 4 + ♀ Y. Sie setzt eine möglichst milde Behandlung der Wirtskultur mit Mitomycin voraus. Zu diesem

Versuch wurden 48 Stöcke des Klons ♂ 4 mit 0,06 mM/l Mitomycin C inkubiert. In Abständen von 2 Std wurden jeweils 6 Stöcke dem Inku-
bationsmedium entnommen und mehrfach gewaschen. Um eine gute

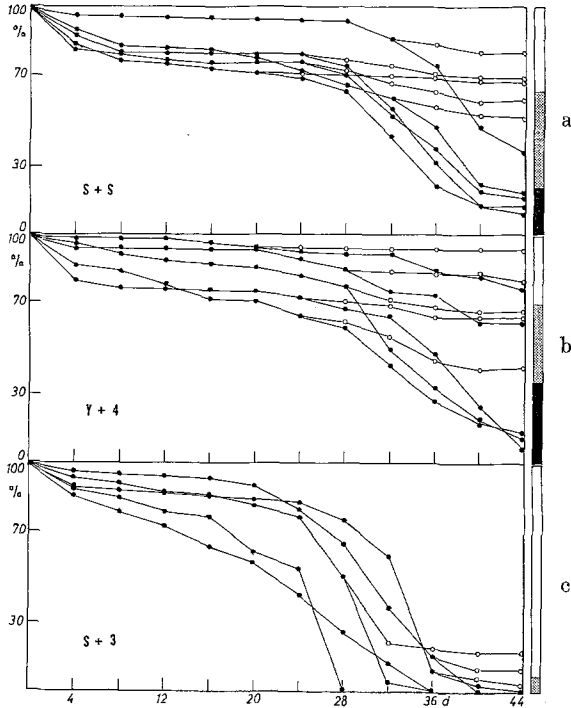


Abb. 10a—c. Reduktion der Wirtspolypen nach Beimpfen mit I-Zellen a von einem homoklonalen Spender (oberes Diagramm), b von einem gut gewebetoleranten heteroklonalen Spender (mittleres Diagramm), c von einem nur vorübergehend mit dem Wirt gewebeverträglichen Spenderklon (unteres Diagramm). ● Prozentsatz unverändert gebliebener Polypen. ○ Prozentsatz unveränderter Polypen + Anteil derjenigen Polypen, die nach teilweiser Resorption regenerierten. Jede Kurve stellt den Verlauf bei einer 5 Stöcke (ca. Σ 200 Polypen) umfassenden Versuchsgruppe dar. Das Balkendiagramm rechts gibt die Endresultate (Mittelwerte aus den Gruppen) nach 42 Tagen wieder. Schwarz: Äußerlich unverändert gebliebene Polypen; grau: nach teilweiser Einschmelzung regenerierte, weiß: ganz resorbierte Polypen

Versorgung mit IZ zu erreichen, wurde an mehreren Stellen der Stolonplatte Spendergewebe (Klon ♀ Y) eingesetzt. Bei kurzen (2—12 Std) Inkubationszeiten werden zwar nicht in jedem Fall alle IZ lysiert; solche Stöcke sind jedoch daran zu erkennen, daß sie während der Geschlechtsreife Spermata produzieren. Wir erhielten zwei Stöcke, deren Polypen

scheinbar unverändert blieben, die aber doch rein ♀ wurden und im Gegensatz zu vorher, aber übereinstimmend mit dem Spenderklon, mit dem Testklon B dauerhaft verwachsen.

Bei allen anderen Klonkombinationen wurden die Polypen des Wirtsklons teilweise oder ganz resorbiert und durch neue aus der Stolonenplatte sprossende Polypen ersetzt. Die quantitative Auswertung dieser Beobachtung ergab, daß die Reduktion der Wirtspolypen bei verschiedenen Klonkombinationen ein unterschiedliches Ausmaß annimmt (Abb. 10). Dies kann als Hinweis gewertet werden, daß auch bei dauerhafter Gewebeerneuerung ein unterschiedliches Maß an Verträglichkeit herrscht. *Nur wenige Kombinationen führen zu einem kontinuierlichen Zellenersatz bei weitgehender äußerer Formkonstanz.* Untersuchungen darüber, ob die in Fremdklone eingepflichten IZ in ihrer Vermehrungsfähigkeit oder in ihrer Differenzierung gehemmt sind, stehen noch aus.

D. Diskussion

1. Zur Differenzierungspotenz der IZ

Die geschilderten Versuche belegen, daß den IZ im Falle von *Hydractinia* die ihnen von vielen Autoren zugesprochene Pluripotenz zukommt. Sie können alle Zelltypen des Organismus unmittelbar oder mittelbar aus sich hervorgehen lassen. Ein möglicher Einwand kann allerdings vorerst noch nicht entkräftet werden. Nach MARTIN und TARDENT (1963) sind dissoziierte EPZ von *Tubularia* amöboid beweglich. Sofern dies auch bei *Hydractinia* und im geschlossenen Gewebeerband der Fall sein sollte, muß die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß sich vom Spendergewebe neben IZ und Cnidoblasten auch Epithelzellen ablösen, ins Wirtsgewebe eindringen und zur Gewebeerneuerung beitragen. Das frühzeitige Loslösen des Spenders vom Wirt (Kap. II, 1) würde eine solche durch wandernde EPZ verursachte Fälschung der Resultate nicht verhindern. Solange aber diese Möglichkeit nicht als zutreffend bewiesen ist, darf angenommen werden, daß die IZ allein eine vollständige Gewebeerneuerung zu leisten imstande sind. Unabhängig davon muß auch den Epithelzellen eine weitgehende Plastizität zugesprochen werden, insofern, als im Zuge der Regeneration und der Knospung eine Entdifferenzierung statthat und reprimierte Gene erneut aktiviert werden können. Allerdings können sie zwei im Genotyp programmierte Entwicklungspotenzen nicht mehr entfalten: Cnidoblasten und Geschlechtszellen entwickeln sich ausschließlich aus I-Zellen. Im Normalgeschehen entstehen die Epithelzellen in den meristematischen Zonen durch Teilung ihresgleichen. Demgemäß kann erwartet werden, daß eine beschränkte Gewebeerneuerung auch von EPZ geleistet werden kann, welche vom Implantatrand vorwachsend die defekten Wirtszellen ver-

drängen. Die Möglichkeit einer sukzessiven Gewebsverdrängung ist experimentell belegt (MÜLLER, 1964).

Vergleichbare Untersuchungen liegen nur für Hydren vor. TARDENT (1966) registriert bei *H. attenuata* die Anzahl der in bestrahlte Pflropfpartner eingeströmten Wanderzellen und ermittelt sehr hohe Werte. DIEHL und BURNETT (1966) konnten bei *H. pseudoligactis* und *H. pirardi* ebenfalls einen Übertritt der IZ vom intakten zum homospezifischen, IZ-freien Pflropfpartner nachweisen. Sie betonen aber, daß diese allein dem Wirtsgewebe keine unbeschränkte Vitalität verleihen können, vielmehr dem Wirtsgewebe auch intakte Entodermelemente zugeführt werden müssen. Dieser Befund mahnt, die hier erzielten Ergebnisse nicht auf andere Hydrozoen zu extrapolieren. In Übereinstimmung mit den Verhältnissen bei *Hydractinia* ist nach denselben Autoren (1964, 1965) bei *H. pseudoligactis* die Anwesenheit von IZ weder für die Knospung noch für die Regeneration notwendig.

2. Zur Frage der Geschlechtsstabilität der IZ

Das Auftreten spontaner Geschlechtsinversionen und hermaphroditischer Formen bei normalerweise gonochoristischen Arten darf keinesfalls als Beweis für nichtgenetische Geschlechtsbestimmung gewertet werden; denn auch eine abnorme genetische Konstitution kann zu intersexen Formen führen (HAUENSCHILD, 1954, *Hydractinia echinata*) und zu labilen Hermaphroditen (STAGNI, 1966, *Chlorohydra viridissima*). Noch weniger darf der Geschlechtsumschlag bei Sexualchimären ohne detaillierte Analyse des Zellenaustausches als Nachweis modifikatorischer Geschlechtsbestimmung angeführt werden. In den bislang vorgelegten Untersuchungen ist die ausgeprägte Wanderfähigkeit der IZ nicht in Betracht gezogen worden. Unsere Befunde belegen, daß zumindestens bei *Hydractinia* der Geschlechtsumschlag keine echte Inversion ist, sondern durch eingewanderte, im Wirtspolypen parasitierende I-Zellen vorgetäuscht wird. Die ursprünglich sexuelle Determination bleibt auch im gegengeschlechtlichen Gewebe erhalten.

Zusammenfassung

1. Durch kurzfristige Applikation alkylierender Cytostatica ihrer I-Zellen beraubte *Hydractinia*-Kulturen verlieren weder die Fähigkeit zur Knospung noch zur Regeneration. Die Produktion von Nesselzellen ist unterbunden; ebenso sistiert die Erzeugung von Geschlechtsprodukten und damit zusammenhängend die Gonophorenentwicklung.

2. Die nach etwa 6 Wochen einsetzende Degeneration IZ-freier Stöcke wird verhindert, wenn sie mit neuen I-Zellen versorgt werden. Die Spenderzellen bewirken eine vollständige Erneuerung des Wirtsgewebes. Sie leisten zunächst Ersatz für defekte Epithelzellen und liefern nach der

Rekonstitution der Epithelien wieder Cnidoblasten und Geschlechtszellen.

3. Die Polypenperistome bleiben in der Regel von der Gewebserneuerung ausgeschlossen; denn sie werden nur spärlich von IZ besetzt. Sie werden resorbiert und epigenetisch regeneriert. Sofern vor der Einwanderung der Spenderzellen die Polypen bereits bis zur Basalzzone reduziert sind, kann sich der Restkörper unabhängig vom ursprünglichen Differenzierungszustand alternativ zum Nähr- oder Geschlechtspolypen entwickeln.

4. Die Infiltration durch Spenderzellen und deren mitotische Aktivität ist umso höher, je mehr die nekrotischen Erscheinungen im Wirtsgewebe fortgeschritten sind. Die Wanderbewegung muß nicht durch einen Wundreiz stimuliert werden.

5. Werden I-Zellen klonfremder Spender eingeführt, so gewinnt der Wirtsstock infolge des Zellaustausches die genetischen Eigenschaften des Spenders. Erscheinungsbildlich kann der Wirt seine Identität bewahren, doch nimmt er das Geschlecht des Spenders an und zeigt gegenüber einer Reihe von Testklonen dasselbe Spektrum der Gewebeverträglichkeit wie der Spenderklon.

6. Eine solche Umwandlung bei äußerer Formkonstanz ist nur bei der Kombination uneingeschränkt gewebeverträglicher Klone möglich. Je nach Gewebeverträglichkeit werden die Wirtspolypen in unterschiedlichem Ausmaß resorbiert und durch neue ersetzt.

7. Bei Sexualchimären kommt es zu einer Vermischung der ♂ und ♀ IZ-Populationen. In die Keimzone ♀er Blastostyle eindringende ♂ I-Zellen verdrängen die wirtseigenen Oocyten, liefern Sperma und täuschen so eine echte Geschlechtsinversion des weiblichen Partners vor. Wird vor Herstellung des Gewebekontaktes durch Applikation alkylirender Noxen die Konkurrenz der ♂ IZ ausgeschaltet, so liefern auch ursprünglich ♂ Blastostyle Eier. Die sexuelle Determination der I-Zellen bleibt auch nach wiederholter Passage durch fremdgeschlechtliches Gewebe stabil.

Summary

1. Cultures of *Hydractinia echinata*, the I-cells of which have been eliminated by short-time application of alkylating agents lose neither the ability for budding nor for regeneration. Only the production of cnidocytes stops. Also the proliferation of sex cells ceases and owing to that the development of gonophores is arrested.

2. The degeneration of I-cell-free colonies, which occurs after about six weeks, is prevented if they are supplied with new I-cells. The inoculated donor cells cause the complete reconstitution of the host tissue. At first they replace defective epithelial cells and having restored the epithelium they supply cnidoblasts and sexual products.

3. The hypostomes of the polyps usually are excluded from tissue reconstitution because they are only sparsely filled with I-cells. The hypostomes diminished by resorption are regenerated epigenetically. If the polyps are reduced already to the basal region before infiltration by donor cells, the rest of the body can grow alternatively to a gastrozoid or a gonozoid independently from its original state of differentiation.

4. The infiltration quota and the mitotic activity of the donor cells is higher the more the necrotic phenomena in the host tissue are advanced. The active migration does not need the stimulus of an injury.

5. If inoculated with I-cells from a heteroclonal donor the host culture acquires the genetical features of the donor as a result of the cell exchange. In the outward shape the host can preserve its identity, but it acquires the sex of the donor and shows the same spectrum of compatibility to a set of test-clones as does the donor clone.

6. Such a transformation in spite of unchanged outward appearance is only possible if clones, that are utterly compatible, are combined. As a function of compatibility the host polyps were resorbed to different degrees and became replaced by new polyps.

7. In sexual chimaeras the male and female populations of I-cells mix. Male I-cells which infiltrate the germzone of female gonozoids expel the oocytes of the host, produce spermatozoa and thus simulate a true sex-inversion of the female partner. If the competition of the masculine I-cells is eliminated by application of alkylating agents before the tissues come into contact, even originally male gonozoids will only produce eggs. The sexual determination of the I-cells remains stable even after repeated passage through heterosexual tissue.

Literatur

- DIEHL, F. A., and A. L. BURNETT: The role of interstitial cells in the maintenance of Hydra. I: J. exp. Zool. **155**, 253—260 (1964). II, III: J. exp. Zool. **158**, 283—298; 299—318 (1965). IV: J. exp. Zool. **163**, 125—137 (1966).
- GOETSCH, A.: Die Geschlechtsverhältnisse der Süßwasserhydroiden und ihre experimentelle Beeinflussung. Wilhelm Roux' Arch. Entwickl.-Mech. Org. **111**, 173—249 (1927).
- GUDE, W. G., A. C. UPTON, and T. T. ODELL: Giemsa staining of autoradiograms prepared with stripping film. Stain Technol. **30**, 161—162 (1955).
- HAUENSCHILD, C.: Genetische und entwicklungsphysiologische Untersuchungen über Intersexualität und Gewebeverträglichkeit bei *Hydractinia echinata*. Wilhelm Roux' Arch. Entwickl.-Mech. Org. **147**, 1—41 (1954).
- Über die Vererbung einer Gewebeverträglichkeitseigenschaft bei dem Hydroidpolypen *Hydractinia echinata*. Z. Naturforsch. **11**, 132—138 (1956).
- KLEINEBERG, N.: Hydra. Leipzig 1872.
- MARTIN, R., u. P. TARDENT: Kultur von Hydroidenzellen in vitro. Rev. suisse Zool. **70**, 312—316 (1963).

- MÜLLER, W.: Experimentelle Untersuchungen über Stockentwicklung, Polypendifferenzierung und Sexualchimaeren bei *Hydractinia echinata*. Wilhelm Roux' Arch. Entwickl.-Mech. Org. **155**, 181—268 (1964).
- Elimination der I-Zellen und Hemmung der Planulametamorphose durch alkylierende Cytostatika. Naturwissenschaften **53**, 184—185 (1966).
- PIRARD, E.: Induction sexuelle et intersexualité chez une hydre gonochorique (*Hydra fusca*) par la methode des greffes. C. R. Acad. Sci. (Paris) **253**, 1997—1999 (1961).
- STAGNI, A.: Some aspects of sexual polymorphism in *Chlorohydra viridissima*. J. ser. exp. Zool. **36**, 87—92 (1966).
- STEPHAN-DUBOIS, F.: Migration et potentialités histogénétiques des cellules indifférenciées chez les Hydres, les Planaires et les Oligochètes. Ann. Biol. **55**, 3. **27**, 733—753 (1951).
- STRELIN, G. S.: Röntgenologische Untersuchungen an Hydren. Wilhelm Roux' Arch. Entwickl.-Mech. Org. **115**, 27—51 (1928).
- TARDENT, P., u. U. MORGENTHALER: Autoradiografische Untersuchungen zum Problem der Zellwanderungen bei *Hydra attenuata* Pall. Rev. suisse Zool. **73**, 468—480 (1966).

Dr. WERNER MÜLLER
Zoophysiologisches Institut der Universität
74 Tübingen, Hölderlinstr. 12